



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Título de la Tesis:

**Participación de ciclodipeptidos producidos por
Pseudomonas aeruginosa PAO1 en el mecanismo
de infección bacteriana**

**Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas opción
Biología Experimental**

Presenta:

M.C. Sharel Pamela Díaz Pérez

Director de Tesis:

D.C. Jesús Campos García

Morelia Michoacán, Abril 2023.



AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca entregada, a la UMSNH por las instalaciones.

Al DC Jesús Campos García por su paciencia y dirección.

A los sinodales por la revisión y apoyo al proyecto.

Al laboratorio de Biotecnología microbiana,

A mis padres, mi hermana y Santi por su apoyo incondicional.

A Lola por ser mi lugar seguro.

Y a mi misma.

A. ÍNDICE

B. RESUMEN	7
C. ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El género <i>Pseudomonas</i>	11
1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2. Factores de virulencia.....	15
1.2.1. Movilidad.....	17
1.2.2. Lipopolisacáridos.....	17
1.2.3. Enzimas proteolíticas	19
1.2.4. Ramnolípidos	20
1.2.5. Fenazinas.....	20
1.2.6. Sideróforos.....	22
1.2.7. Biopelículas.....	23
1.3. Quorum sensing	26
1.3.1. Sistema Las y Rhl	26
1.3.2. Sistema Quinolona: Pqs	27
1.3.3. Sistema QS: Iqs	27
1.3.4. Ciclodipéptidos	29
1.4. Péptido sintetasas no ribosomales (NRPS).....	30
1.4.1 Dominio de Adenilación (A)	31
1.4.2 Dominio PCP.....	32
1.4.3 Dominio de condensación (C)	32
1.4.4 Dominio Te y su participación en la ciclación.....	33
1.4.5. NRPS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	34
II. ANTECEDENTES.....	36
III. JUSTIFICACIÓN.....	38
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVO GENERAL.....	38
5.1 Objetivos particulares	38
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
7.1. Material Biológico	40

7.2. Medios de Cultivo	46
7.3. Métodos	47
7.3.1. Condiciones de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	47
7.3.2. Crecimiento y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
7.3.3. Ensayos de Quorum sensing.....	47
7.3.4. Extracción y caracterización de ciclodipéptidos	48
7.3.5. Determinación de factores de virulencia	48
7.3.5.1. Biopelículas	48
7.3.5.2. Elastasa	48
7.3.5.3. Píocianina.....	49
7.3.5.4. Proteasa alcalina	49
7.3.5.5. Ramnolípidos	49
7.3.5.6. Píoquelina.....	50
7.3.5.7. Pioverdina	50
7.3.5.8. Lipopolisacáridos.....	50
7.3.6. Ensayos de virulencia con <i>Caenorhabditis elegans</i>	51
7.4. Análisis estadístico.....	51
VIII. RESULTADOS	52
IX. DISCUSIÓN	70
X. CONCLUSIÓN	77
XI. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN.....	78
XII. RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	85
12.1. Efecto en la producción de estructura y dinámica de biopelículas en mutantes relacionados con NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	85
12.2. Producción de mecanismos de evasión inmune en mutantes relacionados con NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	87
12.3. Efecto de los mecanismos de citotoxicidad en mutantes relacionados con NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	89
12.4. Los mecanismos de eliminación de hierro por sideróforos en mutantes en NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	90
12.5. Determinación de la viabilidad en <i>C. elegans</i> con los sobrenadantes mutantes relacionados con NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	92
12.6. Relación en mutantes relacionados con NRPS de <i>P. aeruginosa</i> con el quorum sensing.....	94
12.7. Producción de CDP en mutantes relacionados con NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	95

12.8. Correlación de factores de virulencia respecto a la producción de CDPs por mutantes en NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	98
12.9. Efecto de las NRPS de <i>P. aeruginosa</i> en la virulencia en <i>Mus musculus</i>	100
XIII. REFERENCIAS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El género <i>Pseudomonas</i> puede encontrarse en diferentes ambientes.	12
Figura 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Figura 3. Pigmentos producidos por <i>P. aeruginosa</i> ,.....	15
Figura 4. Representación esquemática de los principales factores de virulencia utilizados por <i>P. aeruginosa</i> durante infecciones respiratorias.	16
Figura 5. Ciclo de vida del desarrollo de las biopelículas producidas por <i>P. aeruginosa</i> . .	24
Figura 6. Quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i>	28
Figura 7. Biosíntesis de un ciclodipéptido mediante enzimas NRPS, el cual es un sistema dependiente de ATP para la activación de los aminoácidos.	31
Figura 8. Formación del enlace péptido.....	32
Figura 9. Mecanismo de liberación de los NRPS.	34
Figura 10. NRPS en <i>P. aeruginosa</i> regula la producción y estructura de biopelículas.	86
Figura 11. Los mecanismos de evasión inmune de <i>P. aeruginosa</i> no son modificados por los NRPS.	88
Figura 12. Los NRPS están involucrados en el aumento de piocianina en <i>P. aeruginosa</i>	89
Figura 13. Relación de la producción de pioquelina y pioverdina de los mutantes en NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	91
Figura 14. Efecto de NRPS sobre la viabilidad de <i>C. elegans</i> y la proporción de LPS de <i>P. aeruginosa</i>	93
Figura 15. Generación de bioluminiscencia en el biosensor dependiente de AHL por mutantes NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	94
Figura 16. Producción de ciclodipéptidos en cultivos de mutantes NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	96
Figura 17. Efecto de la participación de NRPS en la regulación de QS en <i>P. aeruginosa</i> . 97	
Figura 18. Correlación de la producción de factores de virulencia vs la producción de CDPs por mutantes en NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	99
Figura 19. Efecto de la participación de NRPS de <i>P. aeruginosa</i> en la supervivencia en ratones.	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de Dominios y porcentajes de identidad de NRPS proveniente de *S. aeurus* 35

Tabla 2. Organismos utilizados en este estudio. 40

B. RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista para humanos, animales y plantas, comúnmente afecta a pacientes con fibrosis quística, los cuales son vulnerables a infecciones nosocomiales; puede colonizar más fácilmente el tracto respiratorio, especialmente pulmones, ocasionando la muerte del paciente por afectación del sistema respiratorio e inmunológico.

Investigaciones recientes, han demostrado que el mecanismo de comunicación bacteriana Quorum sensing (QS) modula la virulencia y la producción de biopelículas en *P. aeruginosa*. Además, el QS posee características de adaptación dependiendo del ambiente en el que se encuentre, por lo que provee una alta flexibilidad en el control de la expresión de genes relacionados con los mecanismos de virulencia. Esta comunicación jerárquica está dada por enzimas Péptido sintetasa no ribosomales (NRPS), las cuales sintetizan Ciclodipéptidos (CDPs). Por lo que, se ha sugerido que los CDPs podrían estar jugando papeles importantes de señalización en los mecanismos que controlan la patogénesis bacteriana; tales como la señalización bacteria-hospedero, crecimiento y/o proliferación celular, evasión de la respuesta inmune, entre otras. Sin embargo, la participación de los CDPs como moléculas de señalización, así como los mecanismos moleculares involucrados han sido pobremente estudiados. Por lo que, es de gran importancia dilucidar el mecanismo por el cual los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 contribuyen en su virulencia y/o patogénesis. En el presente trabajo, se evaluó si las NRPS están involucradas en la virulencia de la bacteria, determinando los factores de virulencia que producen y si están involucradas en la regulación del QS. Utilizando cepas mutantes simples y dobles en NRPS, principalmente de: AmbB, AmbE, PchE, PchF, PvdL, PvdJ, PvdI, PA3327, y PA4078 se cuantificó la producción de sideróforos, tales como pioverdina y pioquelina, además de la producción de elastasa y proteasa, donde no se obtuvieron diferencias significativas. Asimismo, se cuantificó la producción de biopelículas, supervivencia del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, CDPs y Quinolona, donde se observaron cambios en dichos factores de virulencia, principalmente por los genes Amb y Pvd's. Los resultados obtenidos mostraron que puede existir redundancia génica por parte de estas NRPS, y que las mutantes en Pvd's podrían estar involucradas en la producción de biopelículas, así como en el establecimiento de la infección. La conclusión del trabajo indica que las mutaciones simples realizadas por la inserción del transposón en los genes *pvdI*, *pvdJ* y *pvdL* fueron insuficientes para abolir la síntesis de pioverdina, lo que indica que módulos específicos en las NRPS son funcionales y que podría ocurrir una redundancia de funciones.

Adicionalmente, las NRPS (PvdI, PvdJ y PvdL) de *P. aeruginosa* PAO1 afectan la estructura de las biopelículas y la capacidad del establecimiento de la bacteria en el hospedero, modificando así su virulencia.

Palabras Clave: *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum sensing, virulencia, ciclodipéptidos, biopelículas.

C. ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium for humans, animals, and plants. Commonly, affects patients with cystic fibrosis, which vulnerable to nosocomial infections; it can more easily colonize the respiratory tract, especially the lungs, producing the death of the patient due to involvement of the respiratory and immune systems.

Recent research has shown that the bacterial communication mechanism Quorum sensing (QS) modulates virulence and biofilm production in *P. aeruginosa*. In addition, QS has characteristics of adaptation depending on the environment in which it is found, thus providing high flexibility in the control of the expression of genes related to virulence mechanisms. This hierarchical communication is given by nonribosomal peptide synthetases (NRPS) enzymes, which synthesize Cyclodipeptides (CDPs). Therefore, it has been suggested that CDPs could be playing important signaling roles in the mechanisms that control bacterial pathogenesis, such as bacteria-host signaling, cell growth and/or proliferation, evasion of the immune response, among others. However, the participation of CDPs as signaling molecules, as well as the molecular mechanisms involved, have been poorly studied. Therefore, it is of great importance to elucidate the mechanism by which *P. aeruginosa* PAO1, contribute to its virulence and/or pathogenesis. In the present work, it was evaluated if the NRPS are involved in the virulence of the bacteria, determining the virulence factors that they produce and if they are involved in the regulation of QS. Using single and double mutant strains in NRPS, mainly of: AmbB, AmbE, PchE, PchF, PvdL, PvdJ, PvdI, PA3327, and PA4078, the production of siderophores, such as pyoverdine and pioquelin, was quantified, as well as the production of elastase and protease, where no significant differences were obtained. Likewise, the production of biofilms, survival of the *Caenorhabditis elegans* nematode, CDPs and Quinolone were quantified, where changes in said virulence factors were observed, mainly due to the Amb and Pvd's genes. The results obtained showed that there may be gene redundancy on the part of these NRPS, and that the Pvd's mutants could be involved in the production of biofilms, as well as in the establishment of the infection. The conclusion of the work indicates that the single mutations made by the transposon insertion in the *pvdI*, *pvdJ* and *pvdL* genes were insufficient to abolish the synthesis of pyoverdine, indicating that specific modules in the NRPS are functional and that redundancy could occur. Additionally, the NRPS (PvdI, PvdJ and PvdL) of *P. aeruginosa* PAO1 affect the structure of biofilms and the ability of the bacteria to establish itself in the host, thus modifying its virulence.

KEYWORDS

Pseudomonas aeruginosa, Quorum sensing, virulence, cyclodipeptides, biofilm.

I. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos extracelulares secretados al ambiente como resultado de la actividad metabólica de las células son esenciales para la vida microbiana, ya que pueden ser usados como sustratos para los microorganismos. Por otra parte, se ha establecido que los microorganismos pueden secretar un amplio rango de sustancias con múltiples actividades biológicas capaces de influenciar la reproducción y estado fisiológico de las plantas y animales, tales como vitaminas y factores de crecimiento, inhibidores enzimáticos o autoreguladores, entre otros (Chhabra et al., 2005). Adicionalmente, existe evidencia sobre el papel que juegan los compuestos extracelulares en la adaptación microbiana, confiriendo propiedades que les permiten adaptarse a las variantes condiciones ambientales, así como poder interactuar entre sí o con hospederos de diferente reino (Fuchs et al., 2012).

1.1. El género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* comprende un amplio grupo de bacterias que son fácilmente encontradas en el ambiente, su diversidad ecológica es el reflejo de sus requerimientos nutricionales y su capacidad metabólica para asimilar un amplio número de compuestos orgánicos. Este género pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales* que comprende a la familia *Moraxellaceae*. “*Pseudomonas*” deriva del griego, “pseudo” que significa “falso” y “monas” que significa “unidad simple”, es decir, “falsa unidad”. En general, las especies de este género crecen rápidamente y en un amplio rango de temperaturas, aproximadamente de 20°C a 42°C, y son capaces de desarrollarse en diferentes condiciones ambientales. Son organismos muy ubicuos y se pueden encontrar tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, por lo que suelen ser patógenos de plantas, animales y humanos (Palleroni, 1993).

Pseudomonas es un bacilo Gram negativo aerobio, no fermentador, prueba de catalasa y oxidasa positivo y móvil, debido a su flagelo polar ubicado en un extremo de la bacteria. Algunas cepas de *Pseudomonas* producen pigmentos difusibles como son pioverdina (amarillo-verdoso), piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo) y la piorrubinas (rojo-pardo) (Silby et al., 2011). Este género es conocido por su versatilidad metabólica y fisiológica, así como, su plasticidad genética lo que le permite la colonización de diversos hábitats terrestres y acuáticos. Frecuentemente son resistentes a antibióticos, detergentes, desinfectantes, metales pesados, así como a solventes orgánicos (D’Arezzo et al., 2012; Lanini et al., 2011). Actualmente, son de gran interés debido a su importancia en producir

1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria en forma de bacilo recto o ligeramente curvado, Gram negativa y pertenece al grupo de γ proteobacterias (**Fig. 2**) (Woese, 1987). Su metabolismo es aerobio, aunque puede desarrollarse como anaerobio utilizando nitrato, es catalasa y oxidasa positivas. Asimismo, debido a que pertenece al género *Pseudomonas*, presenta un flagelo ubicado al extremo de la bacteria, y pilis en su anatomía, lo cual le da movilidad para llegar a infectar al hospedero (Frank, 2012).



Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*.

La anatomía de esta bacteria es en forma de bacilo, con pilis y un único flagelo situado al extremo de la bacteria que le permite moverse e infectar al hospedero. Tomada de Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP) (2019).

La versatilidad metabólica de *P. aeruginosa* se destaca por su capacidad para sintetizar matrices extracelulares en respuesta a las condiciones ambientales, por lo que suele ser ubicuo en el medio ambiente, lo que le permite persistir de manera eficaz en el agua, y suelo, con requerimientos nutricionales mínimos; crece entre 20-43°C. De igual manera, es utiliza fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoniacó, obteniendo energía de la oxidación de azúcares. El genoma central de *P. aeruginosa* es altamente conservado y dispuesto linealmente como un solo cromosoma. Aproximadamente, el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases, lo que representa un mayor tamaño en comparación con otros genomas de bacterias secuenciados (Kawalek et al., 2020). La

estructura de mosaico del genoma se ve interrumpida por el genoma accesorio que se compone de regiones de plasticidad, islas integradas, transposones, fagos o elementos IS. Las comparaciones de cepas del mismo complejo clonal, aunque de origen geográfico no relacionado, muestran una baja tasa de sustitución (Azam & Khan, 2019).

La versatilidad está relacionada con una combinación de un gran genoma, elementos accesorios y una variedad de sistemas reguladores (Frank, 2012). Esta bacteria metabólicamente versátil implica con frecuencia sublíneas o derivados de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, aislada originalmente de una herida de un paciente en el laboratorio de Holloway, Melbourne, Australia (Holloway, 1955), esta cepa no contiene plásmidos. Más de la mitad de los genes de *P. aeruginosa* PAO1 presentan una homología cercana y un arreglo transcripcional en operones similar a los de *Escherichia coli*. También *P. aeruginosa* presenta homología en la secuencia y en la organización genética con bacterias ambientales, incluso con bacterias Gram-positivas. El 32% de los genes predichos a partir de la secuencia del genoma de esta bacteria no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos, lo que sugiere que se trata de genes que codifican para actividades enzimáticas novedosas. Del análisis del genoma de esta bacteria es notorio la gran abundancia de genes que parecen codificar para bombas que expulsan compuestos de la célula. La abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos y, en última instancia, con su extraordinaria versatilidad (Kawalek et al., 2020)

Asimismo, es capaz de producir proteasas y elastasas, enzimas que degradan múltiples proteínas inmunorreguladoras, incluyendo surfactantes, complementos, inmunoglobulinas y péptidos antimicrobianos. Además, *P. aeruginosa* produce pigmentos que le dan el color característico a la bacteria cuando crece en medio de cultivo, entre ellos destacan: el compuesto verde fluorescente, pioverdina; pigmento fenacínico azul-verdoso, piocianina; y cuando la pioverdina se combina con piocianina, se crea el color verde brillante característico de la bacteria; la piorrubina (rojo) y la piomelanina (marrón) (**Fig. 3**). Estas sustancias, cuya producción se ve favorecida por temperaturas menores a 37 °C y por la presencia de hierro en el medio, fueron aplicadas como marcadores fenotípicos con utilidad variable, se ha demostrado que poseen actividad antibacteriana y efecto sobre la integridad del epitelio respiratorio (Merino, 2007).

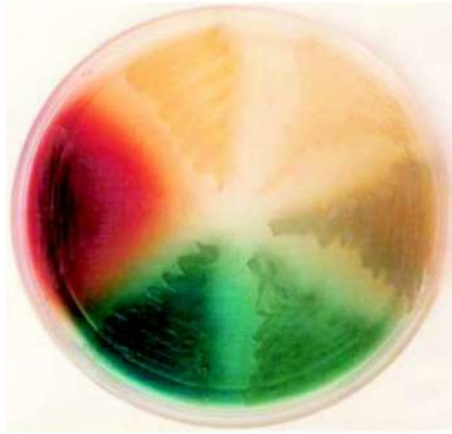


Figura 3. Pigmentos producidos por *P. aeruginosa*,

colonias aisladas de hospitales. Se aprecian los diferentes pigmentos producidos sobre agar Mueller Hinton después de 48 h de incubación a 28 °C (tomada de Merino, 2007).

P. aeruginosa presenta una extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia antimicrobiana a casi todos los agentes antipseudomonas disponibles, a través de la selección de mutaciones cromosómicas. De hecho, el fracaso del tratamiento causado por el desarrollo de resistencia antimicrobiana es un resultado demasiado frecuente de las infecciones por *P. aeruginosa*. El problema de la resistencia a los antibióticos mediada por mutaciones se amplifica aún más en el entorno de infecciones crónicas, debido a la muy alta prevalencia de cepas hipermutables, que muestran tasas de mutación espontánea mejoradas causadas por sistemas defectuosos de reparación o evitación de errores del ADN (Maciá et al., 2005; Oliver et al., 2000).

Esta bacteria es patógena de plantas, como *Arabidopsis thaliana* y patógena oportunista en humanos (Rahme et al., 1997). Este patógeno oportunista suele ser causa de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. En pacientes con fibrosis quística, *P. aeruginosa* coloniza crónicamente los pulmones y es un factor importante de mortalidad. Por lo regular, esta bacteria se encuentra en pacientes hospitalizados representando el 10-20% de las infecciones intrahospitalarias, especialmente asociadas con enfermedades neoplásicas o quemaduras severas (Kawalek et al., 2020).

1.2. Factores de virulencia

La capacidad que tiene *P. aeruginosa* para causar un amplio margen de infecciones radica en la gran variedad de factores de patogenicidad que posee. *P. aeruginosa* muestra un

amplio repertorio de factores de virulencia tanto asociados a las células como extracelulares que contribuyen a su patogenicidad, siendo controlados por circuitos reguladores y sistemas de señalización increíblemente complejos e interconectados, que le dan a este patógeno una gran plasticidad (**Fig. 4**) (Jurado-Martín et al., 2021).

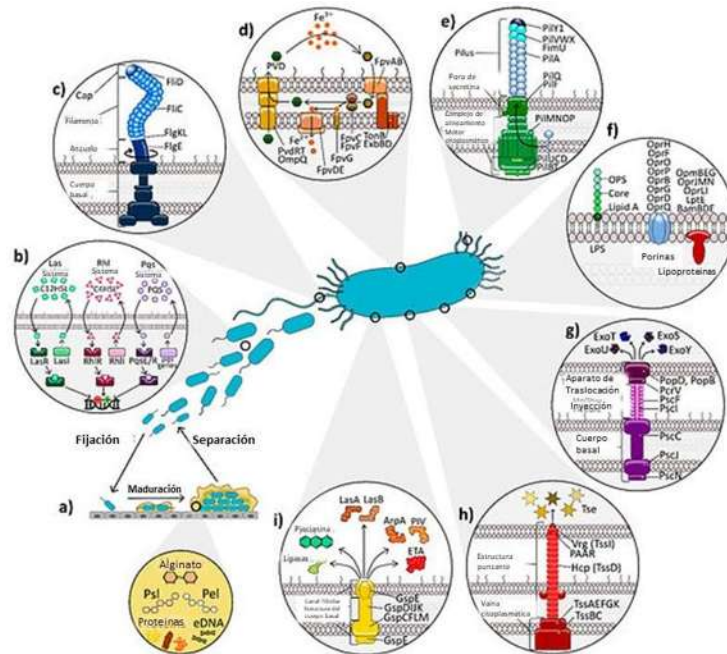


Figura 4. Representación esquemática de los principales factores de virulencia utilizados por *P. aeruginosa* durante infecciones respiratorias.

Capacidad de formación de biopelículas y composición de la matriz extracelular de las biopelículas (exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular); (b) los tres sistemas principales de detección de quórum (QS) (Las, Rhl y Pqs); (c) flagelinas FliC y FliD incorporadas dentro de la estructura flagelar; (d) sideróforo de pioverdina (PVD) como sistema de captación de hierro; (e) pili tipo 4 (T4P); (f) lipopolisacárido (LPS) y proteínas de membrana externa (OMP); (g) el sistema de secreción de tipo III (T3SS) y sus cuatro efectores principales; (h) el sistema de secreción tipo VI (T6SS); (i) el sistema de secreción tipo II (T2SS) y los compuestos que libera al medio extracelular: enzimas líticas (lipasas, proteasas (AprA y PIV) y elastasas (LasA y LasB)), exotoxina A (ETA) y piocianina. Tomado de Jurado-Martín et al., 2021.

1.2.1. Movilidad

1.2.1.1. Flagelo

P. aeruginosa posee un único flagelo polar que consta de un filamento hecho de flagelina polimerizada dispuesta helicoidalmente (FliC), una proteína específica de tipo (FliD), el gancho en la base del filamento (FlgE), dos ganchos de filamento de proteínas de unión (FlgKL), y una serie de componentes del cuerpo basal a través de las membranas internas y externa. Aunque *P. aeruginosa* también se mueve sobre superficies sólidas, el flagelo es el principal responsable de la motilidad de natación en ambientes acuosos o de baja viscosidad a través de la rotación en forma de sacacorchos, generando una fuerza que mueve a la bacteria hacia adelante (García et al., 2018).

1.2.1.2. Pili

P. aeruginosa presenta pilis tipo IV, que son apéndices filamentosos retráctiles similares a pelos que están ubicados polarmente, además, son estructuras esenciales para el inicio de la infección al mediar la motilidad y la adhesión. Controlan la motilidad de espasmos, utilizados para la colonización rápida de diferentes superficies. Esto implica ciclos secuenciales de extensión, adhesión y retracción de las fibras T4P, que generan la fuerza para impulsar la célula hacia adelante. La extensión y retracción del pilus se logra a través de dos ATPasas asociadas a la membrana citoplasmática (PilB y PilT) que, respectivamente, polimerizan y despolimerizan las subunidades PilA en su base. Además, hay cinco grupos de T4P (I, II, III, IV y V) que están asociados con diferentes patrones de producción de biopelículas y resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Talà et al., 2019).

1.2.2. Lipopolisacáridos

El lipopolisacárido (LPS) se compone de tres dominios: el lípido A, la región central y el antígeno O o polisacárido O (OPS), y se producen varias glicoformas que contribuyen a su virulencia. Es una barrera física que interviene en las interacciones con los receptores del hospedero y causa un daño tisular debido a su actividad endotóxica. El LPS estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mucina formadora de gel en las células epiteliales de las vías respiratorias, lo que se asocia con la morbilidad y mortalidad de los pacientes con asma, EPOC y FQ. Aumenta la permeabilidad paracelular epitelial de las vías respiratorias e induce la inflamación pulmonar al estimular el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina (IL)-1, la IL-6 y el interferón (IFN)- γ . El LPS también contribuye a la resistencia a los antibióticos e influye en la formación de vesículas de membrana externa (OMV) y biopelículas (Florez et al., 2017).

El lípido A es un glicolípido hidrofóbico que ancla los otros dos restos de LPS en la membrana externa (OM) y media la endotoxicidad. Se compone de un esqueleto de bifosfato de diglucosamina con ácidos grasos enlazados por O y N y varía entre los aislamientos según las condiciones de crecimiento y las fuentes de aislamiento, lo que tiene implicaciones considerables para la adaptación al nicho. Las cadenas de acilo del lípido A se unen al receptor MD2 de la célula hospedera, activando la vía de señalización del receptor tipo toll (TLR)-4. Tanto las cadenas de acilo como los fosfatos del lípido A interactúan con una quinolona del sistema de detección de quórum (QS) de Pqs cuando se exporta al OM, induciendo la curvatura de la membrana, lo que lleva a la formación de OMV. Los mutantes defectuosos para la síntesis de lípido A no pudieron desarrollar biopelículas en las superficies bióticas y abióticas y exhibieron una unión bacteriana significativamente menor a las células epiteliales de las vías respiratorias, lo que sugiere que el LPS puede desempeñar un papel indirecto en la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas (Lindhout et al., 2009).

El O-polisacárido es una cadena larga periférica altamente variable e inmunogénica de polisacáridos repetitivos que pueden ser lineales o ramificados. Dos formas de LPS están expuestas en la superficie bacteriana, llamadas "cubiertas" o "lisas" y "sin tapar" o "ásperas" cuando el OPS está presente o ausente, respectivamente (King et al., 2009). Además, se producen simultáneamente dos antígenos O: (i) el antígeno polisacárido común (CPA o banda A), un homopolímero que tiene una estructura conservada que consta de unidades repetitivas de trisacárido d-ramnosa y (ii) el antígeno específico O (OSA o B-band), un heteropolímero de cepa variable que da lugar a 20 serotipos, según el esquema propuesto por el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica (IATS) (Sainz-Mejías et al., 2020). Debido a que, el OPS se extiende hacia afuera desde el MO, está involucrado en muchas interacciones hospedero-patógeno: (a) la prevención de la muerte bacteriana al inhibir la deposición del complejo de ataque de membrana formador de poros y la fagocitosis, (b) la protección contra la oxidación y estrés, y (c) probablemente, estimulación de NETosis (Huszczynski et al., 2020). Los cambios en el OPS afectan el tamaño de OMV y el contenido de proteínas, aunque el mecanismo aún no se conoce bien. Además, las células que no producen CPA no lograron convertirse en biopelículas robustas y exhibieron cambios en la morfología celular y la producción de matriz de biopelícula, probablemente porque el OPS es esencial para una motilidad efectiva. El CPA también puede ser importante para la unión bacteriana a las células epiteliales bronquiales humanas (Jamasbi & Taylor, 2010).

1.2.3. Enzimas proteolíticas

P. aeruginosa libera una amplia gama de proteasas extracelulares que son críticas para la invasión en infecciones agudas: elastasas LasA y LasB, proteasa alcalina (AprA), proteasa tipo IV (PIV), proteasa pequeña de *P. aeruginosa* (PASP), exoproteasa grande A (LepA), *P. aeruginosa* aminopeptidasa (PAAP) y MucD (Kuang et al., 2011).

Las elastasas LasA y LasB son secretadas por el T2SS bajo la regulación de los sistemas QS y degradan la elastina del hospedero. La elastasa LasB, también denominada “elastasa” o “pseudolisina”, es una metaloproteasa dependiente de zinc de la familia de las termolisinas codificada por el gen *lasB*. Es la proteasa más abundante y se considera el principal factor de virulencia extracelular. Aparte de su actividad elastinolítica, también interrumpe las uniones estrechas epiteliales y escinde otras proteínas del hospedero, por ejemplo, proteínas surfactantes (SP-A y SP-D), citoquinas (TNF- α , IFN- γ , IL-6 o IL-2), inmunoglobulinas y componentes del inflammasoma, lo que interfiere con la eliminación bacteriana. También degrada la flagelina exógena cuando existe un aumento de calcio en el hospedero, evitando el reconocimiento de TLR5 y socava la actividad de los macrófagos alveolares a través de la regulación a la baja de la producción de importantes ROS secretadas y moléculas y receptores inmunitarios innatos (Casilag et al., 2015). También afecta la formación de biopelículas a través de la regulación de ramnolípidos (RL), LasA, o estafilolisina, esta es una serina proteasa codificada por el gen *lasA*, su nombre se debe a su capacidad para causar una lisis rápida de *S. aureus* al romper el puente de pentaglicina en su PG. Aunque su actividad elastinolítica es limitada, puede mejorar esta acción en otras proteasas, incluida LasB, al romper los enlaces glicina-glicina dentro de la elastina. Recientemente, la expresión de LasA se correlacionó con la resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (Bastaert et al., 2018).

La proteasa alcalina, o aeruginolisina, es una metaloendopeptidasa dependiente de zinc secretada a través del T1SS y codificada por el gen *aprA*. Interfiere principalmente con la fibronectina y la laminina, dos componentes de la matriz extracelular, y degrada las proteínas del complemento (C1q, C2 y C3) y las citoquinas (IFN- γ , TNF- α e IL-6), lo que permite la evasión fagocítica. También escinde monómeros de flagelina libres y puede reducir la eliminación mucociliar de bacterias al activar el canal de sodio epitelial (ENaC). También contribuye a la producción de otros factores de virulencia, como PYC (Butterworth et al., 2014).

Esta proteasa de tipo IV (PIV) es una serina proteasa secretada por T2SS que pertenece a la familia de quimotripsinas S1. Está codificado por el gen *piv* y su expresión está bajo el control del sistema Las QS. Aunque tiene un papel importante en la virulencia de la córnea, también puede ser importante para la patogenia de *P. aeruginosa* dentro del pulmón con FQ al degradar el fibrinógeno y las proteínas del surfactante (SP-A, SP-D y SP-B), lo que contribuye a la invasión de tejidos. PIV también promueve la evasión inmune al degradar el plasminógeno, inmunoglobulinas, C1q, C3 e IL-22, lo que dificulta la regulación de la defensa de la mucosa y exacerba la neumonía neumocócica y la enfermedad invasiva. También puede interferir con la activación de la señalización Toll y la producción de adenosin monofosfato (AMP) (Park et al., 2014).

1.2.4. Ramnolípidos

Los ramnolípidos son metabolitos secundarios extracelulares anfipáticos formados por una fracción de mono- o di-(L)-ramnosa (grupo hidrofílico) unida a través de un enlace O-glucosídico a un dímero de la cola de ácido graso β -hidroxi (grupo hidrofóbico). Contribuyen significativamente a la patogenia de *P. aeruginosa* en el pulmón, al degradar el surfactante pulmonar, reducir la resistencia eléctrica transepitelial y alterar las uniones estrechas en el epitelio respiratorio. Su producción por aislamientos colonizadores se ha asociado con el desarrollo de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) (Köhler et al., 2010). Si bien la sobreproducción de RL impide el desarrollo de biopelículas, las bajas concentraciones mejoran la liberación de LPS a la superficie celular, lo que aumenta la hidrofobicidad y la afinidad para la adherencia inicial de las bacterias a una superficie. La producción de una cantidad adecuada contribuye a la arquitectura de la biopelícula al mantener abiertos los canales no colonizados. Los RL también facilitan la motilidad deslizante en ausencia de T4P y flagelos y permiten la motilidad en enjambre al reducir la tensión superficial debido a sus propiedades surfactantes. Así, la producción de RL se induce en condiciones de restricción de hierro, lo que promueve la motilidad de espasmos (Nickzad & Déziel, 2014). También participan en la evasión inmunitaria para facilitar las infecciones crónicas al causar la muerte necrótica de los leucocitos polimorfonucleares. Suprimen la inmunidad innata del hospedero, evitando una respuesta de β -defensina2 humana inducida por flagelina a través de la proteína quinasa C (Wang et al., 2014).

1.2.5. Fenazinas

Las fenazinas son moléculas pigmentadas, con actividad redox, heterocíclicas, que contienen nitrógeno, secretadas por un número considerable de bacterias, incluidas

múltiples *Pseudomonas spp* fluorescentes (Chin-A-Woeng et al., 2005). Las fenazinas muestran un amplio espectro de actividad (tóxica) hacia los organismos procariotas y eucariotas, que varía según la naturaleza y la posición de los sustituyentes en el anillo heterocíclico. Esta toxicidad confiere una clara ventaja a los productores de fenazina al eliminar a los competidores y mejorar la supervivencia en entornos muy poblados, como la rizosfera (Pierson & Pierson, 1996). La piocianina (5 - N -metil-1-hidroxifenazina), el primer y más estudiado miembro de la familia de las fenazinas, es producida únicamente por *P. aeruginosa*, especificidad que ha sido útil en el diagnóstico rápido de este patógeno oportunista. Esta fenazina azul es uno de los principales factores de virulencia de este patógeno, contribuyendo tanto a infecciones agudas como crónicas, ya que suprime la proliferación de linfocitos, daña las células epiteliales como consecuencia de la formación de radicales hidroxilos, inactiva los inhibidores de la proteasa (lo que provoca daño tisular por proteasas endógenas) y se dirige a múltiples funciones celulares (Nadal Jimenez et al., 2012).

1.2.5.1 Piocianina

La fenazina más estudiada es la piocianina (5-N-metil-1-hidroxifenazina), que es azul cuando se oxida. La piocianina (PYO) se aisló originalmente de heridas de pacientes y posteriormente se demostró que estaba asociada con infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Su presencia se asocia con una alta morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, como los pacientes con fibrosis quística (Courtney et al., 2007; Murray et al., 2007), también se estudian ampliamente para su aplicación en el manejo de enfermedades de las plantas.

La piocianina es un metabolito secundario con actividad redox responsable del color azul verdoso de las colonias de *P. aeruginosa* en cultivo. Esta fenazina, se asocia con la gravedad de la enfermedad y el deterioro de la función pulmonar debido a sus efectos proinflamatorios y de radicales libres. Puede aumentar las ROS intracelulares y el H₂O₂, provocando estrés oxidante y dañando los componentes del ciclo celular, varias enzimas y el ADN, lo que lleva a la lisis celular. En consecuencia, se libera ADN extracelular (eDNA), lo que probablemente contribuya a la formación de biopelículas y ayude a la persistencia de las infecciones. Se induce la liberación de ROS mitocondriales, lo que conduce a la apoptosis de los neutrófilos y, ralentiza el latido ciliar, causa disrupción epitelial y aumenta la secreción de mucosa en el tracto respiratorio, lo que contribuye a la colonización

pulmonar. Posteriormente, aumenta la producción de IL-8 por los macrófagos alveolares y la entrada de neutrófilos (Hall et al., 2016).

1.2.6. Sideróforos

El hierro (Fe^{3+}) es un nutriente esencial para el crecimiento bacteriano y la virulencia. En el ambiente estresante del hospedero, el hierro no está fácilmente disponible debido a su baja solubilidad y la actividad de las proteínas de unión al hierro del hospedero (transferrina y lactoferrina). Para cumplir con los requisitos de hierro, *P. aeruginosa* utiliza diferentes estrategias: (i) La producción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular llamados sideróforos (pioverdina y pioquelina); (ii) La captación de xenosideróforos; (iii) Captación de grupos hemo de las hemoproteínas del hospedero a través de dos sistemas; y (iv) Reducción de hierro por fenacinas a través del sistema Fe (Perraud et al., 2020).

La pioquelina es un sideróforo fenólico que contiene dos anillos heterocíclicos que contienen azufre (Ankenbauer et al., 1986). El mecanismo de captación es similar al de 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 (Nosran et al., 2021). Se ha demostrado que *P. aeruginosa* primero produce pioquelina y cambia a producción de pioverdina solo cuando la concentración de hierro es realmente baja (Cornelis & Dingemans, 2013).

Mientras que la pioquelina es un sideróforo basado en salicilato con una menor afinidad por el hierro, la pioverdina (PVD) tiene una naturaleza peptídica y se considera el principal sideróforo (Cezard et al., 2015). Dado que la producción de PVD es un proceso que demanda energía, *P. aeruginosa* produce principalmente pioquelina solo cuando la concentración de hierro es realmente baja. La PVD se compone de una cadena peptídica variable y un cromóforo de dihidroxiquinolina conservado, que se une al hierro (Poole & McKay, 2003) Las diferentes cepas producen más de 50 pioverdinas, aunque se pueden agrupar en tres tipos (PVDI, PVDII y PVDIII) según las diferencias en la cadena peptídica (Ravel & Cornelis, 2003). La PVD quela el hierro libre y lo elimina de las proteínas del hospedero, y esto se logra mediante una red compleja de transportadores y bombas de salida periplásmicas y de membrana. A pesar de ser esencial, el hierro cataliza las reacciones de Fe produciendo ROS en altas concentraciones, lo que lleva a la citotoxicidad. Por lo tanto, este sistema se apaga en presencia de suficiente hierro intracelular por el regulador de absorción férrico (Ghssein & Ezzeddine, 2022). Además, existe una relación

intrínseca entre el sistema Pqs QS y los niveles de hierro, ya que el principal regulador PvdS controla la expresión de PqsR y, por lo tanto, la síntesis de PQS. Por su parte, la pioquelina puede causar daño oxidativo e inflamación, especialmente en presencia de piocianina (Bonneau et al., 2020).

1.2.7. Biopelículas

En la naturaleza, la mayoría de las bacterias pueden adherirse a diferentes superficies y formar biopelículas. La biopelícula es un agregado complejo de bacterias encerradas en una matriz extracelular polimérica (EPS), la cual, es una de las estrategias clave para la supervivencia de las especies durante cambios inesperados en las condiciones de vida, como la fluctuación de la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Las bacterias dentro de una biopelícula pueden evadir las respuestas inmunes del hospedero y resistir los tratamientos antimicrobianos hasta 1000 veces más que sus contrapartes planctónicas (Brindhadevi et al., 2020).

P. aeruginosa forma biopelículas para colonizar e invadir tejidos y órganos. Una biopelícula es un arma resistente fundamental para que *P. aeruginosa* compita, sobreviva y domine el entorno polimicrobiano de la fibrosis quística pulmonar. *P. aeruginosa* también coloniza eficazmente una variedad de superficies, incluidos materiales médicos (catéteres urinarios, implantes, lentes de contacto, etc.) y equipos de la industria alimentaria (tanques de mezcla, cubas y tubos) (Soares et al., 2020). Por lo tanto, una mayor comprensión de la composición y estructura de la biopelícula, así como de los mecanismos moleculares subyacentes a la tolerancia antimicrobiana de las bacterias que crecen dentro de una biopelícula son vitales para el diseño de estrategias efectivas para manejar, prevenir y, lo que es más importante, erradicar las infecciones asociadas a la biopelícula (Schiessl et al., 2019).

P. aeruginosa es conocida por desarrollar biopelículas robustas que son altamente resistentes a los antibióticos, lo que afecta la eliminación bacteriana y conduce al establecimiento de infecciones crónicas altamente recalcitrantes que son un problema médico importante. Más del 50% de la matriz extracelular de *P. aeruginosa* está formada por tres exopolisacáridos (EPS): el alginato de polisacárido capsular y dos polisacáridos agregativos (Psl y Pel), pero también contiene ADN extracelular (eDNA) y proteínas. Las biopelículas al madurarse se caracterizan por estructuras en forma de hongo "tapadas" y una red compleja de canales que distribuyen nutrientes y oxígeno y eliminan los productos de desecho (Brindhadevi et al., 2020).

El desarrollo de biopelículas es multifactorial. La iniciación se produce con un aumento de c-di-GMP, un segundo mensajero intracelular que induce la biosíntesis de adhesinas y EPS y los cambios fisiológicos necesarios para pasar del crecimiento planctónico móvil a un estilo de vida sésil asociado a biopelículas (De Kievit, 2009). La secreción de varias enzimas extracelulares controladas por QS (esterasas, lipasas y elastasas) afecta la composición de EPS, las propiedades de la matriz extracelular y la motilidad celular, lo que influye en la formación y arquitectura de biopelículas mucoides de *P. aeruginosa* (Arana-Peña et al., 2020).

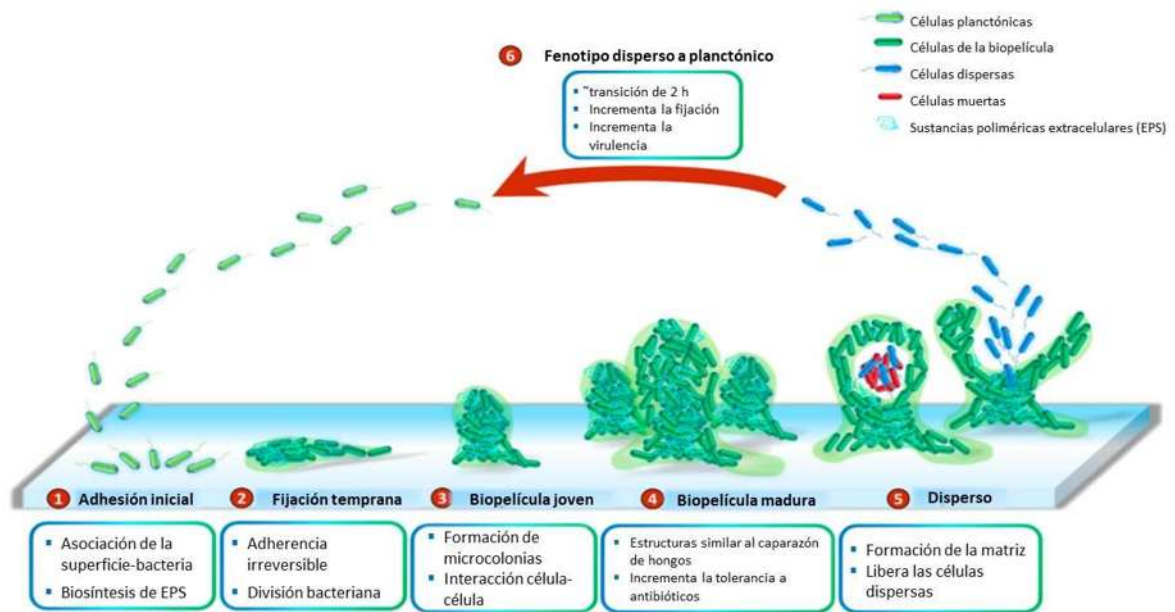


Figura 5. Ciclo de vida del desarrollo de las biopelículas producidas por *P. aeruginosa*.

Se divide en seis etapas: (1) las bacterias se asocian con la superficie y producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que incluyen proteínas, polisacáridos, lípidos y eDNA. A continuación, (2) tiene lugar la división celular y la transición de unión reversible a irreversible. Los siguientes pasos son la formación de microcolonias (3) y el posterior desarrollo de estas microcolonias en estructuras con forma de hongo (4). La interacción célula a célula y la producción de factores de virulencia juegan un papel esencial en la maduración y solidez de las biopelículas. Luego se forma la cavidad de la matriz en el centro de la microcolonia (5), a través de la autólisis celular para romper la matriz para la liberación de la población dispersa. Finalmente, (6) las células liberadas experimentan una transición

de aproximadamente 2 h a fenotipos planctónicos que posteriormente ocupan espacios no colonizados. Tomado y modificado de Thi. et.al., 2020.

La formación de biopelículas se da en 5 diferentes etapas (**Fig. 5**) (Moser et al., 2021; Thi et al., 2020):

- Etapa I: Forma planctónica. Las células bacterianas se adhieren a la superficie del hospedero a través del flagelo y sus pilis; sin embargo, esta adherencia puede ser reversible. Comienza la producción de sustancias extracelulares poliméricas (EPS), entre las cuales están, proteínas, polisacáridos, lípidos y eDNA. En esta etapa, aún no hay respuesta inmune por parte del hospedero.
- Etapa II. Microagregados/ microcolonias. La adherencia es irreversible, comienza la división bacteriana y la comunicación celular. Inicia la respuesta inmune innata del hospedero, en caso de que la bacteria sea patógena. En esta etapa, los antibióticos son efectivos.
- Etapa III. Biopelículas jóvenes. Autoproduce matriz extracelular. Produce agregados en tejidos o secreciones, como esputo. La bacteria se propaga progresivamente, con el fin de atacar al hospedero, a través de la arquitectura de las estructuras de las microcolonias. La respuesta inmune innata por parte del hospedero está activa. En esta etapa, comienza la tolerancia a los antibióticos.
- Etapa IV. Maduración de las biopelículas. Continúa la autoproducción de la matriz extracelular. Las microcolonias se desarrollan hasta alcanzar una forma tridimensional, creando estructuras similares al caparazón de los hongos. En esta etapa se pueden generar mutaciones y subclones, comienza la dispersión, incrementa el riesgo de que la infección se expanda, ocasiona daño a tejidos y por lo tanto, que exista una tolerancia y resistencia a los antibióticos. Asimismo, comienza la respuesta inmune adquirida. Se da una interacción célula a célula, produciendo factores de virulencia que juegan un papel esencial en la maduración y solidez de las biopelículas.
- Etapa V. Dispersión. En esta etapa, ocurre una persistente colonización, el crecimiento de la biopelícula puede bajar, pero existe un riesgo de volver a crecer, asimismo, comienza la etapa de inflamación, la cual puede continuar. Finalmente, las células liberadas experimentan una transición de aproximadamente 2 h a fenotipos planctónicos que posteriormente ocupan espacios no colonizados, por lo que, comienza nuevamente los estadios de las biopelículas.

Recientemente, se ha planteado la hipótesis de que el QS también puede controlar el paso de dispersión; de hecho, la formación de OMV inducida por quinolonas puede facilitar la dispersión celular. Finalmente, los ARN pequeños también regulan la formación de biopelículas. Es de destacar que un estudio reciente mostró que existen varias vías para desarrollar biopelículas y que la expresión de genes que regulan las respuestas al estrés y la adaptación a entornos limitados en oxígeno y hierro es vital para este proceso (Riquelme et al., 2020).

1.3. Quorum sensing

El quorum sensing (QS), o bien, la comunicación entre bacterias es fundamental para regular la expresión de varios genes, en respuesta a la densidad celular, lo que permite la comunicación entre células y la adaptación a los cambios ambientales. La producción de metabolitos secundarios activa factores de transcripción, los cuales, modulan y coordinan la expresión de genes del QS a través de comunidades de células. Se ha observado que la secreción y difusión de metabolitos secundarios de comunidades bacterianas influye en el crecimiento de comunidades adyacentes. El QS es un sistema de comunicación intercelular que es capaz de sensar la densidad poblacional. El sistema de QS está modulado por pequeñas moléculas de señalización; N-acilhomoserinlactona para las bacterias Gram negativas, oligopéptidos para bacterias Gram positivas, y autoinductores-2 (AI-2) para ambas clases de bacterias (Juhás, et.al., 2005). *P. aeruginosa* tiene cuatro sistemas QS (Las, Rhl, Pqs e Iqs) que están interconectados jerárquicamente: el sistema Las está en la parte superior de la jerarquía de señalización y controla positivamente la expresión de los otros tres sistemas. De manera similar, el sistema Iqs tiene un efecto estimulador sobre Pqs, y este sobre el sistema Rhl, mientras que Rhl regula negativamente Pqs. Esta red QS es altamente adaptable y capaz de responder a factores estresantes externos, proporcionando a *P. aeruginosa* una flexibilidad extraordinaria (**Fig. 6**) (Lee & Zhang, 2015).

1.3.1. Sistema Las y Rhl

LasR y Rhl representan los circuitos reguladores más dominantes. En el sistema Las, LasI es la sintasa autoinductora (AI) que media en la síntesis de N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (C12HSL). LasI se une al activador transcripcional (LasR), creando un complejo con formas multiméricas que regula específicamente la transcripción de genes de virulencia involucrados en infecciones agudas y daño de la célula hospedero (LasA, LasB, AprA, PVD y ETA). También induce la producción de la IA, creando un ciclo de

autorregulación positivo. El inhibidor de RsaL es responsable de la represión de la síntesis de LasI y C12HSL. El sistema Las también suprime la producción de exopolisacárido Pel, afecta la formación de T6SS junto con los sistemas Rhl y Pqs e induce la apoptosis en las células epiteliales de las vías respiratorias y degrada sus uniones estrechas. C12HSL también ayuda a la supervivencia bacteriana al producir la muerte de las células inmunitarias del hospedero. Es importante destacar que PYC y C12HSL aumentan el número de células persistentes en las poblaciones de *P. aeruginosa*, lo que puede ser responsable de la obstinación de las infecciones crónicas. De manera similar, RhII sintetiza la IA de este sistema, la N-butil-L-homoserina lactona (C4HSL), que forma un complejo con la proteína activadora (RhIR). Este circuito mejora principalmente la producción de RL, pero también de AprA, LasB, cianuro, PVD y PYC. También regula la producción de lectina LecA, lo que influye en la formación de biopelículas, y reprime los genes implicados en el ensamblaje y la función de T3SS (Ahator & Zhang, 2019; Bleves et al., 2010).

1.3.2. Sistema Quinolona: Pqs

P. aeruginosa produce numerosas alquil-4(1H)-quinolonas (AQ), incluida la 2-heptil-hidroxi-1H-quinolin-4-ona (PQS) y su precursor 2-heptil-4(1H)-quinolona (HHQ), el AQ más comúnmente asociado con QS. Son sintetizados por enzimas codificadas en grupos de genes *pqsABCDE*, *phnAB* y *pqsH*, y tanto PQS como HHQ son reconocidos por la proteína reguladora afín (PqsR o MvfR). Al igual que el sistema Las, el sistema Pqs crea un bucle de retroalimentación positiva que se une al promotor de *pqsABCDE*, lo que conduce a la producción de PqsE, el principal efector de virulencia del sistema de quinolonas. Esta proteína, junto con el sistema Rhl, está involucrada en la regulación de la síntesis de piocianina. Además, regula positivamente la expresión de genes relacionados con la falta de hierro, las bombas de expulsión involucradas en la resistencia a los antibióticos y la biosíntesis de cianuro de hidrógeno, RL, elastasa y quitinasa extracelular (Lin et al., 2018). Además, el sistema Pqs media en la liberación de eDNA, esencial para la creación de biopelículas estables y maduras. Además de ser una molécula de señalización de QS, PQS también actúa como mediador en la adquisición de hierro, la citotoxicidad y la biogénesis de OMV; suprime la secreción de IL-2 e IL-12; y estimula la quimiotaxis de neutrófilos, ROS y la generación de TNF- α (Ahator & Zhang, 2019; Kariminik et al., 2017)

1.3.3. Sistema QS: Iqs

Este sistema QS integrado se descubrió más recientemente y utiliza un nuevo tipo de molécula de señal: 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS). Hasta la fecha, se

desconoce su receptor afín. Además de monitorear la densidad bacteriana, Iqs también detecta la limitación de fosfato, un estrés común durante la infección, para regular la producción del factor de virulencia. Además, puede controlar parcialmente las funciones del sistema Las y, cuando se interrumpe, disminuye la producción de pirocianina, ramnolípido y elastinas. Finalmente, IQS inhibe el crecimiento de la célula hospedero y estimula la apoptosis de una manera dependiente de la dosis, lo que altera la reparación del daño del ADN del hospedero (Ahator & Zhang, 2019; Lee et al., 2013; Wang et al., 2014).

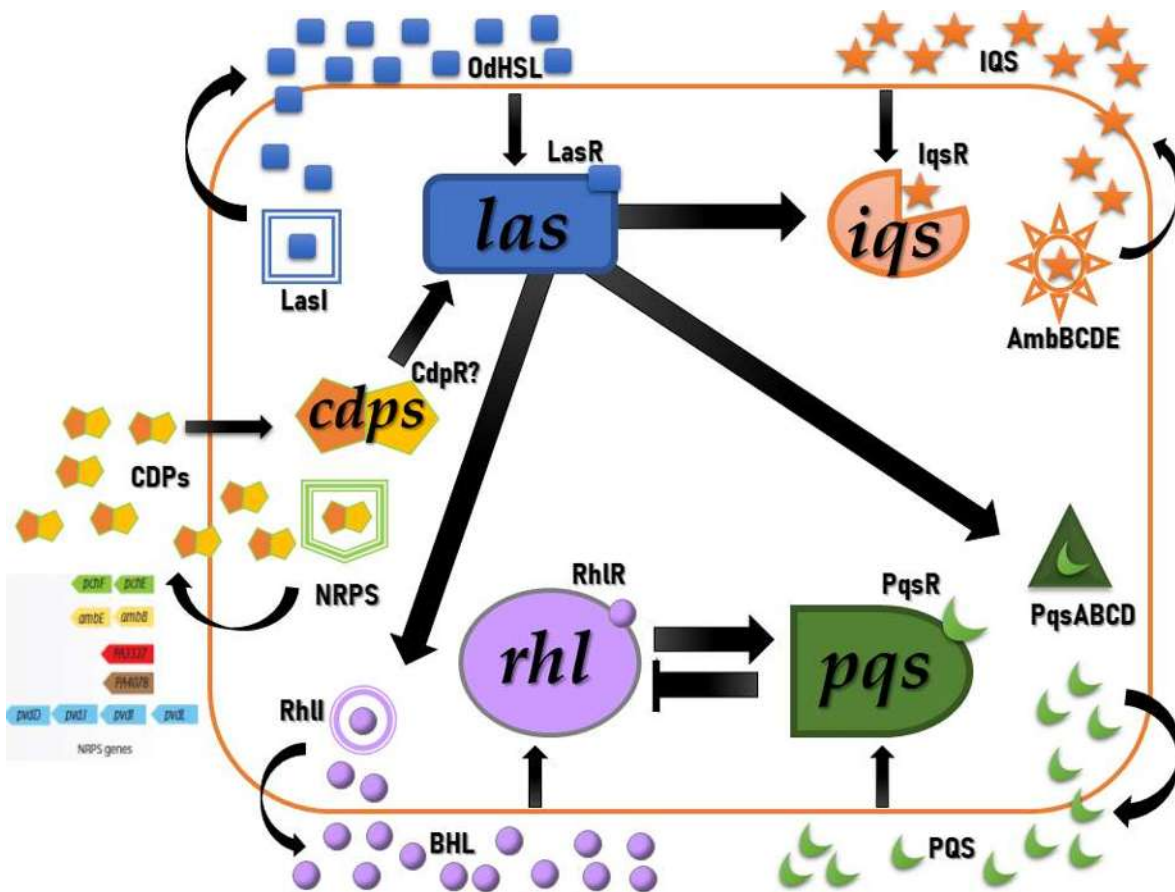


Figura 6. Quorum sensing en *P. aeruginosa*.

Se muestran los sistemas de comunicación jerárquica de *P. aeruginosa*. Modificado de Lee, & Zhang, 2015.

1.3.4. Ciclodipéptidos

Muchas bacterias dependen del QS para coordinar la producción de antibióticos y factores de virulencia, los organismos procariotas y eucariotas también podrían producir inhibidores químicos o enzimas que apagan el quórum para degradar las señales de QS o bloquear la señalización de QS para obtener ventajas competitivas (De Kievit, 2009). Esto ha impulsado la búsqueda de productos naturales que puedan interrumpir la señalización de QS y reducir la virulencia bacteriana como un medio para controlar la patogenicidad bacteriana (Smith & Iglewski, 2003). Dado que el mecanismo general de QS se basa en la percepción de señales químicas por parte de los reguladores de QS, cuando se alcanza un umbral mínimo de concentración estimulante para impulsar diversas actividades fisiológicas, la mayoría de los métodos de detección para nuevos agentes estimulantes o inhibidores de QS emplean construcciones de bioensayos dirigidos a QS mediante la incorporación de elementos genéticos, en el circuito de QS interactúan con estas moléculas para provocar una respuesta celular específica (Lee & Zhang, 2015) (Figura 6). Aprovechando este sistema, la construcción del bioensayo compuesta por el promotor luxR (de *V. fischeri*) y el operón estructural lux (luxCDABE de *Photorhabdus luminescens*), que emite luz en respuesta a las AHL exógenas, se utilizó para detectar e identificar nuevas moléculas de señalización (Higgins et al., 2018). Debido al repertorio de moléculas señalizadoras que activan los reguladores de la respuesta QS, se aplicaron procedimientos analíticos químicos adicionales que llevaron a la identificación de dos moléculas señalizadoras, ciclo(L-Ala-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), conocidas como dipéptidos cíclicos (CDPs). Estos CDP podrían activar los biosensores AHL basados en LuxR y basados en LasR en *E. coli*, pero en concentraciones mucho más altas que los activadores naturales 3OC6HSL y 3OC12HSL, respectivamente. Los estudios de competencia han mostrado que los dos CDP antagonizan la inducción de bioluminiscencia mediada por 3OC6HSL, lo que sugiere que pueden competir por el mismo sitio de unión en LuxR (Lee & Zhang, 2015). Un estudio más reciente identificó cuatro moléculas de CDP de los sobrenadantes de cultivo de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*: ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Leu), y ciclo(L-Pro-L-Phe), en este mismo estudio se determinó que la biosíntesis de CDPs está influenciada por unas pocas enzimas NRPS, y la mezcla de CDPs podría estimular el sistema de las últimas con un mecanismo desconocido (González et al., 2017). Estos sistemas de comunicación química interconectados son capaces de modular la fisiología bacteriana y la virulencia en respuesta a diversos cambios ambientales, incluida la dinámica de la densidad de población y el estrés por deficiencia de fosfato (Ahator & Zhang, 2019).

Los CDPs y sus derivados, las dicetopiperazinas (DKPs), constituyen una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos a las cuales se les ha encontrado diversas propiedades biológicas. Por ejemplo, los compuestos ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) actúan como antifúngicos (Ström et al., 2002). Por otra parte, la epipolítiodioxopiperazina muestra propiedades antitumorales, antibacterianas, antivirales e inmunosupresoras (Gu et al., 2013). Por otro lado, las dicetopiperazinas comprenden una importante familia de metabolitos secundarios que han sido durante mucho tiempo ignorados; sin embargo, recientemente se han sugerido como drogas. Por ejemplo, en cultivos de *Propionibacterium jensenii* se encontró que las DKPs actúan como componentes antifúngicos contra *Aspergillus fumigatus* (Ström, et al., 2002). Las dicetopiperazinas comprenden también ejemplos de antibióticos clásicos, uno de los ejemplos mejor conocidos es el producto natural biciclomicina, este es un antibiótico producido por *Streptomyces sapporonensis* y *S. aizunensis*, el cual posee baja toxicidad ($DL_{50} >4$ g/Kg en ratón), permitiendo su aplicación como una droga efectiva contra la diarrea en humanos, exhibiendo actividad en contra de un amplio espectro de bacterias Gram negativas, con excepción de especies de *Proteus* y *P. aeruginosa*, así como contra la bacteria Gram positiva *Micrococcus luteus* (P. de Carvalho & Abraham, 2012).

Por otra parte, el ciclo(L-Phe-L-Pro) aislado de *P. fluorescens* y *P. alcaligenes*, se ha reportado que está involucrado en mecanismos de percepción de quórum, los cuáles sincronizan respuestas fisiológicas bacterianas de una manera dependiente de la densidad celular; el hallazgo de éste mismo ciclodipéptido en *L. plantarum* sugiere la posibilidad de un entrecruzamiento entre sistemas de señalización de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Ström et al., 2002).

1.4. Péptido sintetasa no ribosomales (NRPS)

Las péptido sintetasa no ribosomales (NRPS) son responsables de la síntesis de fármacos de origen natural, entre los cuales destacan: los antibióticos como vancomicina, los anticancerígenos como la bleomicina, e inmunosupresores como la ciclosporina (Wyatt et al., 2013). Las NRPS son enzimas de alto peso molecular y son conformadas por múltiples módulos catalíticos independientes, donde cada módulo está constituido de un grupo de dominios. Para cada dominio de las NRPS se asigna una actividad, los distintos dominios son: dominio de adenilación (dominio A), el cual capta a los aminoácidos y los activa por adenilación usando ATP. El dominio de Tiolación (T) que une covalentemente el aminoácido al tiol del grupo prostético 4-fosfopanteína (también llamado dominio PCP) y transporta el aminoácido activado al dominio de condensación (dominio C), el cual cataliza

la formación de los dos enlaces peptídicos, y finalmente el dominio tipo tioesterasa (dominio Te) libera el péptido formado por la enzima NRPS (**Fig. 7**).

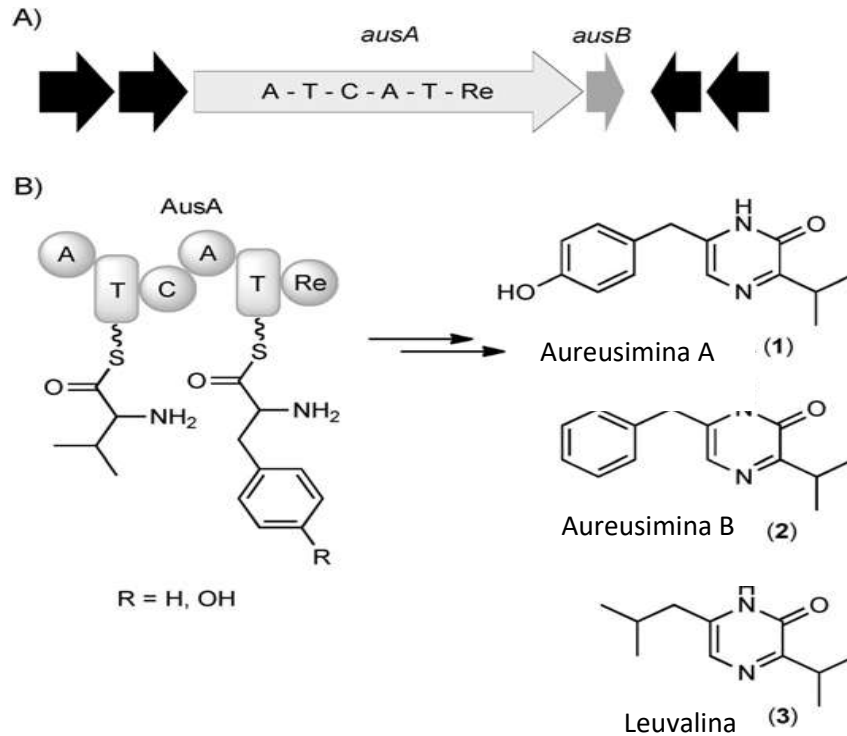


Figura 7. Biosíntesis de un ciclodipéptido mediante enzimas NRPS, el cual es un sistema dependiente de ATP para la activación de los aminoácidos.

Las enzimas tienen diferentes dominios, los cuales tienen actividades definidas para la formación de los ciclodipéptidos (**Gondry et al., 2018**)

1.4.1 Dominio de Adenilación (A)

El dominio de adenilación (~550 aa) es el primer dominio que interviene en la biosíntesis de péptidos no-ribosomales. El dominio de adenilación reconoce de manera específica y activa a los aminoácidos. Este dominio en primer lugar reconoce de manera específica el aminoácido de entre los substratos disponibles y en una segunda instancia activa el aminoácido como un aminoacil-adenilato. Posteriormente, el aminoacil-adenilato intermediario es transferido al grupo tiol del cofactor 4'-fosfopantoteína localizado en el dominio PCP (**Fig. 5**; Grünwald & Marahiel, 2006).

1.4.2 Dominio PCP

El dominio PCP (~ 80 aa) facilita el transporte ordenado de sustratos y la elongación intermedia de los centros catalíticos de todos los productos intermedios unidos covalente al grupo tiol del cofactor 4-fosfopanteína (ppan) del dominio T; lo cual facilita la canalización de sustratos por lo que se optimiza la eficiencia de la biosíntesis mediada por NRPS. Este dominio muestra un residuo de serina⁴⁵ que es el responsable de unión al cofactor ppan; el residuo se encuentra en uno de los brazos el cual está extendido y une a las dos primeras hélices de las cuatro que conforman el paquete de hélices del dominio PCP (**Fig. 8**; (Grünewald & Marahiel, 2006).

1.4.3 Dominio de condensación (C)

La formación del enlace peptídico en la biosíntesis de péptidos no-ribosomales está mediada por el dominio de condensación C (~ 450 aa). Este dominio cataliza el ataque nucleofílico del aminoácido unido río abajo al dominio PCP. La direccionalidad de este proceso es realizada por los sitios donador y receptor del dominio C por electrófilos y nucleófilos, respectivamente. Según el mecanismo de portación de múltiples tioésteres, el sitio del aceptor une el nucleófilo con alta afinidad hasta que el electrófilo entrante culmina el proceso de condensación (**Fig. 8**) (Grünewald & Marahiel, 2006).

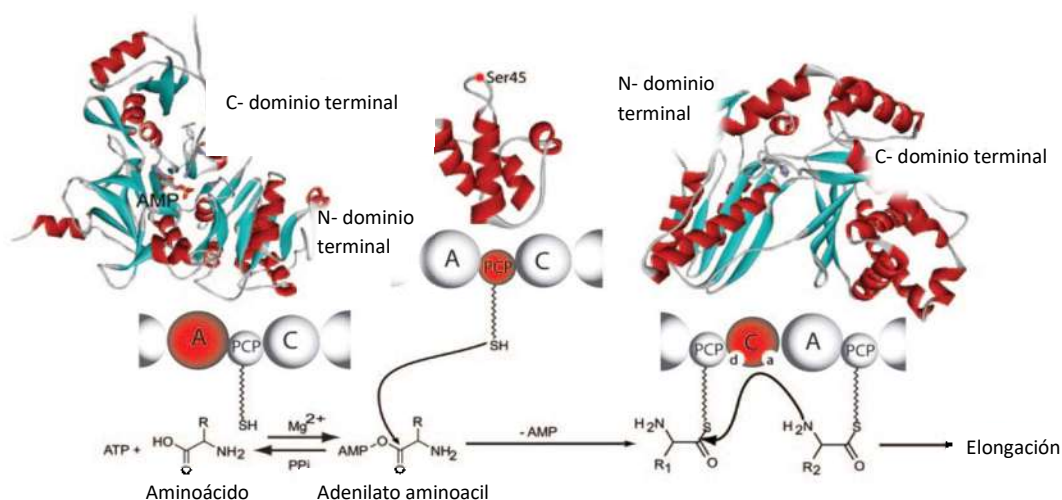


Figura 8. Formación del enlace peptídico.

Dominios de adenilación (A), dominio PCP y dominio de condensación (C) (Tomado de Grünewald y Marahiel, 2006).

1.4.4 Dominio Te y su participación en la ciclación

Los péptidos no-ribosomales van creciendo por la adición consecutiva de unidades monoméricas de aminoacilos activados. La cadena alargada se desplaza cada vez de arriba abajo en el dominio PCP durante la elongación de una cadena, una vez que la cadena peptídica alcanza su longitud final, ésta es liberada río abajo del dominio PCP, quedando la enzima libre para el siguiente ciclo de síntesis. Generalmente la terminación de la síntesis de péptidos por las NRPS es realizada por un dominio tioesterasa (dominio TE, 280 residuos), fusionado al extremo carboxilo terminal (C-terminal) del módulo. Este último dominio en la enzima utiliza en su sitio activo un residuo de serina como catalizador nucleofílico. La liberación del péptido se inicia por la transferencia de la cadena peptídica enlazado a la serina del sitio TE río abajo, para generar un producto intermediario del tipo acilo-O-TE (Grünewald & Marahiel, 2006).

La molécula intermediaria puede ser rota por una molécula de agua para producir un péptido lineal (un ejemplo es la vancomicina), o por acción de un nucleófilo interno, produciendo un ciclodipéptido como la daptomicina (**Fig. 9A**). Mientras que los dominios TE representan la solución más común para la liberación del péptido, se conocen estrategias alternativas. Por ejemplo, se propone al dominio C, involucrado en la síntesis de la ciclosporina, para la síntesis de ciclosporina 7, para catalizar la liberación del péptido por condensación (**Fig. 9B**). En un tercer ejemplo, la liberación del péptido puede ocurrir por reducción del grupo carboxilo mediada por el dominio de reducción (Dominio R) dependiente de NADPH de la NRPS; como ocurre en la síntesis del péptido lineal gramicidina A y en la formación de la lactona nostociclopéptido 8 (**Fig. 9C**) (Grünewald & Marahiel, 2006).

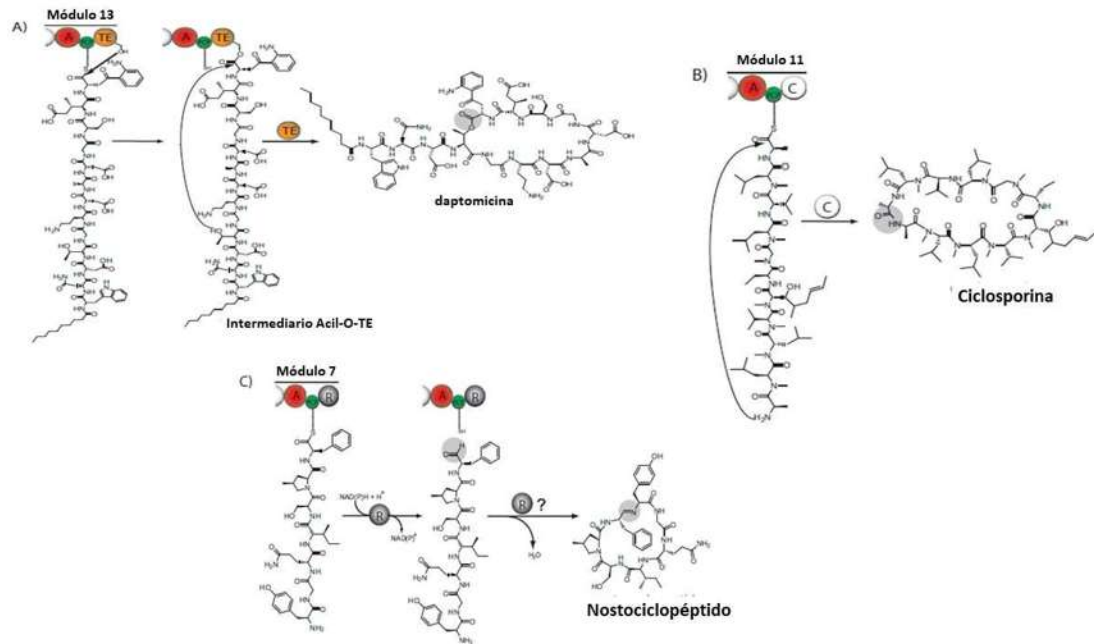


Figura 9. Mecanismo de liberación de los NRPS.

Liberación de los péptidos no-ribosomales por el dominio tipo tioesterasa (Te) y su intervención en la ciclación de los péptidos producidos. (Tomado de Grunewald y Marahiel, 2006).

1.4.5. NRPS de *P. aeruginosa* PAO1

En el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 se han encontrado NRPS, las cuales fueron identificadas mediante un alineamiento de la secuencia de aminoácidos usando el algoritmo blastp para comparar con la secuencia del gen *AusA* de *S. aureus*. Los resultados del alineamiento revelaron el dominio de adenilación (A) en cerca de los 55 putativos homólogos de los NRPS. Como se observa en la tabla 1, en el primer grupo, las proteínas PvdD, PvdJ, PvdI y PvdL están involucradas en la síntesis de pioverdina, y sus genes correspondientes están localizadas sobre dos diferentes pero adyacentes grupos de cromosomas la *P. aeruginosa* PAO1. Otro grupo de NRPS catalizan la síntesis de pioquelina, PchF y PchE. Un tercer grupo incluye proteínas AmbB y AmbE, asociadas con la biosíntesis de IQS con sus genes pertenecientes dentro del grupo AmbABCDE. Finalmente, dos proteínas hipotéticas con desconocidas funciones fueron catalogadas, las cuales se denominaron PA3327 y PA4078 por su ORF con 2352 aminoácidos (demostrando 2 multi-módulos) y 991 aminoácidos (con un multi-módulo) respectivamente. Interesantemente, las secuencias de PvdI y PvdL consisten en aprox. 5000 aminoácidos

(mostrando 4 multi-módulos cada uno); el PvdD, PvdJ y PA3327 con cerca de 2000 aminoácidos (con dos multi-módulos cada uno), y las proteínas pequeñas AmbE, AmbB, PchF, PchE y PA4078 con cerca de 1000 aminoácidos (mostrando un solo módulo) (González et al., 2017)

Tabla 1. Comparación de Dominios y porcentajes de identidad de NRPS proveniente de *S. aureus*.

ORF	Descripción	% id	Dominios	# módulos	# aa
AusA	Aureusimina Sintetasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)	-	C-Aa-T-C-X-Aa-T-R	2	2397
PA2302	AmbE, péptido sintetasa no ribosomal	24	A-MeT-T-C-Tio	1	2124
PA2305	AmbB, péptido sintetasa no ribosomal	30	C-T-A	1	1249
PA2424	PvdL, sintetasa L pioverdina	35	A-T-C-A-T-C-A-T-C-C-A-T	4	4342
PA2400	PvdJ, sintetasa J pioverdina	34	C-A-T-C-A-T	2	2157
PA2402	PvdI, sintetasa I pioverdina	36	C-A-T-C-C-A-T-C-A-T-C-C-A-T	4	5149
PA3327	probable péptido sintetasa no ribosomal	31	C-A-T-C-A-T-Tio	2	2352
PA4078	probable péptido sintetasa no ribosomal	32	A-T-NAD	1	951
PA4225	PchF, pioquelina sintetasa	26	C-A-T-Tio	1	1809
PA4226	PchE, ácido dihidroaeruginoso sintetasa	26	T-C-A-T	1	1438

Tabla 1. NRPS en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 evaluando el porcentaje de identidad, así como, los dominios, cantidad de módulos y número de aminoácidos contra el NRPS de Aureusimina Sintetasa perteneciente a *S. aureus* (Tomado de González et.al., 2017).

II. ANTECEDENTES

Anteriormente, se ha determinado que el sistema LasI/LasR modifica la producción de tres CDPs, ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), los cuales presentaron propiedades en la estimulación del crecimiento vegetal de *A. thaliana* (Castro et al., 2013; Ortiz-Castro et al., 2011, 2014). Sin embargo, existe poca información concerniente al mecanismo de biosíntesis en bacterias y su papel en la comunicación con las células de los hospederos. Aunque los CDPs son moléculas con notables propiedades bio-activas, existe poca información concerniente al mecanismo de biosíntesis en bacterias y su papel en la comunicación con las células de los hospedadores. Además, se ha demostrado que la producción de CDPs por *P. aeruginosa* dependen en gran parte por las péptido sintasas no ribosomales multi-modulares (MM-NRPS), las cuales pueden intervenir en el QS de la bacteria. En este mismo estudio, se encontró que aumentan *in vitro* los niveles de pirocianina, el cual es un factor de virulencia en *P. aeruginosa*, en cepas mutantes en el gen *pvdL*, el cual es un gen perteneciente a la síntesis de péptido sintasas no ribosomales (NRPS) (González et al., 2017)). Asimismo, se ha descrito que, en líneas celulares cancerosas, como HeLa y CaCo-2, la mezcla de ciclodipéptidos: Ciclo(L-Pro-L-Tyr), Ciclo(L-Pro-L-Val) y Ciclo(L-Pro-L-Phe), producidos por *P. aeruginosa* PAO1 promueven apoptosis (Vázquez-Rivera et al., 2015)).

No existen evidencias contundentes de que los CDPs funcionen en la naturaleza como verdaderas moléculas de señal tipo QS. Sin embargo, la mezcla de CDPs se ha descrito que en un rango de concentración de 2 a 100 μM inducen luminiscencia dependiente de LasR, a niveles similares al su autoinductor 3OC12HSL (González et al., 2017). Además de su asociación potencial con la comunicación célula-célula bacteriana de *P. aeruginosa*, varios artículos publicados recientemente revelaron el papel de los CDPs en las interacciones hospedero-patógeno. La mezcla de CDPs de *P. aeruginosa* descrita anteriormente puede desencadenar la apoptosis a una concentración tan baja como 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y promover la muerte celular de las líneas celulares humanas de manera dependiente de la dosis, con una IC50 de alrededor de 0.6 mg/mL . Además de la actividad de la combinación de CDPs, también se han documentado las actividades de los CDPs individuales. Ciclo(L-Pro-L-Phe) a una concentración final de 1 mM fue capaz de inducir daños en el ADN en células de mamíferos mediante la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (Hernández-Padilla et al., 2017). Estos hallazgos fueron validados aún más por los hallazgos de que los cuatro CDPs individuales purificados de *P. aeruginosa* inhibieron la proliferación de células HeLa al detener el ciclo celular en la transición G0-G1

con una LD50 a 60–250 μM , y este efecto implicó la inhibición de la vía de señalización P13K-Akt mTOR-S6k (Hernández-Padilla et al., 2017).

Una búsqueda exhaustiva en el genoma de *P. aeruginosa* con AusA y LgrA como secuencia de aminoácidos modelos, que son las péptido sintetas no ribosomales (NRPS) asociadas con la biosíntesis de CDPs en *S. aureus* y *Brevibacillus brevis*, respectivamente, reveló diez NRPS probables que podrían potencialmente ser involucradas en la biosíntesis de CDPs. Entre ellos se encontraban las proteínas hipotéticas PA3327 y PA4078 y las enzimas asociadas con la biosíntesis de pioverdina (PvdD, PvdJ, PvdI y PvdL), pioquelina (PchE y PchF) e IQS (AmbB y AmbE). Se han validado las funciones de algunos de estos NRPS putativos en la producción de CDPs. La mutación de *pchE* y *pchF* abolió la producción de ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Leu); sin embargo, su producción no se afectó en las mutantes de pioverdina. La mutante PA3327 produjo niveles bajos de ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo (L-Pro-L-Leu) en comparación con la cepa WT. Por el contrario, se demostró que las mutantes de *ambB* y *ambE* producían un nivel muy elevado de ciclo(L-Pro-L-Tyr), similar a las mutantes *pvdJ*, PA3327, PA4078 y *pchE*. Por el contrario, la eliminación de *pchF* redujo significativamente la producción de ciclo (L-Pro-L-Tyr). Dado que tanto PchE como PchF están involucradas en la biosíntesis de pioquelina, este efecto contrastante de las mutaciones de *pchE* y *pchF* en la producción de CDPs sugiere que es esencial determinar y distinguir las NRPS responsables de la síntesis de CDPs, de los responsables de la producción de señalización o regulación de vías relacionadas con la biosíntesis de CDPs (González et al., 2017).

En un reciente reporte, Solís-Ortiz et al., 2022, determinó que los CDPs de *P. aeruginosa* actúan como elicitores de la respuesta de defensa de *A. thaliana*, al “inmunizar” la planta se contrarrestan los efectos negativos de las mutantes patógenas de *P. aeruginosa* PAO1, los cuales se relacionan principalmente con ramnolípidos y piocianina, que son factores de virulencia importantes para la patogenicidad de la cepa PAO1.

III. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista en humanos, produce una gama de factores de virulencia en el proceso de patogenicidad. Se ha demostrado que las NRPS sintetizan CDPs, que funcionan como inductores en el quorum sensing, el cual está involucrado en el mecanismo de producción de factores de virulencia, que está directamente relacionado con la capacidad infectiva de la bacteria. El autoinductor del QS, la HSL(3O-C₁₂-HSL) causa la evasión por la bacteria *P. aeruginosa* de la respuesta inmune en pulmones de ratón infectados. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual los CDPs se relacionan con la virulencia y si éstos están involucrados con los mecanismos de evasión de la respuesta inmune en la interacción hospedero –patógeno.

IV. HIPÓTESIS

Los CDPs producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 actúan como factores de virulencia para evadir la respuesta inmune en el modelo de infección respiratoria de *Mus musculus*.

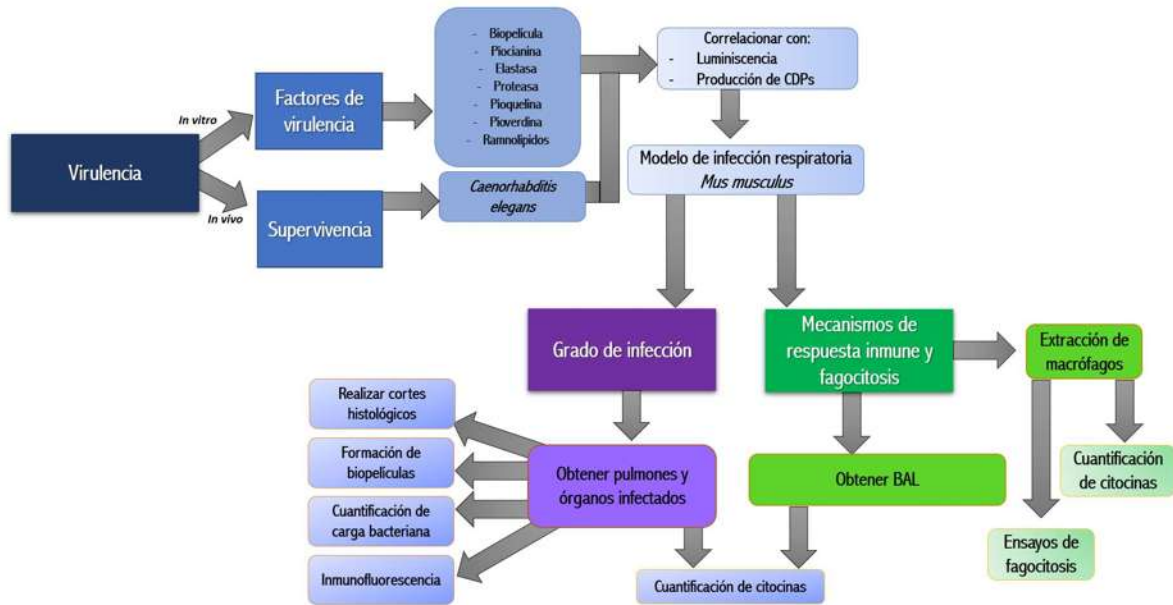
V. OBJETIVO GENERAL

Dilucidar el mecanismo involucrado en la virulencia y evasión de la respuesta inmune por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 dependiente de la producción de CDPs en un modelo de infección *in vivo*.

5.1 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 asociada a las NRPS.
- 2) Evaluar el mecanismo de invasión y colonización de *P. aeruginosa* PAO1 dependiente de la síntesis de las NRPS en un modelo de infección *in vivo*.
- 3) Determinar el efecto de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 en la respuesta inmune innata de *M. musculus*.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material Biológico

Tabla 2. Organismos utilizados en este estudio.

Organismos	Cepas	Características	Referencias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	WT	Cepa estándar de laboratorio	(Holloway, 1955)
	$\Delta lasI\Delta rhII$	doble mutante en $\Delta lasI$, $\Delta rhII$; Tc ^r	(Pearson et al., 1997)
	$\Delta ambB$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2305	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta ambE$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2302	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta pchE$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4226	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta PA3327$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA3327	(Jacobs et al., 2003)
	$\Delta PA4078$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4078	(Jacobs et al., 2003)
$\Delta ambB/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; PA2305::Gm ^r	(Solís Ortíz, 2017)	
$\Delta ambB/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; PA2305::Gm ^r	(Solís Ortíz, 2017)	

$\Delta ambB/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2305::Gm ^r
$\Delta ambB/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2305::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchF/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA4225::Gm ^r

$\Delta pchF/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA4225::Gm ^r
$\Delta pchF/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA4225::Gm ^r
$\Delta pvdI/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2402::Gm ^r
$\Delta pvdI/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2402::Gm ^r
$\Delta pvdI/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2402::Gm ^r
$\Delta pvdJ/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2400::Gm ^r
$\Delta pvdL/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2424::Gm ^r
$\Delta pvdL/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA2424::Gm ^r
$\Delta pvdL/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2424::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r

$\Delta PA3327/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA4078/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
$\Delta PA4078/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
$\Delta PA4078/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
$\Delta PA4078/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
$\Delta ambB/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutant in the ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA2305::Gm ^r
$\Delta ambB/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2305::Gm ^r
$\Delta ambB/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2305::Gm ^r
$\Delta ambB/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2305::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah (Solís Ortíz, 2017)

	ORF PA2402; PA2302::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta ambE/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2302::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchE/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA4226::Gm ^r
$\Delta pchF/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA4225::Gm ^r
$\Delta pchF/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA4225::Gm ^r
$\Delta pchF/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA4225::Gm ^r
$\Delta pvdI/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2402::Gm ^r

$\Delta pvdI/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2402::Gm ^r
$\Delta pvdI/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2402::Gm ^r
$\Delta pvdJ/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA2400::Gm ^r
$\Delta pvdL/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA2424::Gm ^r
$\Delta pvdL/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA2424::Gm ^r
$\Delta pvdL/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA2424::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pvdI$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pvdJ$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA3327/\Delta pvdL$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA3327::Gm ^r
$\Delta PA4078/\Delta pchF$	PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA4225; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r

		PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2402; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
		PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2400; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
		PAO1 transposón ISlacZ/hah mutante en el ORF PA2424; (Solís Ortíz, 2017) PA4078::Gm ^r
<i>Escherichia coli</i>	OP50	Cepa resistente a estreptomycin, auxótrofa a uracilo, usada como comida de nematodos.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	N2	Derivada de la cepa silvestre Bristol. Cepa estándar utilizada para investigación de <i>C. elegans</i> . (Brenner, 1974)
<i>Mus musculus</i>	BALB/c	Albinos, uso general, investigación inmunológica (producción de anticuerpos monoclonales, así como, hibridomas), defectos en desarrollo neuronal.

7.2. Medios de Cultivo

7.2.1. Medio LB

Medio utilizado para crecer *P. aeruginosa* y *E. coli* OP50, se preparó con 1% de peptona de caseína (Solbiosa), 0.5% de extracto de levadura (BD Bioxon), y 1% de cloruro de sodio (J.T. Baker). Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos.

7.2.2. Medio NGM (Nematode Growth Medium)

Medio utilizado para la obtención de *Caenorhabditis elegans*. Se preparó con 0.2% de cloruro de sodio (J.T. Baker), 0.4% de peptona de caseína (Solbiosa), 0.3% de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell), 0.05% de fosfato de potasio dibásico (Meyer), y 2% de agar (BD Bioxon). Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. Una vez a

temperatura ambiente se adicionó 1 mL de una solución de colesterol (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 100% (J.T. Baker).

7.3. Métodos

7.3.1. Condiciones de crecimiento de *P. aeruginosa*

Se inoculó en medio LB sólido, con su respectivo antibiótico como se describe en la Tabla 1, se incubaron la cepa WT, $\Delta lasI/\Delta rhII$, y las mutantes simples a 37°C. En cambio, las mutantes dobles se inocularon con su respectivo antibiótico a 30°C.

Los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* se obtuvieron del medio líquido LB después de 48 h de incubación a 120 rpm y 37°C. El sobrenadante libre de células se centrifugó a 12 000 rpm.

7.3.2. Crecimiento y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Para la preparación de la fuente de comida de *C. elegans*, se inoculó 1 mL de *E. coli* OP50 por mililitro de medio LB líquido, se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 24 h. Posteriormente se tomaron 500 μ L del precultivo de *E. coli*, el cual fue esparcido en cada caja Petri de 100x15 mm con medio NGM a utilizar; mientras que en cajas Petri de 60x15 mm se adicionaron 250 μ L del precultivo bacteriano antes descrito. Se incubaron a 30°C por 48 h hasta su crecimiento total. Para propagar *C. elegans* se transfirieron pequeñas partes de agar con al menos un nematodo a cada caja Petri, previamente crecidas con la cepa de *E. coli*, se dejó incubar por 3 días a 20°C hasta la fase adulta del nematodo.

7.3.3. Ensayos de Quorum sensing

El ensayo dependiente de AHL de QS se realizó utilizando la cepa reportera *E. coli* JM109 transformada en el plásmido pSB1075, que contiene la fusión transcripcional *plasRlasIRhII::luxCDABE*, y produce luminiscencia en respuesta a 3-oxo-C12-HSL. Se inoculó *E. coli* JM109 (pSB1075) y se dejó crecer toda la noche en medio líquido LB a 37°C con agitación. Luego, el cultivo se diluyó con medio LB nuevo para obtener una densidad óptica (DO) de 0.1 a 600 nm (OD₆₀₀) y se distribuyeron 200 μ L en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Se añadieron 10 nM del disolvente a los medios de crecimiento bacteriano y se incubaron durante 2 h. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de sobrenadantes de cultivo de *P. aeruginosa*, y se dejó incubando a 37°C con agitación constante. Tanto la OD₆₀₀ como la luminiscencia se determinaron usando un sistema de imágenes ChemiDoc MP (BioRad).

7.3.4. Extracción y caracterización de ciclodipéptidos

Aproximadamente, 2.5×10^6 UFC de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* se inocularon en 50 mL de LB, se incubaron durante 48 h a 37°C y en agitación constante (120 rpm). Los sobrenadantes libres de células fueron extraídos por centrifugación a 8500 rpm a 20-25°C durante 10 min. El sobrenadante resultante se extrajo dos veces con dos volúmenes de acetato de etilo suministrado con ácido acético (0,1 ml / L). Los extractos se evaporaron a sequedad a 60°C en campana. El residuo se disolvió en metanol, se concentró y se disolvió en 1 ml de metanol de alto rendimiento de cromatografía líquida (HPLC). La HPLC se realizó usando un detector de Photo Diode Array y una columna de HPLC Sephasil-Peptide C18, 12 μ 4.6 mm \times 250 mm (Amersham) de fase inversa para el análisis de la muestra. Las fracciones se eluyeron con agua / acetonitrilo, comenzando con una mezcla de solvente de equilibrio de 0: 100; seguido de un gradiente lineal de 60:40, con un flujo de 1 ml / min durante 15 min; finalmente, siguiendo con un retorno a 0: 100 mezcla de solventes por 3 min y una fase de equilibrio por 2 min. El agua desionizada y el acetonitrilo de grado HPLC se filtraron y desgasificaron. Los extractos se analizaron para la identificación de CDP por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (González et al., 2017). La cuantificación de CDP se evaluó midiendo las unidades de área mostradas en cromatogramas, obtenidas del análisis de HPLC.

7.3.5. Determinación de factores de virulencia

7.3.5.1. Biopelículas

Los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* se ajustaron a la densidad a $OD_{600} = 0.1$ con LB. Se distribuyeron alícuotas de 100 μ L de cultivos diluidos en placas de microtitulación de 96 pozos, incubados a 30°C durante 48 h. La cuantificación se realizó tiñendo la placa de 96 pozos con cristal violeta y midiendo la densidad óptica de todas las muestras en placa a 550 nm (Coffey & Anderson, 2014).

7.3.5.2. Elastasa

La determinación de elastasa se realizó con el ensayo Elastin Congo Red (ECR), a 250 μ L de los sobrenadantes se les adicionó 10 mg de ECR, se disolvieron en 0.1 M Tris-HCl y 1 mM CaCl₂, pH 7, y se incubaron durante 16 h a 37°C, con agitación constante. La ECR restante se eliminó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 5 minutos, y la absorbancia del sobrenadante se midió a 495 nm en un espectrofotómetro (Köhler et al., 2010).

7.3.5.3. Piocianina

Se mezcló 1 mL del sobrenadante con 1 mL de cloroformo en agitación constante, se dejó reposar por 5 minutos y se obtuvo la fracción orgánica. Esta fracción orgánica fue mezclada con 1 ml de HCl 0,2 N. La fracción orgánica se separó y la absorbancia se midió a 520 nm para la determinación de piocianina (Ortiz-Castro et al., 2014).

7.3.5.4. Proteasa alcalina

Las cepas de *P. aeruginosa* fueron ajustadas a una DO_{600} de 0.1, se cultivaron a 37°C durante 48 h en el medio de sales de extracto de levadura (YES) descrito previamente por (Crabbe et al., 1994). Para este medio se prepararon tres soluciones madre: solución A (50x), 50 g de K_2HPO_4 y 25 g de KH_2PO_4 por litro; Solución B (100x) 50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro y Solución C (1000x) 1.0 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 14 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 11 mg $ZnCl_2$, 20 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 13 mg $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$ y 75 mg $FeCl_3 \cdot 500 \cdot 6H_2O$. Las soluciones B y C se filtraron y esterilizaron y se almacenaron a temperatura ambiente. La solución A se diluyó 1:50 con agua destilada y se complementó con 0.4 g de NH_4Cl , 4.0 g de gelatina y 20 mg de extracto de levadura por litro y se esterilizó en autoclave y se enfrió. La solución B (10 ml / L) y la solución C (1.0 ml / L) se agregaron para completar el medio SI y se agregaron 15 g / L de agar; el pH final fue de 7.2 (Mueller et al., 1999). Para la determinación de la actividad de la haloproteasa, la tinción se realizó en placas con azul de Coomassie (0.1%) en ácido acético-metanol (3: 1) durante 30 minutos. Más tarde, cada placa se lavó con solución de ácido acético (10%), metanol (50%) y H_2O (40%). El halo transparente alrededor de la colonia indica la hidrólisis de la proteína, que se midió.

7.3.5.5. Ramnolípidos

Para la extracción de ramnolípidos se utilizó 1 ml de los sobrenadantes libres de células acidificado a pH 2.0 con HCl 6N, después se centrifugó durante 15 minutos a 10 000 rpm; el sedimento se disolvió en 300 μ l y se agregaron 600 μ l de cloroformo / metanol (2: 1). La mezcla se agitó 10 min, posteriormente se dejaron reposar, para que las fases se separaran, se recolectó la fase orgánica y se llevaron a evaporar. Los ramnolípidos obtenidos se disolvieron en 100 μ L de agua destilada. La cuantificación indirecta se realizó utilizando el método de orcinol por cuantificación de la ramnosa. Se añadió solución de orcinol (0.19% en H_2SO_4 al 53%) y se colocaron en un baño de agua durante 30 minutos a 80°C. Una vez que las muestras fueron atemperadas, la absorbancia de la solución fue medida a una longitud de onda de 426 nm y la concentración se calculó reemplazando los

valores en la curva estándar de ramnosa basada en el estudio de Marchant y Banat (Çakmak et al., 2017).

7.3.5.6. Pioquelina

Se utilizaron 5 mL de sobrenadante de las diferentes cepas de *P. aeruginosa*, los cuales fueron acidificados con ácido cítrico hasta un pH de 3.0. Se colocó 1 mL de CH₂Cl₂, recolectando y evaporando las fases orgánicas. La pioquelina se aísla como un aceite, por lo cual se diluyeron con 1 mL de la siguiente solución: metanol (80%) - H₂O (20%). Se midió la absorbancia de la mezcla obtenida a 313 nm y la cuantificación se realizó siguiendo la ley de Beer-Lambert, el coeficiente de extinción molar (ϵ) de PCH es 4 900 M⁻¹ cm⁻¹ en MeOH / H₂O (Hoegy et al., 2014).

7.3.5.7. Pioverdina

Se utilizaron 100 μ L del sobrenadante libre de células con 900 μ L de una solución tampón de piridina-ácido acético 50 mM, pH 5.0, se mezcló la solución y se midió a 380 nm. La cuantificación de pioverdina se realizó de acuerdo con la ley de Beer-Lambert, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar (ϵ) de PVD es 16500 M⁻¹ cm⁻¹ en Pyr / AcOH 50 mM buffer ph 5.0 (Hoegy et al., 2014).

7.3.5.8. Lipopolisacáridos

Se utilizaron los concentrados celulares de 15 mL de medio LB de cada una de las cepas de *P. aeruginosa*, incubadas durante 48 h a 37°C a 150 rpm. Una vez obtenidos se lavaron cuatro veces con PBS pH 7.4, centrifugando a 8500 rpm por 5 minutos. El LPS se extrajo por el método de cloroformo-metanol según (Mirzaei et al., s/f). El concentrado celular se resuspendió en 2 mL de etanol al 95% y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el sedimento se lavó con etanol al 95%, tres veces. El sedimento se llevó a sequedad, se resuspendió en 1 mL de EDTA al 10% y se sonicó. Se añadió 1 mL de metanol-cloroformo (1: 2), se agitó durante 2 h y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Se formaron 3 fases, se tomaron la fase superior (metanol) y la fase inferior (cloroformo) y se llevaron hasta sequedad por evaporación a 60°C.

Para la cuantificación de LPS, se midieron los polisacáridos de la superficie por el método colorimétrico de ácido sulfúrico-fenol (Brimacombe & Beatty, 2013). Utilizando como estándares de azúcar, una mezcla 50:50 de sacarosa y fructosa diluida de un stock de concentración conocida. Las células se resuspendieron en 1 mL de EDTA 50 mM. Se utilizaron 20 μ L de LPS resuspendido mezclado con 180 μ L de fenol al 5% en un tubo de

vidrio para la cuantificación de carbohidratos colorimétricos con fenol- ácido sulfúrico. Se añadió 1 mL de ácido sulfúrico y se mezcló hasta homogeneidad, después de 10 minutos presentó un tipo de coloración café. Posteriormente, se midió la intensidad de color a 490 nm en un espectrofotómetro y estos datos se correlacionaron con la curva obtenida con los estándares de carbohidratos de concentraciones conocidas.

7.3.6. Ensayos de virulencia con *Caenorhabditis elegans*

Se transfirieron 1 mL de los distintos sobrenadantes de cultivos previamente crecidos de *M. circinelloides*, a cada uno de los pozos de placas de 24 pozos (Corning). Mediante la observación en un microscopio estereoscopio (Leica MZ75) los nematodos (10-20) fueron transferidos con un “picker” a cada uno de los pozos utilizados. Para los ensayos de virulencia con sobrenadantes de las distintas cepas de *P. aeruginosa*, se colocaron 1 mL del medio del cultivo crecido a 24 y 48 horas, y posteriormente, se colocaron de 10 a 20 nematodos por pozo. En todos los ensayos de virulencia los nematodos fueron observados mediante un microscopio estereoscópico cada 12 h por un tiempo no mayor a 48 h. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo fue cuando éste permaneció inmóvil a la estimulación física.

7.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se usó el programa STATISTICA 7. Además, la prueba post hoc empleada fue Tukey para determinar la participación de las mutantes en NRPS, las diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) se muestran con asteriscos. Para los ensayos de virulencia, la significancia de datos de tasa de mortalidad fue evaluada usando curvas de supervivencia Kaplan-Meier con el software de estadística PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

VIII. RESULTADOS

Capítulo 1. Los resultados obtenidos en esta tesis se encuentran en el artículo:

Díaz-Pérez, S. P., Solís, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., & Campos-García, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*, 1-15.



Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation

Sharel Pamela Díaz-Pérez¹ · Christian Said Solis¹ · Jesús Salvador López-Bucio² · Juan J. Valdez Alarcón³ · Javier Villegas⁴ · Homero Reyes-De la Cruz² · Jesús Campos-García¹

Received: 9 December 2021 / Accepted: 29 July 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium for humans, animals, and plants, through producing different molecular factors such as biofilm, siderophores, and other virulence factors which favor bacterial establishment and infection in the host. In *P. aeruginosa* PAO1, the production of these factors is regulated by the bacterial quorum sensing (QS) mechanisms. From them, siderophores are involved in iron acquisition, transport, and homeostasis. They are also considered some of the main virulence factors in *P. aeruginosa*; however, detailed mechanisms to induce bacterial pathogenesis are poorly understood. In this work, through reverse genetics, we evaluated the function of bacterial pathogenesis in the *pvd* cluster genes, which are required for synthesizing the siderophore pyoverdine (PVD). Single *pvdI*, *pvdJ*, *pvdL*, and double mutant strains were analyzed, and contrary to expected, the *pvdL* and *pvdI* mutations increased the concentration of PVD and other phenazines, such as pyocyanin (PYO) and phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and also an increased biofilm production and morphology depending on the autoinducer 2-alkyl-4-quinolone (PQS) and the QS molecules acyl-homoserine lactones. Consequently, in the in vivo pathogenicity model of *Caenorhabditis elegans*, the mutations in *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* increased the survival of the worms exposed to supernatants or biofilms of the bacterial cultures. However, the double mutant *pvdI/pvdJ* increased its toxicity in agreeing with the biofilm production, PVD, PYO, and PCA. The findings indicate that the mutations in *pvd* genes encode non-ribosomal peptide synthetases impacted the biofilm's structure, but suppressively also of the phenazines, confirming that the siderophores contribute to the bacterial establishment and pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1.

Keywords Non-ribosomal peptide synthetases · *Pseudomonas aeruginosa* · Quorum sensing · Biofilm · Siderophores · Pyoverdine · Pyocyanin

✉ Jesús Campos-García
jesus.campos@umich.mx

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

² Laboratorio de Control Traduccional, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

³ Centro de Estudios Multidisciplinarios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, México

⁴ Laboratorio de Interacción Suelo, Planta, Microorganismo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic, pathogenic bacterium that causes pneumonia [1], sepsis [2], and other acute infections that commonly affect immunocompromised patients [3]. QS is a cell-to-cell communication system that uses signal molecules (autoinducers) to enable hierarchical signaling networks [4] and coordinate diverse physiological processes the bacterial density through modulating a vast number of genes that drive the production of proteases, elastase, exotoxins, rhamnolipids, pyocyanin, hydrogen cyanide, and some of the considered as virulence factors and also oxidative stress and antibiotic resistance, motility, and biofilm formation; additionally, the QS systems regulate immune response evasion in humans and animals [5,

6]. *Pseudomonas aeruginosa* possesses at least four functional QS circuits, two of them are mediated by N-acyl-homoserine lactones (HSL) known as *Las* and *Rhl*, and two are mediated by quinolones and carbaldehyde called *Pqs* and *Iqs* QS systems, respectively [7]. The autoinducers of *Las* and *Rhl* systems are *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) and *N*-butanoyl-*L*-homoserine lactone (C4-HSL), which are synthesized by the *LasI* and *RhlI* acyl-*L*-homoserine lactone synthetases, respectively [6, 8, 9]. The *Pqs*-QS system involves the participation of 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1*H*)-quinolone (PQS), 2-heptyl-4-hydroxyquinoline (HHQ), and 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide (HQNO) autoinducers that are synthesized by the enzymes encoded in the *pqsABCDHR* gene cluster. Both QS systems link signal transduction to LysR-type transcription regulators, *LasR*, *RhlR*, and *PqsR*, which specifically respond to the cognate signal molecules [6, 10, 11]. Lastly, the *Iqs* system is defined by the 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde signaling molecule (IQS, also known as aeruginaldehyde and its down-product, the dihydroaeruginone, Dha), which is synthesized by the enzymes from the *ambBCDE* gene cluster [5, 6, 12]. The *Iqs* system by *IqsR* protein regulates the *Pqs* QS-system into the *PqsR* transcriptional regulator and, consequently, acts on the *RhlR* regulator from the *Rhl* QS-system.

Biofilms are complex, robust structures resulting from organized social communities of microorganisms connected to a surface constituted by an extracellular polymeric matrix (polysaccharides, lipids, proteins, and extracellular DNA) and are different from planktonic bacterial cells, which typically form heterogenic communities with a high cell density that respond coordinately and modulate gene expression and physiological activities [13]. Biofilms allow the microorganisms to resist antibiotics, oxidative stress, nutrient deprivation, and evading the host's immune responses, which is an essential factor in bacterial colonization and pathogenesis [14–16]. In *P. aeruginosa*, a biofilm is commonly associated with chronic infections; it contains extracellular molecules such as cyanide, rhamnolipids, elastase, pyocyanin, and siderophores regulated through QS systems [13, 16, 17].

Likewise, the production of siderophores, such as pyoverdine — a fluorescent peptide-siderophore — is essential for iron acquisition and biofilm formation at the infection site [17]. At least 60 different pyoverdine molecules produced by diverse *Pseudomonas* strains have been chemically characterized; they consist of a dihydroquinoline-type chromophore linked to a peptide (sequences strain-specific) [18].

Pyoverdine biosynthesis in *P. aeruginosa* and fluorescent *Pseudomonads* is a complex process involving the *pvd* gene cluster. At least 12 different gene products have been described; the resulting proteins allow the production of more than 60 different pyoverdines [18, 19]. The *Pseudomonas* pyoverdines share the structure of the

chromofluorophore ((1*S*)-5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1*H*-pyrimido-[1,2-*a*]quinoline-1-carboxylic acid) but differ in the attached strain-specific peptide chain which is synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) [18, 19]. The pyoverdine synthesis involves first the biosynthesis by the siderosome at the cytoplasmic level, participating the NRPS *PvdL*, *PvdI*, *PvdJ*, and *PvdD*, also with the other enzymes such as *PvdH*, *PvdF*, and *PvdA*. After the siderophores are produced, they are transported to the periplasm space, where they are modified and finally exported out of the bacterial cell by a complex mechanism of secretion or recycling to iron acquisition where multiple proteins participate (*PvdE*, *PvdQ*, *PvdP*, *PvdO*, *PvdN*, *PvdT*, *PvdR*, *OpmQ*, *FpvA*, *FpvC*, *FpvF*, *FpvR*, *FpvI*, *PvdS*, etc.) [18].

Despite that, it has been demonstrated that the siderophores synthesized by the NRPS play essential roles in cell–cell communication and biofilm formation, which regulates the infective and colonization capacity of the bacterium on the host poorly understood. There is controversy about the role of the *pvd* genes in *P. aeruginosa*. Some studies suggest that it is crucial in establishing and maintaining bacterial infection. In contrast, other studies indicate that the *pvd* genes are dispensable in producing pyoverdine [20].

This study aimed to characterize the effect of mutation on NRPS encoded in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* genes, which have been involved in the synthesis of pyoverdine siderophores, a range of virulence factors production also as in the biofilm production/structure, and pathogenesis of the *P. aeruginosa* bacteria.

Methods

Bacterial Strains

The mutant strains used in this study were derived from the *P. aeruginosa* PAO1 (Table 1). All strains were grown in Luria–Bertani (LB) with their respective antibiotics. *Escherichia coli* JM109 (pSB1075) was added to 100 µg/mL of ampicillin. For *P. aeruginosa*, 200 µg/mL streptomycin, 60 µg/mL tetracycline, and 50 µg/mL gentamicin were used.

Mutagenesis Procedure

Mutants were constructed using triparental conjugation as previously described [26]. Using the *P. aeruginosa* PAO1 wild-type strain and the single mutants, the pRK2013 helper plasmid and the *Escherichia coli* S17.1 strain containing the respective plasmids pK*pvdI*::*Gm^R*, pK*pvdJ*::*Gm^R*, and pK*pvdL*::*Gm^R*, whose plasmids contain the *pvdI*, *pvdJ*, or *pvdL* genes, interrupted with a gentamycin resistance cassette (Table 1). Bacterial transconjugants were selected from

Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated is Dependent on the Pyoverdine...**Table 1** Strains and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or references
Strains		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1SM	Spontaneous streptomycin resistant mutant derived from PAO1 strain	[21]
<i>Nasl/rhlI</i>	Double mutant in the <i>lasI</i> and <i>rhlI</i> genes derived from <i>P. aeruginosa</i> PAO1	[22]
<i>ΔpvdI</i>	PAO1::ISlacZ/hah, Tc ^R , transposon insertion in ORF PA2402, Tc ^R	[23]
<i>ΔpvdJ</i>	PAO1::ISlacZ/hah, Tc ^R , transposon insertion in ORF PA2400, Tc ^R	[23]
<i>ΔpvdL</i>	PAO1::ISlacZ/hah, Tc ^R , transposon insertion in ORF PA2424, Tc ^R	[23]
<i>ΔpvdIΔpvdJ</i>	Double mutant strain derived from <i>ΔpvdI</i> , mutated with the pKpvdJ::Gm ^R plasmid, Tc ^R ,Gm ^R	This study
<i>ΔpvdIΔpvdL</i>	Double mutant strain derived from <i>ΔpvdI</i> , mutated with the pKpvdL::Gm ^R plasmid, Tc ^R ,Gm ^R	This study
<i>ΔpvdLΔpvdJ</i>	Double mutant strain derived from <i>ΔpvdL</i> , mutated with the pKpvdJ::Gm ^R plasmid, Tc ^R ,Gm ^R	This study
Plasmids		
pGEM-T	Plasmid used for PCR fragments cloning; Ap ^R	Invitrogen
pGpvdI	pGEM-T easy with 1.1 kbp DNA fragment containing <i>pvdI</i> from PAO1, disrupted with a gentamycin resistance cassette (900 bp) ligated into <i>Sall</i> site of <i>pvdI</i> gene	This work
pGpvdJ	pGEM-T easy with 1.1 kbp DNA fragment containing <i>pvdJ</i> from PAO1, disrupted with a gentamycin resistance cassette (900 bp) ligated into <i>XhoI</i> site of <i>pvdJ</i> gene	This work
pGpvdL	pGEM-T easy with 1.1 kbp DNA fragment containing <i>pvdL</i> , from PAO1, disrupted with a gentamycin resistance cassette (900 bp) ligated into <i>XhoI</i> site of <i>pvdL</i> gene	This work
pKOK4	pBR325 derived mob + plasmid; Tc ^R , Ap ^R , Cm ^R	[24]
pRK2013	Conjugation helper plasmid, Tra, ColE1 replicon; Km ^R	[25]
pKpvdI::Gm ^R	pKOK4 with <i>EcoRI</i> fragment containing <i>pvdI</i> ::Gm ^R from pGpvdI	This work
pKpvdJ::Gm ^R	pKOK4 with <i>EcoRI</i> fragment containing <i>pvdJ</i> ::Gm ^R from pGpvdJ	This work
pKpvdL::Gm ^R	pKOK4 with <i>EcoRI</i> fragment containing <i>pvdL</i> ::Gm ^R from pGpvdL	This work

plates with the appropriate antibiotics and submitted to PCR for characterization.

Quorum Sensing Assay

The QS AHL-dependent assay was performed using the *E. coli* JM109 reporter strain transformed in the pSB1075 plasmid, which contains the transcriptional fusion *placRlasIRhlI::luxCDABE* and produces luminescence in response to 3-oxo-C12-HSL [27]. *E. coli* JM109 (pSB1075) was grown overnight in LB liquid medium at 37 °C with shaking. The culture was diluted with fresh LB medium to obtain an optical density (OD) of 0.1 at 600 nm (OD600), 200 μL of cultures were distributed in each well of a 96-well culture plate and incubated for 2 h at 37 °C. Subsequently, 50 μL of cell-free supernatants of *P. aeruginosa* cultures was added to each well and incubated at 37 °C with slight shaking. The OD600 and luminescence were determined on the 96-well culture plates using a ChemiDoc MP imaging system (BioRad) [28].

Determination of Virulence Factors

Biofilm

Cultures of *P. aeruginosa* strains were adjusted to an optic density (O.D.) at 600 nm = 0.1 with LB; 100 μL aliquots of

diluted cultures were collocated into 96-well culture plates and incubated at 37 °C for 48 h. Biofilm was quantified by dyeing the 96-well plate with violet crystal, and spectrophotometric absorbance was measured at 550 nm [29]. Protein content in biofilm was determined by the Bradford method (Biorad).

eDNA

eDNA was extracted from biofilms collected from 24-well culture plates, suspended in water, mixed with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and after with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). The aqueous phase was mixed with three volumes of isopropanol and 1/10 volume of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and stored at -20 °C for 18 h to precipitation. The eDNA was collected by centrifugation (13,000 × g for 20 min at 4 °C) and washed three times with 70% ethanol, air-dried, and then dissolved in 10 μL of TE buffer (Tris HCl/1 mM EDTA, pH 8.0). The amount of eDNA was determined at UV 260 nm using a spectrophotometer [30].

Elastase

Elastase determination was carried out using the Elastin Congo Red assay (ECR) [31]. 250 μL samples of cell-free

supernatants were treated with 10 mg of ECR; the samples were dissolved in 0.1 M Tris-HCl and 1 mM CaCl₂ at pH 7. The samples were incubated for 16 h at 37 °C with light shaking. The remaining ECR was eliminated by centrifugation at 10,000 × g for 5 min, and the absorbance of supernatants was measured at 495 nm in a spectrophotometer.

Pyocyanin

One milliliter of the cell-free supernatant was mixed with 1 mL of chloroform, and the organic fraction was collected and mixed with 1 mL 0.2 N HCl. The organic fraction was then separated, and the absorbance was measured at 520 nm in a spectrophotometer [28].

Alkaline protease

Cultures of *P. aeruginosa* strains were adjusted to OD₆₀₀ = 0.1 in yeast extract salts (YES) medium and incubated at 37 °C for 48 h. Protease activity was determined by protein halo degradation after staining plates with Coomassie blue (0.1%) in acetic acid-methanol (3:1) for 30 min. Later, dishes were washed with acetic acid (10%), methanol (50%), and distilled H₂O. A transparent halo around the bacterial colony indicates the protein hydrolysis, which was measured using a ruler.

Rhamnolipids

Cell-free supernatants obtained from cultures of *P. aeruginosa* strains grown at 37 °C for 48 h were used to quantify rhamnolipids using the orcinol method rhamnose based on a standard curve of rhamnose measuring absorbance at 545 nm in a spectrophotometer [32].

Pyochelin

Five milliliters of cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains cultures was adjusted pH to 3.0 with citric acid and extracted by adding 1 mL of chloroform. Then, the organic phase was collected and evaporated. Pyochelin was dissolved with 1 mL of methanol 80%, and the absorbance was measured at 313 nm; quantification was performed using the molar extinction coefficient (E) for pyochelin 4900 M⁻¹ cm⁻¹ in MeOH/H₂O [33].

Pyoverdine

Cell-free supernatants (100 µL) of the *P. aeruginosa* strains cultures were added with 900 µL of a pyridine/acetic acid solution (pyridine 50 mM, acetic acid 50 mM, pH 5.0) and mixed. Absorbance was measured spectrophotometrically at 380 nm, and quantification was performed using the molar

extinction coefficient (E) of pyoverdine 16,500 M⁻¹ cm⁻¹ [33].

Cyclodipeptides

P. aeruginosa PAO1 strains were grown in 20 mL of LB medium at 37 °C by 48 h with 150 rpm shaking. Cyclodipeptides from cell-free supernatants were extracted with acidified ethyl acetate solvent, evaporated in a rotavapor at 60 °C, and dissolved in methanol. Samples were analyzed by HPLC and GC-MS as previously described [28, 34].

Survival Assays using *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans Bristol N2 worms (provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota) were synchronized by hypochlorite isolation of eggs from gravid adults [35]. L1 larvae were transferred onto nematode growth medium plates seeded with the *E. coli* OP50 strain grown on the plates as a food source. The larvae were incubated at 18 °C for 4–5 days until they reached the young adult phase. Worms were incubated with a cell-free medium collected from bacterial cultures of PAO1 strains grown for 48 h in LB medium or biofilm. For each experiment, 20–30 worms were incubated at 25 °C and scored for life at 6, 12, 24, and 48 h. For statistical purposes, at least three replicates per trial were carried out. *C. elegans* worms were considered dead when they stopped moving and did not respond to a nudge with a platinum wire. The fluorescence microscopy images were taken using a fluorescent and phase-contrast inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) with PlanFluor 4×, 10× dry lenses, and an AmScope ML300 3.1 MP digital color camera.

Microscopy and image acquisition of biofilm structures

Cultures of *P. aeruginosa* PAO1 strains were adjusted to OD₆₀₀ = 0.1 with LB. 100 µL aliquots of diluted cultures were collocated into 96-well culture plates and incubated at 37 °C for 48 h. After the medium was eliminated, propidium iodide (PI) and SYTO9 stains were added. Plates were washed using PBS and analyzed using a confocal laser scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000). All microscopy images were recorded using filter sets for monitoring PI and SYTO9 fluorescence, respectively. Images were obtained using a 40× by 1.3 objective. Simulated 3D images and sections were generated using the Olympus FV1000 software package. Additionally, photographs of biofilms obtained by confocal microscopy were analyzed to determine surface plots and biomass content using the ImageJ (NIH Image) and Comstat2 software [36].

Phenazines Analysis by LC–MS

Twenty milliliters of cell-free supernatants — from the *P. aeruginosa* PAO1 cultures grown in LB medium at 37 °C, under 150 rpm for 48 h — was extracted with an acidified ethyl acetate solvent, evaporated in a rotavapor at 60 °C, and dissolved in 1 mL of methanol. The phenazines were quantified using tandem liquid chromatography-mass spectrometry (LC–MS/MS), consisting of an ACQUITY UPLC and Xevo TQ-S (Waters). One-microliter samples were injected into a reverse-phase LC column ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 × 50 mm, 1.7 μm) using 0.4 mL/min flow with the gradient program. Eluent A was composed of 4 mM of ammonium-formate and 0.1% formic acid in water, and eluent B was composed of acetonitrile (100%). A linear gradient was used as follows: from 90% A:10% B for 4 min, 10% A:90% B for 1.0 min, 90% A:10% B by 1 min, and finally 1 min for equilibration. A flow rate of 0.4 mL/min was used. The column temperature was maintained at 40 °C, while the samples in the autosampler were at 10 °C. For detection, a Xevo TQ-S instrument was used in the scan (range of 100–2000 m/z) and multiple-reaction monitoring (MRM) modes. The MS/MS transition-specific parameters were determined for each compound. All compounds were measured using a capillary voltage of 2.20 (kV) at a gas desolvation temperature of 500 °C, gas flow N₂ (800 L/h), cone gas flow (50 L/h), and nebulizer gas flow (7.0 Bar). Calculations were performed using each compound's peak areas of the quantifier transition. MS/MS acquisition phenazine was operated in the same parameter using fixed collision energy 30 eV in positive mode.

RT-qPCR

RNA total from the *P. aeruginosa* strains cultures was obtained after 24 h of growth as described [37], treated with DNase (Thermo Fischer Scientific). It was utilized to obtain cDNA through Superscript II Reverse Transcriptase using reverse random primers (Thermo Fischer Scientific) in a reaction volume of 20 μL for 1 μg of RNA material, according to the manufacturer's instructions. The resulting reaction was diluted to 50 μL, and 2 μL was added to a qPCR SYBR-Green reaction mix which contains 5 μL of PCR master mix, 0.5 μL of forward and reverse primers for each gene to evaluate (Table S1, supplementary material), and deionized sterile water to a final volume of 10 μL. The qPCR reaction was performed in a ABI StepOne thermocycler (Applied Biosystems) with the thermal cycling program 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 5 s, and 60 °C for 30 s. The product was routinely examined using a dissociation curve as suggested by Applied Biosystems, and the amount of transcript was compared with the relative Ct method with *rpoS* gene as an internal reference control. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to

analyze the experimental data of the genes *lasI*, *rhlA*, *psqA*, *phzS*, *pslA*, *pelB*, and *pvdL*.

Statistical Analysis

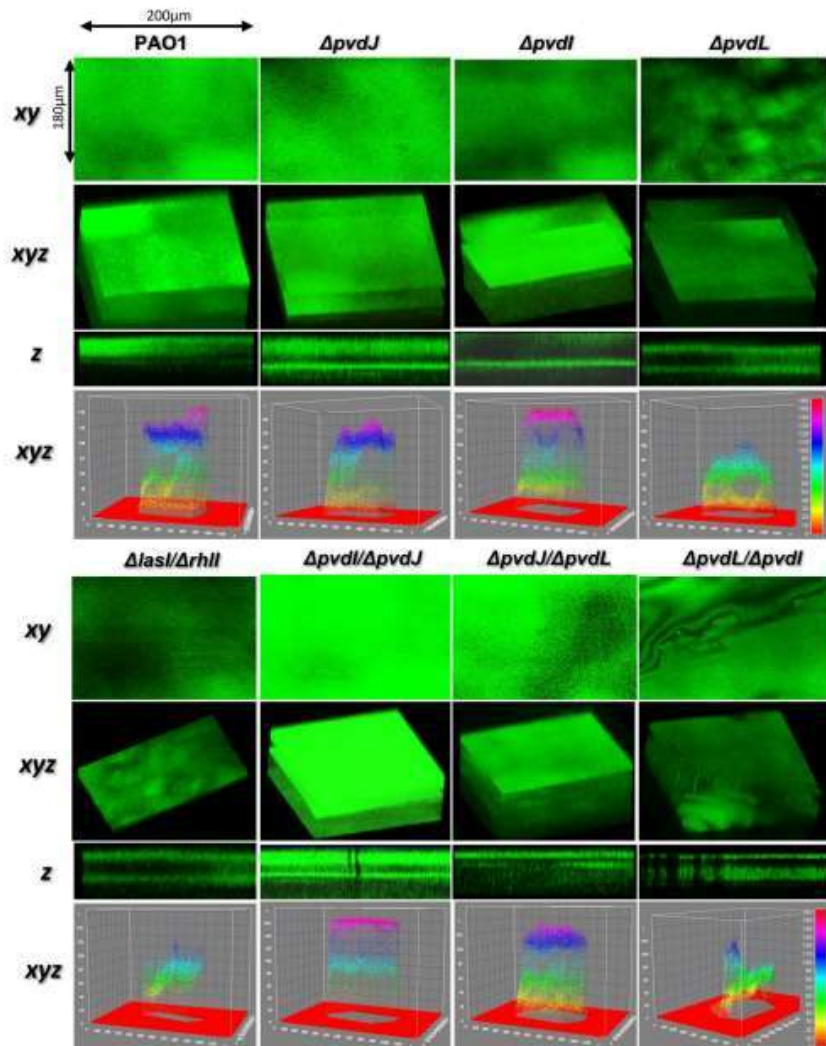
For all experiments, the overall data were statistically analyzed by using the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc.). One-way variance (ANOVA) analyses with Tukey's post hoc tests were performed to determine treatments' statistical differences.

Results

The Mutation of *pvd* Genes Modifies Biofilm Structure in *P. aeruginosa* PAO1 and Biofilm Production

Biofilm formation was determined into the single and double mutants in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* genes — which encode NRPS described as being required for the pyoverdine synthesis — and evaluated the effect on the biofilm structure by confocal microscopy. The biofilm's typically smooth and uniform morphology in the *P. aeruginosa* PAO1 strain is observed (Fig. 1). Figure 2a and b show the quantification of the fluorescence intensity rendered by bacterial cells and the thickness of the biofilm, respectively. In addition, surface plots showed clearly the constitution of layers and intensity of complexity of the particles, observed as dots (Fig. 1; analyzed by ImageJ and Comstat2 software as described [36]). The biofilm structure of the $\Delta pvdJ$ mutant displays similar characteristics to the WT strain (Figs. 1 and 2a and b). The mutant $\Delta pvdI$ showed decreased fluorescence intensity (*xy* plane) and decreased internal compaction (*z* plane) than the WT, and interestingly, the $\Delta pvdL$ mutant exhibited the most substantial impairment in fluorescence intensity, thickness, and internal biofilm complexity; its biofilm contained rough structures, like mountains, and delicate linear structures like thin fibers (Figs. 1 and 2a and b). The double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ shows similar characteristics to WT, and the double mutant $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ severely affected their biofilm structure (producing thin biofilm layers with irregular morphology) and decreased fluorescence intensity (Figs. 1 and 2a and b). The $\Delta pvdJ$ and the double mutant $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ showed similar morphology and structure to the WT strain; however, the complexity was affected (*z* plane). Unexpectedly, the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$, although it showed a structure like the WT strain, presented a significant increment in the fluorescence intensity and complexity on the biofilm layer on all planes. As a negative control, the double mutant

Fig. 1 Biofilm structure analyses in the *P. aeruginosa* *pvd* mutants. The *P. aeruginosa* strains were grown on LB medium in 96-well plates to analyze biofilm structure and production. Representative images of biofilm structures in the *pvd* mutants were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) at 48 h of culture at 37 °C. The biofilms were stained with SYTO9 (green) to live cell staining. The image magnification is 40×. The *xy* plane corresponds to a view from the top of the biofilm layer (2-D dimension). The *xyz* plane corresponds to a picture of the biofilm layer in the 3-D dimension. The *z* plane indicates the structure of biofilm seen in a cross-sectional view. Plots of surface analysis 3-D show the constitution of layers and intensity of complexity and particles count-intensity (analyzed by ImageJ software)



ΔlasI/ΔrhII was included. In agreement with previous studies describing AHL-dependent mutations, the biofilm layers are impaired and decreased in fluorescence intensity (Figs. 1 and 2a and b).

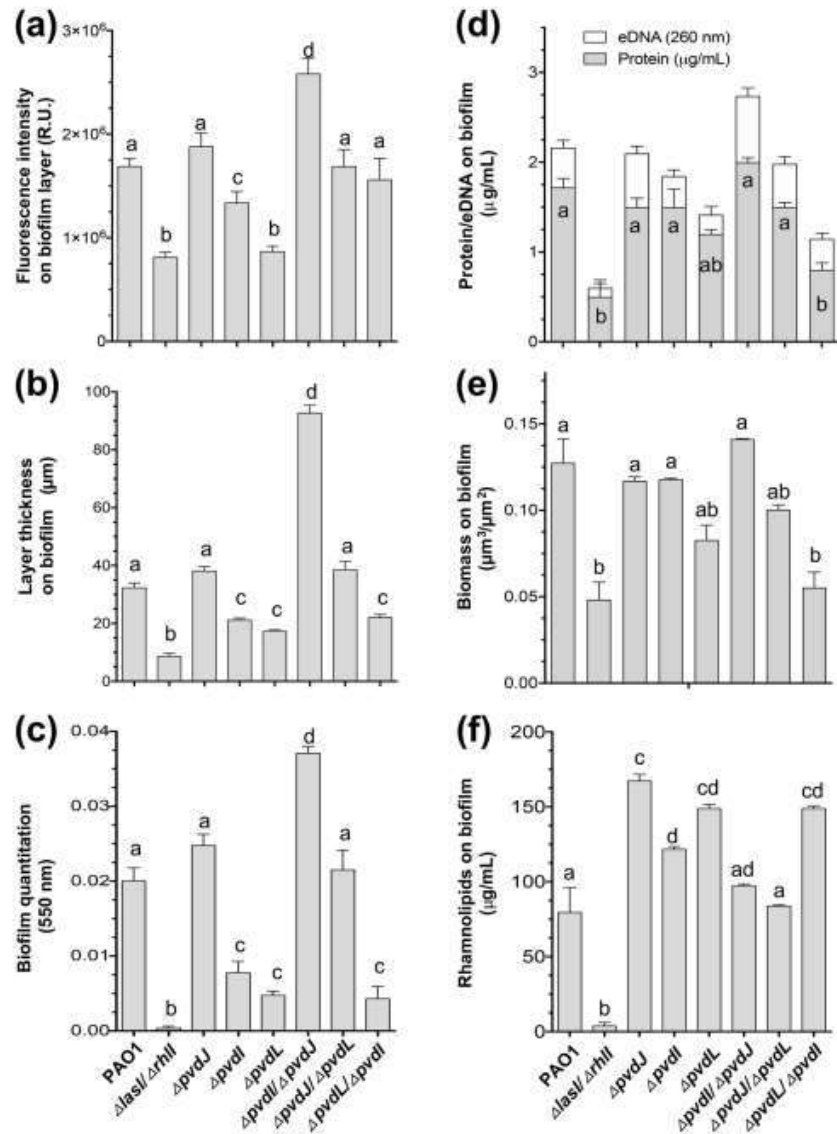
In quantifying biofilm production by crystal violet spectrophotometric method, the *ΔpvdI* and *ΔpvdI/ΔpvdL* mutants produced similar amounts of biofilm to the WT strain, while the *ΔpvdI*, *ΔpvdL*, and *ΔpvdL/ΔpvdI* mutants produced significantly less biofilm than WT strain (Fig. 2c). As expected, in the *ΔlasI/ΔrhII* strain, the amount of biofilm was almost totally undetected. At the same time, in concordance with the fluorescence method, the mutant *ΔpvdI/ΔpvdJ* exhibited the most increased biofilm production. (Fig. 2c), and the protein and DNA quantitation and biomass determination

were consistent between the different techniques of biofilm analysis (Fig. 2a–e).

The biofilm-mediated bacterial pathogenicity is also associated with various virulence factors; thus, several virulence factors were determined in the *pvd* mutants. The rhamnolipid production was increased in the single mutants *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* and the double mutant *ΔpvdL/ΔpvdI*, compared to the WT strain (Fig. 2f). As expected, the *ΔlasI/ΔrhII* double mutation reduced the production of rhamnolipids, proteases, and elastase; however, the single or double *pvd* mutants did not show significant differences in the production of protease and elastase compared with the WT strain (Fig. S1, supplementary material).

Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine...

Fig. 2 Determination of parameters on biofilms from the *P. aeruginosa pvd* mutants. Images obtained from confocal laser scanning microscopy (CLSM) shown in the figure were analyzed by the following: **a** biofilm quantitation by CLSM as fluorescence intensity (*xy* plane). **b** The layer thickness of the biofilm was determined by CLSM (*xyz* plane). **c** Biofilm quantitation was determined by staining with crystal violet and quantifying OD at 550 nm. **d** Protein and DNA determination in biofilm by Bradford method and optic density at 260 nm, respectively. **e** Biomass determination in biofilms using images obtained from CLSM by ImageJ and Comstat2 software [36]. **f** Rhamnolipids quantitation in cultures of *P. aeruginosa* strains growth in LB medium at 48 h of incubation at 37 °C. Bars represent the means \pm SE of at least three independent experiments. One-way ANOVA analysis was performed with Tukey post hoc test. Values with significant differences ($P < 0.05$) are denoted by lowercase letters



Mutation of the *pvd* Genes Modifies the Quorum Sensing Response in *P. aeruginosa* PAO1

To determine whether the modifications of biofilm observed in the *pvd* mutants are associated with QS-dependent modulation, the QS-AHL system functionality was evaluated using a biosensor strain (*E. coli* transformed with the plasmid *plasRlasIRhII::luxCDABE*) [27]. The cell-free supernatants of the double mutant Δ *lasI*/Δ*rhII*, as expected, produced less than 10% of fluorescence than that of the PAO1 WT strain (100%) (Fig. 3a). Interestingly, the single mutants

Δ *pvdJ*, Δ *pvdI*, and Δ *pvdL* showed 15–35% in the level of fluorescence induced into the AHL-biosensor compared with that of the WT (Fig. 3a). Although the double *pvd* mutants showed increased fluorescence levels compared to the single *pvd* mutants, the induction levels of the biosensor by the double mutants remained below that of the WT strain (~50% average).

To evaluate whether the *pvd* mutations in the *P. aeruginosa* PAO1 strain modify the response of the *pqs*-QS system, the PQS autoinducer content was determined in culture supernatants. Results showed that the PQS amounts

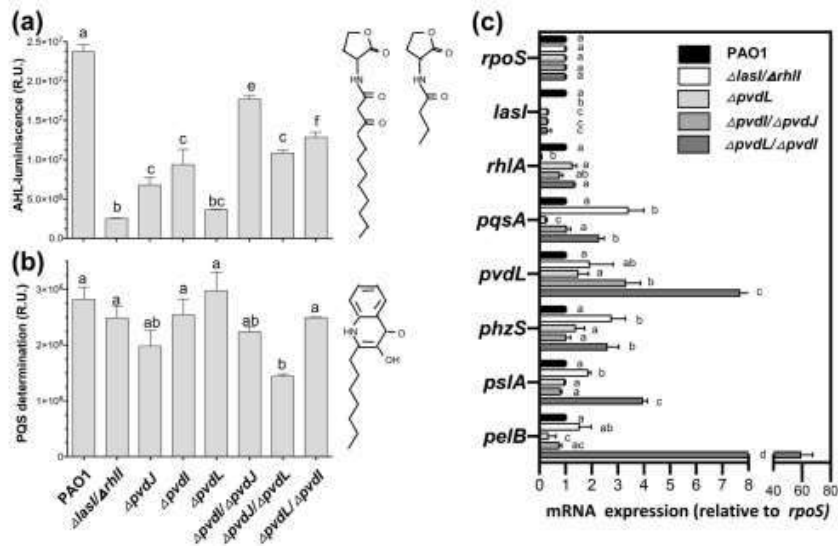


Fig. 3 Participation of QS systems in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*. Cell-free supernatants from cultures of the *P. aeruginosa* strains grown in LB medium for 48 h at 37 °C were used to determine the induction of QS systems and gene expression. **a** Induction of the *lasI*/*rhI*-dependent biosensor by cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains, determined by bioluminescence generation. The assay was performed using the *E. coli* JM109 reporter strain harboring the pSB1075 plasmid, producing luminescence in response to 3-oxo-C₁₂-HSL. **b** Determination of PQS, 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1*H*)-quinolone

in cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains by HPLC. **c** The relative expression levels of transcripts through RT-qPCR assays for the *P. aeruginosa* strains are shown. Data were analyzed by the 2^{-ΔΔC_t} method using *rpoS*, a reference gene. The results are presented as expression-fold changes. Bars represent the means of at least three independent experiments (**a–b**), or three replicates of RT-qPCR (**c**). One-way ANOVA with a Tukey post hoc test was used to compare treatments. Values with significant differences (*P* < 0.05) are denoted by lowercase letters

decreased ~25% in the cell-free supernatants from cultures of the Δ*pvdJ* and Δ*pvdI*/Δ*pvdJ* mutants, while that at ~50% in the Δ*pvdI*/Δ*pvdL* mutant (Fig. 3b). mRNA quantitation determined by RT-qPCR at 24 h of cultivation on the indicated mutants showed that the expression of the *lasI* and *rhIA*, as expected in the double mutant Δ*lasI*/Δ*rhII*, was almost undetected, but significantly, the *lasI* decreased in the *pvd* mutants tested (Fig. 3c). On the contrary, the *rhIA* gene expression remains similar to the WT strain in the *pvd* mutants (Fig. 3c). For its part, the expression of the *pqsA* gene was increased in the Δ*lasI*/Δ*rhII* and the Δ*pvdI*/Δ*pvdJ* mutant but decreased its expression in the Δ*pvdL* mutant.

To explore whether the differential production of virulence factors observed in the *pvdL*, *pvdI*, and *pvdJ* mutants are associated with the interference of the QS circuits involved in siderophore and phenazine synthesis, mRNA quantitation was determined (Fig. 3c). The expression of the *phzS* gene involved in the phenazines synthesis showed increased expression in the Δ*lasI*/Δ*rhII* and Δ*pvdI*/Δ*pvdJ* double mutants; a similar behavior was observed in the *psIA* expression (encodes a glycosyl transferase involved in exopolysaccharides required for biofilm formation) [38]. The *pvdL* expression was significantly increased in the double mutants Δ*pvdI*/Δ*pvdJ* and Δ*pvdL*/Δ*pvdI*. However,

the *pelB* expression (encodes an outer-membrane porin involved in polysaccharides exporting essential for biofilm formation) [39] was impaired in the *pvdL* and double mutant Δ*pvdI*/Δ*pvdJ* but suppressively increased strongly in the double mutant Δ*pvdL*/Δ*pvdI* (Fig. 3c).

Mutation of the *pvd* Genes Modifies the Production Phenazines in *P. aeruginosa* PAO1

To evaluate whether the mutation on the *pvd* genes modifies the production of secondary metabolites, also considered virulence factors, quantitation of cyclodipeptides (CDPs) and phenazines was carried out. The cyclo (L-Pro-L-Phe), cyclo (L-Pro-L-Val), and cyclo (L-Pro-L-Tyr) quantitation in the cell-free supernatants of *P. aeruginosa* cultures indicate that individually some mutants produced less of some CDPs. Even total CDP amounts in the *pvd* mutants were not observed compared with the PAO1 WT strain (Fig. 4a–c).

Determining the virulence factor pyocyanin in cell-free supernatants of *P. aeruginosa* cultures shows that the *pvd* mutants (single or double) significantly increased pyocyanin production compared to the PAO1 WT strain, where the Δ*pvdI*/Δ*pvdJ* mutant was the better producer of pyocyanin (Fig. 4d). In addition, we evaluated the production

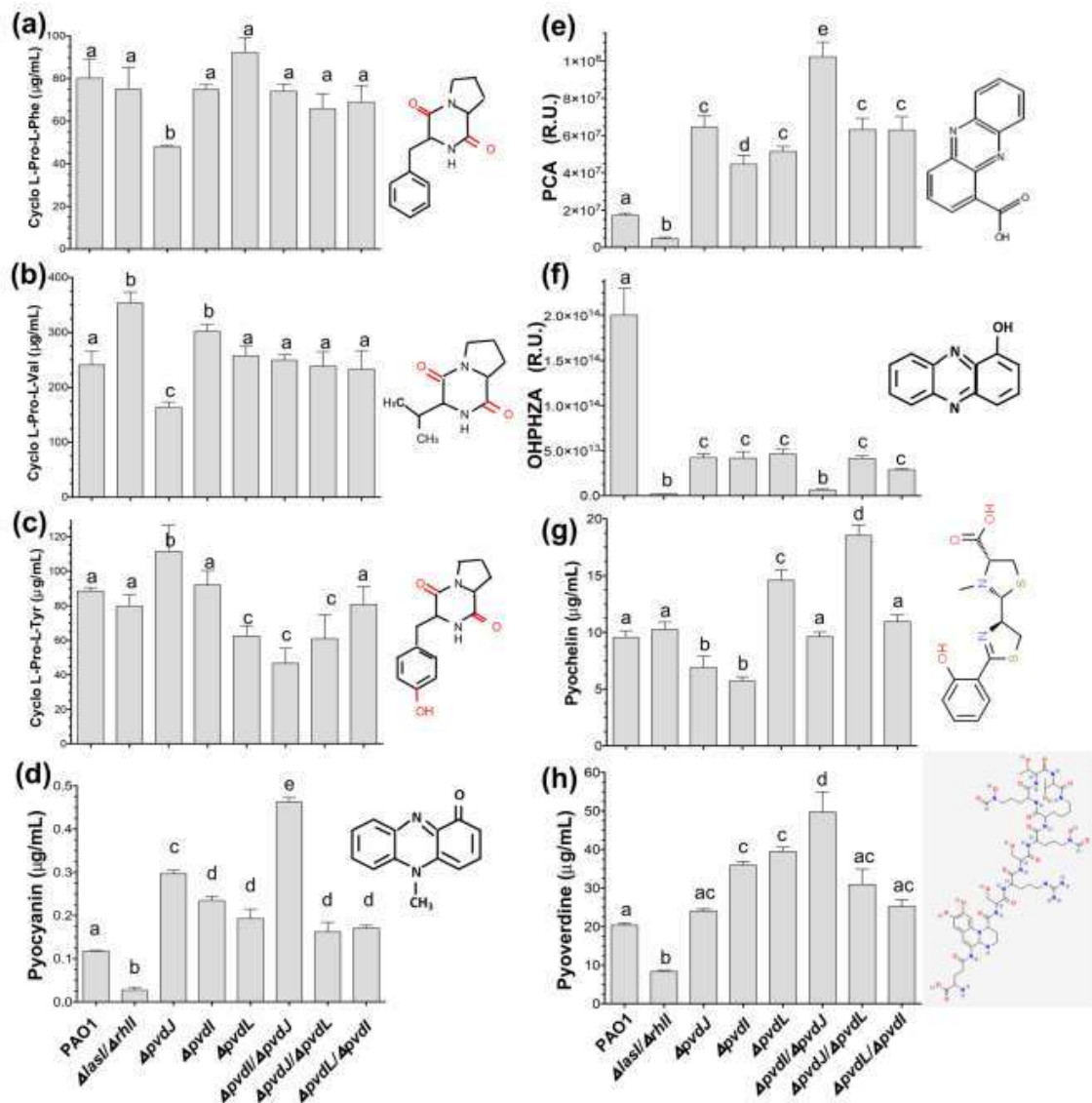
Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine...

Fig. 4 Determination of secondary metabolites and phenazines in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*. Metabolite determination in cell-free supernatants from cultures of the *P. aeruginosa* strains grown in LB medium for 48 h at 37 °C, as described in the “Materials and Methods.” **a–c** Cyclodipeptides, **a** cyclo (L-Pro-L-Phe), **b** cyclo (L-Pro-L-Val), **c** cyclo (L-Pro-L-Tyr), **d** pyocyanin, **e** PCA, phenazine-1-

carboxylic acid, **f** OHPHAZ, 1-hydroxyphenazine, **g** pyochelin, **h** pyoverdine. Bars represent the means of at least three independent experiments. One-way ANOVA with a Tukey post hoc test was used to compare treatments. Values with significant differences ($P < 0.05$) are denoted by lowercase letters

of PCA and OHPHAZ phenazines in the cell-free supernatants by LC-MS. Notably, the yield of PCA was significantly increased in all the *pvd* mutants, with the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ again the highest PCA producer (Fig. 4e). However, an opposite effect was observed in the OHPHAZ phenazine production, where its production was

significantly impaired in all *pvd* mutants compared to the WT strain. In contrast, the mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ yielded the lowest amounts of OHPZA, similar to the $\Delta lasI/\Delta rhlI$ negative control strain (Fig. 4f). Thus, the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ increased the production of pyocyanin and PCA but impaired OHPZHA production.

Mutation of the *pvd* Genes Increases the Production of Pyochelin and Pyoverdine Siderophores in *P. aeruginosa* PAO1

Likewise, the iron-sequester siderophores pyochelin and pyoverdine were determined in the cell-free supernatants of the PAO1 cultures. Results show that the mutant strains $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ and $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ produced similar amounts of pyochelin as compared to the WT and double mutant $\Delta lasI/\Delta rhII$ strains. However, the single mutants $\Delta pvdI$ and $\Delta pvdJ$ produced less pyochelin, while the single mutant

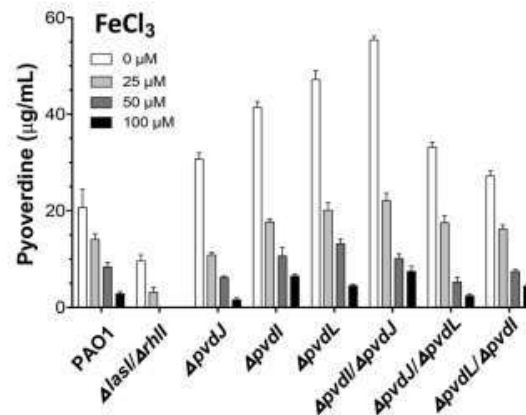


Fig. 5 Effect of iron in the pyoverdine production in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*. Cultures of *P. aeruginosa* strains grown in M9 minimal medium for 48 h at 37 °C with the addition of different concentrations of FeCl₃ as indicated were utilized to analyze the pyoverdine content as described in the “Materials and Methods.” Bars represent the means of at least three independent experiments

$\Delta pvdL$ and the double mutant $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ produced the highest amounts of pyochelin (Fig. 4g).

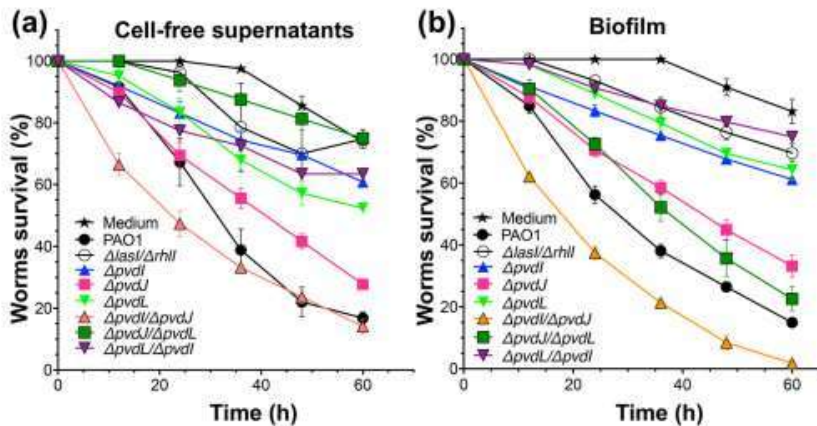
On the other hand, the production of pyoverdine in the *P. aeruginosa pvd* mutants showed an unexpected finding; the production of pyoverdine in the single mutant supernatants, $\Delta pvdI$ and $\Delta pvdL$, and in the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ was significantly increased as compared to the WT strain (Fig. 4h). However, as expected, when the mutants were grown in a medium supplemented with increased concentrations of FeCl₃ (0–100 µM), the pyoverdine content decreased depending on the iron concentration in the culture medium (Fig. 5). Taken together, the data indicate that mutations in the *pvd* genes increased pyoverdine production, which was reverted by iron supplementation in the culture media.

Mutation of the *P. aeruginosa pvd* Genes Increases the Death of *Caenorhabditis elegans* Worms

Caenorhabditis elegans is currently used as a host model to evaluate *in vivo* infection procedures, including the pathogenic *P. aeruginosa* bacterium [40]. Thus, cell-free supernatants and biofilm from cultures of the *pvd* mutants were used to evaluate the pathogenicity using the *in vivo* worm model. As expected, the worm’s survival plots showed that the PAO1 WT strain was more virulent than the *pvd* mutants. Importantly, the supernatant from the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ was more virulent than that of the WT PAO1 strain. (Fig. 6a). Interestingly, the supernatants of the double mutants $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ and $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ showed a percentage of worms survival similar to the $\Delta lasI/\Delta rhII$ control strain (Fig. 6a). Thus, the killing capability of the cell-free supernatants of the *P. aeruginosa* strains was as follows: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > PAO1 > \Delta pvdJ > \Delta pvdL > \Delta pvdI > \Delta pvdL/\Delta pvdI > \Delta lasI/\Delta rhII > \Delta pvdJ/\Delta pvdL$.

Likewise, we evaluated the survival of *C. elegans* worms in the presence of biofilm samples from the *P. aeruginosa*

Fig. 6 Toxicity of cultures of the *pvd* mutants of *P. aeruginosa* on *C. elegans* worms. Adult *C. elegans* worms (20 individuals) were incubated with cell-free supernatants obtained after the growth of *P. aeruginosa* strains in LB medium for 48 h at 37 °C (a) and biofilm (b). Worm survival was determined at indicated times as described in “Materials and Methods.” Bars represent the means \pm standard error (SE) of three independent assays



bacterial cultures grown for 48 h. Results showed similar behavior as when supernatants were used; biofilm from the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ was more pathogenic than that of the WT PAO1 strain. Still, the biofilm from the $\Delta pvdL/\Delta pvdI$ mutant was less harmful (Fig. 6b). The biofilm killing capability of the *P. aeruginosa* strains on the worm model was as follow: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > \text{PAO1} > \Delta pvdJ/\Delta pvdL > \Delta pvdJ > \Delta pvdI > \Delta pvdL > \Delta lasI/\Delta rhII \geq \Delta pvdL/\Delta pvdI$.

Discussion

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium in which QS controls the production of multiple virulence factors involved in its pathogenicity. In *P. aeruginosa*, as in other pathogen bacteria, forming biofilms is essential for establishing chronic and severe infections, favoring host colonization [16]. In clinical isolates of *P. aeruginosa*, the structures in the biofilms are vastly different; this variation has been correlated to the degree of bacterial virulence, while in a planktonic form, the bacterium is less virulent than when the biofilms are structured [41]. Bacterial pathogenesis mediated by biofilms is controlled by several regulatory factors and the expression of a hierarchically regulated QS system to produce a diversity of virulence factors [6].

In a previous study, Gonzalez et al. (2017) described that mutation of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) modifies the pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1 in *A. thaliana* depending on the production of pyocyanin [28]. Thus, the role of the NRPS in modulating the virulence factors production in *P. aeruginosa* is of great interest to elucidate and understand their relationship with pathogenicity.

In this study, we determined in *P. aeruginosa* PAO1 the effects of mutation in the *pvd* genes, involved in the synthesis of the pyoverdine siderophores, on bacterial pathogenicity. The mutagenesis approach in the PAO1 strain was carried out in the *pvdJ*, *pvdI*, and *pvdL* loci encoding for NRPS described as the primary enzymes involved in pyoverdine siderophores synthesis [19].

The mutation of the *pvd* genes caused a substantial modification of the biofilm structure (Fig. 1). In this sense, the biofilm morphology in the single *pvdI* and *pvdL* mutants showed that the biofilm thickness was significantly decreased, but not for the *pvdJ* mutant, where film thickness increased with a double mutation in the $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ genes. Contrarily, in the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdL$, the biofilm formation and structure were significantly impaired, consistent with an increase in rhamnolipids production (Figs. 1 and 2). Additionally, the single mutation of the *pvdL* gene showed the most substantial modifications in biofilm structure and complexity; that is in agreement with mRNA expression of the *pelB* gene

involved in exopolysaccharides synthesis and transport, which are essential for biofilm formation [38, 39]. These results indicate that the mutation in the *P. aeruginosa* *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* genes modifies the biofilm composition, showing a correlation with the rhamnolipids content. In agreement, it has been described that the rhamnolipids and the expression of the *pslA* and *pelB* genes are essential to produce, export, and maintain biofilm architecture, facilitating the degradation of the matrix, decreasing the cellular adhesion, favoring the dispersion, and activating the motility of the bacteria contained in the biofilms [16, 38, 39, 42].

Pathogenic bacteria use diverse mechanisms (i.e., production of virulence factors) to evade the immune response by inactivating critical components of the immune system, which is crucial for the invasion of host tissues [43]. *Pseudomonas aeruginosa* produces a variety of extracellular products which possess potent biological activity in mammalian tissues, such as proteolytic enzymes, elastase, and alkaline protease, all of which are regulated by the QS systems [43]. Studies describe that the increase of the elastase and protease is associated with highly complex and more robust biofilm structures, while their decrease results in superficial, unstructured biofilm layers [17]. In our study, changes in the production of these virulence factors in the NRPS-mutants studied were not observed (Fig. S1) and did not show a correlation with the modifications to structure biofilm observed (Fig. 1), suggesting the implication of other virulence factors.

In *P. aeruginosa*, QS has a dual role: the modulation of the virulence factors and induction of the host immune response [44]. In addition, the biofilm formation in *P. aeruginosa* is regulated by QS dependent on N-acyl homoserine lactones (QS-AHL) [16]. Also, it has been described that AHL-dependent QS hierarchically regulates downstream QS systems such as the *Pqs* QS-system, which utilizes the quinolone PQS as an autoinducer, which also can modulate the biofilm production and structure [16, 45].

In our study, we further confirmed that the mutation of the NRPS encoded in the *pvd* genes modified the AHL-dependent *las*-QS signaling (Fig. 3a). The double mutant $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ was the only strain that changed the production of the PQS quinolone, the autoinducer of the *Pqs*-QS system (Fig. 3b); however, the *pvd* mutations modified the mRNA expression of the *pqsA* gene (Fig. 3c). This is the first report describing in *P. aeruginosa* that the PQS synthesis is associated with the NRPS (PvdL and PvdJ) modulation. Consequently, the regulation of genes dependent on the *Pqs* QS system may be altered. These findings suggest that mutation of the *pvdL* gene modifies the PQS production. Therefore, the *Pqs* QS-system, also known as the *las*-QS system, can be responsible for the observed biofilm structure modifications, several virulence factors, biofilm

development, and iron-starvation response be modified by the PQS system [10].

Other factors described as modulators of QS are the CDPs. These molecules are involved in the bacterial signaling of QS independent of the *Las/Rhl/Pqs* systems [7]. In *P. aeruginosa*, the CDPs are synthesized by NRPS, which molecules interfere with AHL QS signaling [28, 46]. In this study, our results indicate that the NRPS (PvdI/PvdJ/PvdL) did not modify CDP synthesis (Fig. 4a–c).

On the other hand, phenazine synthesis is associated with biofilm production, which is required for the bacteria establishment in both the host and the lungs of cystic fibrosis patients [47]. *P. aeruginosa* secreted three main phenazines: pyocyanin, phenazine-1-carboxamide, and 1-hydroxyphenazine (OHPHAZ), where OHPHAZ is from phenazine-1-carboxylic acid (PCA) [48]. Pyocyanin plays a role in the multi-species interactions, exacerbation of host pathogenesis, ROS generation, and iron acquisition, being widely described as related to the *P. aeruginosa* pathogenesis [17]. OHPHAZ is implicated in ROS generation, host cilia dysfunction, and iron acquisition, while PCA improves biofilm formation, iron acquisition, and antibiotic resistance [49].

Our study found that mutations in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* significantly increased the production of the

phenazines, pyocyanin (PYO), and PCA; oppositely, the output of OHPHAZ was impaired (Fig. 4d–f). The synthesis of PYO involves an intermediary from the chorismic acid, first to obtain PCA, and subsequently PYO; collaterally is also produced the phenazine-1,6-dicarboxylic acid (PDC), and 1-hydroxyphenazine (OHPHAZ), which all compounds possess multiple biological properties [50]. These findings indicate that in the *P. aeruginosa* PAO1, the NRPS PvdI/PvdJ/PvdL mutations consequently induce the synthesis of other siderophores such as pyochelin or phenazines such as PYO and PCA. Additionally, we can suggest that the pool of OHPHAZ was decreased in function on demand of metabolite precursors required PYO synthesis (Fig. 7). These findings indicate that although the *pvd* genes are essential for the synthesis of pyoverdine, these are also involved in the phenazines synthesis.

In *P. aeruginosa*, it has been described that iron chelation is vital for the establishment of bacterial infection and progression towards a chronic disease where available iron is limited [19]. The siderophores such as pyochelin and pyoverdine can sequester iron from host depots to improve the bacterial establishment during the infection (Fig. 7); additionally, the siderophores can act as signaling molecules [54]. PQS cooperatively stimulates the iron scavenging

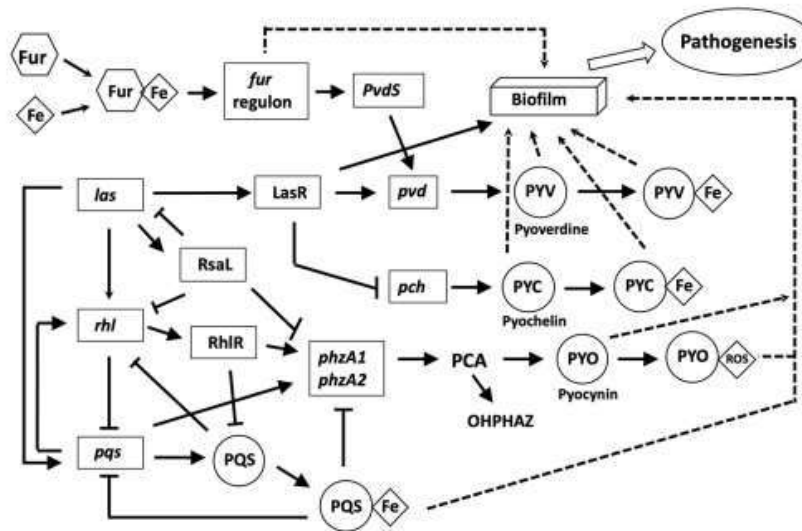


Fig. 7 Model of the interaction of the quorum-sensing system with siderophores biosynthesis and biofilm formation in *P. aeruginosa* PAO1. Iron deprivation induces the expression of the *fur* regulon, which generates the Fur regulator and induce the expression of the PvdS sigma factor. This controls the *pvd* regulon of biosynthesis of pyoverdines (PYV), a kind of siderophore that is involved in the iron acquisition and iron homeostasis. On the other hand, the *las*-QS system regulates the *pqs* operon, which consequently modulates the *pqs*-QS system. The PQS function as an iron sequester also modulates the

phzA1/phzA2 operons involved in the synthesis of phenazines (PCA and OHPHAZ), also as for the ROS scavenger iron-dependent pyocyanin (PYO). Siderophores are essential in the formation of the biofilm structure, rendering with other virulence factors a biofilm structure critical to the establishment of pathogenicity and resistance of *P. aeruginosa* to hosts or environmental niches (the model was adapted from the findings obtained in this work and from models described previously [51–53])

siderophores, such as pyoverdine and pyochelin, resulting in the modulation of siderophore production under different environmental and nutritional conditions [55].

Contrary to impairing the pyoverdine production, in our study, the production of these siderophores was favored mainly in the *pvd* double mutations (Fig. 4g and h). In agreement, the supplementation of iron reverted the overproduction of pyoverdine in a dose-dependent manner (Fig. 5). This finding suggests that multiple participants in the regulation of gene expression of structural genes, regulatory genes, and transport-involved, among other modifications in the pyoverdine structure, show the complexity of the pyoverdines synthesis and the multiple factorial points that are involved in their synthesis and modulation (Fig. 7).

The nematocidal activity of the siderophore pyoverdine has been reported in *P. aeruginosa*, revealing that it is sufficient to kill *C. elegans* [56]. Deletion of the *pvdD* and *pvdJ* genes in *P. syringae* caused the inhibition of pyoverdine production and attenuated virulence against *C. elegans* worms [56]. Furthermore, the deletion of the *pvdD* and *pvdJ* genes negatively impacts phenazine production, which affects the killing capability of *P. aeruginosa* over *C. elegans* [57]. Nevertheless, in our study, it was demonstrated that in the *pvd* mutants, increased pyoverdine concentration was correlated with the decreased capability to cause the fast mortality of *C. elegans*, except for the double mutant $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$, which continued to be killing at similar levels to the WT strain (Fig. 6a). In *P. aeruginosa*, biofilm is a protective structure for bacterial growth, essential for survival in nosocomial environments; it may also maintain the persistence of the inflammatory response in chronic bacterial infections, favored by the excretion of diverse virulence factors. However, the degree of pathogenicity, expression of virulence factors, or resistance to antibiotics by bacteria cannot always be associated with the ability to form biofilms [58, 59]. But our results point to the possibility that increasing biofilm formation correlates with increased virulence factors, i.e., pyocyanin production as shown in $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$ strain, and this modification correlates with increased mortality of *C. elegans*. Whereas, those mutants impaired on biofilm production show decreased killing capability on the in vivo pathogenicity of *C. elegans* model, showing from most virulent to least: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > \text{PAO1} > \Delta pvdJ > \Delta pvdL > \Delta pvdI > \Delta pvdL/\Delta pvdI > \Delta lasI/\Delta rhlI > \Delta pvdJ/\Delta pvdL$. The behavior was similar when utilizing supernatants and biofilms (Fig. 6b).

On the other hand, the PQS system in *P. aeruginosa* regulates the synthesis of several virulence factors, forming an intercommunication between the two central QS systems *Las* and *Rhl* systems. In *P. aeruginosa*, the PYO

synthesis is performed by two paralogous gene clusters (*phz1* and *phz2*), in which the PsqE protein and the *Rhl* QS system regulate its synthesis, along with other virulence factors, such as biofilm and rhamnolipids, all of which are important for the bacterial pathogenicity [47]. Our findings showed that the *las*-QS and *pqs*-QS systems modulate the PYO synthesis pathway, where both PYO and PCA significantly increase concentration for the *pvd* mutants (Figs. 4 and 7).

The role of pyocyanin in iron acquisition has been studied, although how PCA phenazine favors biofilm production by promoting iron chelation is poorly understood. In this context, the iron acquisition in *P. aeruginosa* is associated with the siderophores, pyochelin, and pyoverdine [18, 19]. The pyochelin (low affinity by iron) is synthesized by enzymes encoded into the *pchDCBA* genes cluster. In contrast, pyoverdine types (high affinity by iron) are encoded into the *pvd* genes clusters located in different operons conforming in the PAO1 strain around 20 regulatory and structural proteins [60].

To our knowledge, this is the first report in *P. aeruginosa* that explores the *pvd* gene involvement in the biofilm structure and phenazines production by a QS-dependent mechanism. Our findings showed that the single mutations carried out by transposon insertion in the *pvdI*, *pvdJ*, and *pvdL* were insufficient to abolish the PVD synthesis, indicating that specific modules on the NRPS are functional or that redundancy of function could occur. It further confirms that the NRPS PvdI, PvdJ, and PvdL are involved in synthesizing the pyoverdine siderophore and phenazines, which were found to impact the biofilm structure and the biofilm-associated bacterial establishment pathogenicity of *P. aeruginosa* PAO1.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>.

Acknowledgements We thank Pseudomonas Genome Center Annotation and UWGC for PAO1-transposon mutants donation.

Author Contribution JC-G conceived and designed the study. Material preparation, data collection, and analysis were performed by SD-P, SS, and JV-A. The manuscript was written by SD-P, JV, HR-C, JSL-B, and JC-G. JV-A, JSL-B, and JC-G supported administrative, technical, or material. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México (grant number 256119) and by a Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14 grant.

Declarations

Ethics Approval Not applicable.

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

References

- Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV Jr (1996) Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 109:1019–1029. <https://doi.org/10.1378/chest.109.4.1019>
- Hirakata Y, Furuya N, Tateda K, Kaku M, Yamaguchi K (1993) In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. Infect Immun 61:2468–2473. <https://doi.org/10.1128/iai.61.6.2468-2473.1993>
- Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 5:279–313. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.2.279>
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. EMBO J 22:3803–3815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>
- Dandekar AA, Greenberg EP (2013) Plan B for quorum sensing. Nat Chem Biol 9:292–293. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1233>
- Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6:26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Ahator SD, Zhang L (2019) Small Is Mighty—Chemical communication systems in *Pseudomonas aeruginosa*. Annu Rev Microbiol 73:559–578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>
- de Kievit TR, Iglewski BH (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun 68:4839–4849. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.4839-4849.2000>
- Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3:685–695. <https://doi.org/10.1038/nrm907>
- Rampioni G, Falcone M, Heeb S, Frangipani E, Fletcher MP, Dubern JF, Visca P, Leoni L, Cámara M, Williams P (2016) Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 12:e1006029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006029>
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 184:6472–6480. <https://doi.org/10.1128/jb.184.23.6472-6480.2002>
- Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang L-H (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. Nat Chem Biol 9:339–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- Turkina MV, Vikström E (2019) Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Innate Immun 11:263–279. <https://doi.org/10.1159/000494069>
- Vital-Lopez FG, Reifman J, Wallqvist A (2015) Biofilm formation mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* predicted via genome-scale kinetic models of bacterial metabolism. PLoS Comput Biol. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004452>
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA (2020) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Brindhadevi K, LewisOscar F, Mylonakis E, Shanmugam S, Verma TN, Pugazhendhi A (2020) Biofilm and quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Process Biochem 96:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
- Das T, Manoharan A, Whiteley G, Glasbey T, Manos J (2020) Chapter 3 - *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and infections: roles of extracellular molecules. In: Yadav, MK, Singh, BP (eds.) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms. Elsevier, pp. 29–46
- Ringel MT, Brüser T (2018) The biosynthesis of pyoverdines. Microb Cell 5:424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
- Schalk IJ, Guillon L (2013) Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. Environ Microbiol 15:1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
- Gulick AM (2017) Nonribosomal peptide synthetase biosynthetic clusters of ESKAPE pathogens. Nat Prod Rep 34:981–1009. <https://doi.org/10.1039/c7np00029d>
- Wong SM, Mekalanos JJ (2000) Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 97:10191–10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>
- Li L-L, Malone JE, Iglewski BH (2007) Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. J Bacteriol 189:4367–4374. <https://doi.org/10.1128/jb.00007-07>
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV, Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 100:14339–14344. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036282100>
- Kokotek W, Lotz W (1991) Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. Gene 98:7–13. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90097-u](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90097-u)
- Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci USA 76:1648–1652
- Díaz-Pérez AL, Zavala-Hernández AN, Cervantes C, Campos-García J (2004) The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 70:5102–5110. <https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5102-5110.2004>
- Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS (1998) Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiol Lett 163:185–192
- Gonzalez O, Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Díaz-Pérez AL, Magana-Duenas V, Lopez-Bucio J, Campos-García J (2017) Non-ribosomal peptide synthetases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclodipeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. Microb Ecol 73:616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- Coffey BM, Anderson GG (2014) Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 1149:631–641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48
- Panariello BHD, Klein MI, Pavarina AC, Duarte S (2017) Inactivation of genes *TEC1* and *EFG1* in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. J Oral Microbiol 9:1385372–1385372. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1385372>
- Köhler T, Ouertatani-Sakouhi H, Cosson P, van Delden C (2014) QsrO a novel regulator of quorum-sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 9:e87814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087814>
- Wang Q, Fang X, Bai B, Liang X, Shuler PJ, Goddard WA 3rd, Tang Y (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. Biotechnol Bioeng 98:842–853. <https://doi.org/10.1002/bit.21462>
- Hoegy F, Mislin GL, Schalk IJ (2014) Pyoverdine and pyochelin measurements. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 1149:293–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_24
- Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proc Natl Acad Sci (USA) 108:7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>

35. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. WormBook, ed The *C. elegans* research community. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
36. Heydom A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Grvskov M, Ersbøll BK, Molin S (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology (Reading, England) 146(Pt 10):2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>
37. Díaz-Pérez AL, Núñez C, Meza Carmen V, Campos-García J (2018) The expression of the genes involved in leucine catabolism of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by the transcriptional regulator LiuR and by the CbrAB/Crc system. Res Microbiol 169(6):324–334. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.05.004>
38. Byrd MS, Sadowskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH, Ma L, Rafston B, Parsek MR, Anderson EM, Lam JS, Wozniak DJ (2009) Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. Mol Microbiol 73:622–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>
39. Marmont LS, Whitfield GB, Rich JD, Yip P, Giesbrecht LB, Stremick CA, Whitney JC, Parsek MR, Harrison JJ, Howell PL (2017) PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 292:19411–19422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812842>
40. Powell JR, Ausubel FM (2008) Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 415:403–427. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-570-1_24
41. Thöming JG, Tomasch J, Preusse M, Koska M, Grahl N, Pohl S, Willger SD, Kaefer V, Mischen M, Häussler S (2020) Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. NPJ Biofilms Microbiomes 6:2. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0113-6>
42. Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Syldatk C, Rosenau F, Blank LM (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. Microb Cell Fact 10:80. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>
43. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JAG, Rooijackers SHM (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. J Immunol 188:386–393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>
44. Karimnik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B (2017) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. Immunol Lett 190:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>
45. Cooke AC, Florez C, Dunshee EB, Lieber AD, Terry ML, Light CJ, Schertzer JW (2020) *Pseudomonas* quinolone signal-induced outer membrane vesicles enhance biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. mSphere 5. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01109-20>
46. Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE (2009) New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. ACS Chem Biol 4:1051–1059. <https://doi.org/10.1021/cb900165y>
47. García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M (2020) The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. J Med Microbiol 69:25–34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>
48. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomasow LS (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 183:6454–6465. <https://doi.org/10.1128/jb.183.21.6454-6465.2001>
49. O'Brien S, Fothergill JL (2017) The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. FEMS Microbiol Lett 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fmx128>
50. Wang S, Huang Z, Wan Q, Feng S, Xie X, Zhang R, Zhang Z (2020) Comparative genomic and metabolomic analyses of two *Pseudomonas aeruginosa* strains with different antifungal activities. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01841>
51. Lin J, Cheng J, Wang Y, Shen X (2018) The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. Front Cell Infect Microbiol 8:230. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00230>
52. Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P, Cámara M (2018) Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. Front Cell Infect Microbiol 8:252. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>
53. Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A, Genah S, Banin E, Visca P, Imperi F (2017) Ferric uptake regulator fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 199. <https://doi.org/10.1128/jb.00472-17>
54. Little AS, Okkotsu Y, Reinhart AA, Damron FH, Barbier M, Barrett B, Oglesby-Sherrouse AG, Goldberg JB, Cody WL, Schurr MJ, Vasil ML, Schurr MJ (2018) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation status differentially regulates pyocyanin and pyoverdine production. mBio 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02318-17>
55. Popat R, Harrison F, da Silva AC, Easton SA, McNally L, Williams P, Diggle SP (2017) Environmental modification via a quorum sensing molecule influences the social landscape of siderophore production. Proc Biol Sci 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0200>
56. Bashir A, Tian T, Yu X, Meng C, Ali M, Li L (2020) Pyoverdine-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas syringae* MB03 and the role of iron in its pathogenicity. Int J Mol Sci 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21062198>
57. Cezairliyan B, Vinayavekhin N, Grenfell-Lee D, Yuen GJ, Saghatelian A, Ausubel FM (2013) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. PLoS Pathog 9:e1003101. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003101>
58. Gajdács M, Baráth Z, Kárpáti K, Szabó D, Úsai D, Zanetti S, Donadu MG (2021) No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. Antibiotics (Basel, Switzerland) 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091134>
59. Moser C, Jensen PØ, Thomsen K, Kolpen M, Rybtke M, Lauland AS, Trøstrup H, Tolker-Nielsen T (2021) Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. Front Immunol 12:625597–625597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625597>
60. Moon CD, Zhang X-X, Matthijs S, Schäfer M, Budzikiewicz H, Rainey PB (2008) Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. BMC Microbiol 8:7. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-7>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

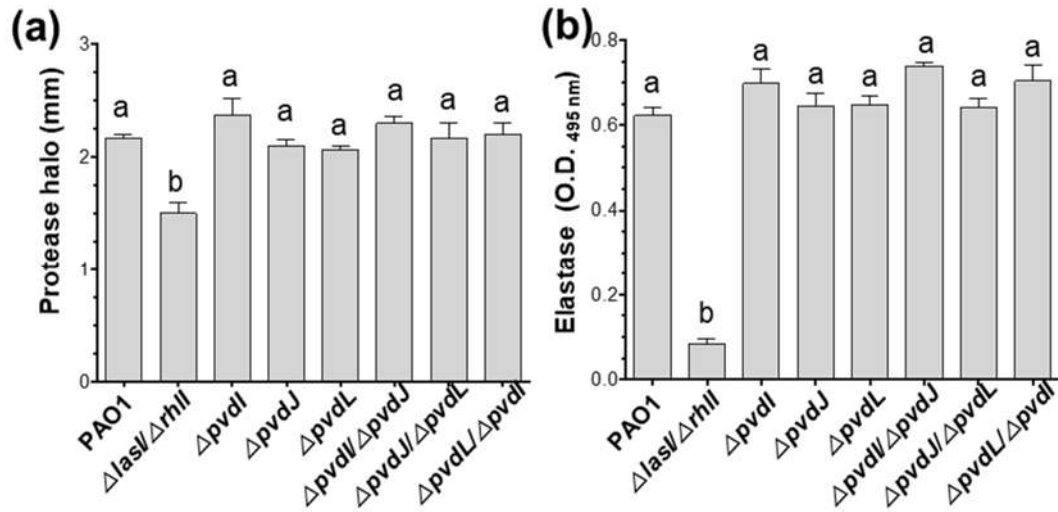


Figure S1. Determination of virulence factors in the *pvd* mutants of *P. aeruginosa*.

Cell-free supernatants from cultures of the *P. aeruginosa* strains grown by 48 h at 37°C were used to determine induction of metabolite amounts as described in Materials and Methods section. (A) Alkaline protease activity. (B) Elastase activity. Bars represent the means of at least three independent experiments. One-way ANOVA with a Tukey *post-hoc* test was used to compare treatments. Significant difference ($P < 0.05$) are denoted by different lowercase letters.

Table S1.- Oligonucleotides sequences used in RT-qPCR analysis.

Gene	Sequence	
<i>rpoS</i>	Fw-CTATGTCAATCGCGGACTGT	Rv-AGGTAGACGTTGAGCTCCTT
<i>pslA</i>	Fw-ATATCTTCAGCAACCGCCTG	Rv-GTGGTTGCGTACCAGGTATT
<i>pelB</i>	Fw-CGCTGCAGATGTTCGATTTT	Rv-ATGCGTTCCTTGACACTCAG
<i>phzS</i>	Fw-CTGGTCGCCTATCCGATCTC	Rv-GGTACTGCAGGATCAACTGG
<i>pqsA</i>	Fw-CCCTTTGCTCGACGATTCT	Rv-TTGGGAATCGAATACAGCCG
<i>lasI</i>	Fw-CGATGGTTATGACGCACTCA	Rv-GTCCAGAGTTGATGGCGAAA
<i>rhlA</i>	Fw-GAGGTCAATCACCTGGTCTC	Rv-TGATGGTTGCTGGCTTTCAG
<i>pvdL</i>	Fw-GCGCCTCGGCTGCTGCCTGAC	Rv-CTGGCCGCCACGCGGGCGCGAA

IX. DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista, y se ha demostrado que los genes implicados en la regulación de Quorum sensing están implicados en la producción de factores de virulencia. Se ha visto, que en cepas mutantes con el sistema las, el sistema IQS funciona como una alternativa para mantener la expresión de genes de virulencia, especialmente en infecciones crónicas (Jakobsen et al., 2017). Asimismo, el sistema IQS bajo condiciones de estrés puede reemplazar la función del regulador principal de QS (Lee et al., 2013; Lee & Zhang, 2015).

En este estudio, se evaluó la producción de factores de virulencia de la bacteria *P. aeruginosa* utilizando mutantes en los principales NRPS que participan en la producción de CDPs (González et al., 2017). Esto incluyó la evaluación de mutantes simples y dobles en NRPS, así como, las proteínas involucradas en la síntesis de pioverdina (PvdD, PvdJ, PvdI y PvdL), pioquelina (PchF y PchE), sistemas de señalización del QS, Amb (AmbB y AmbE), una quinolona que participa en un sistema de señalización del QS y dos proteínas hipotéticas con funciones desconocidas (PA3327 y PA4078), demostrando la participación de estas NRPS en el mecanismo del QS, además de participar en aumentar los factores de virulencia, como fue el caso de las proteínas involucradas en la síntesis de pioverdina.

Asimismo, se ha visto que la formación de biopelículas *in vitro* depende en gran medida de la regulación de QS, ya que disminuye el tiempo en el cuál, la biopelícula se puede diferenciar, y madurar en *P. aeruginosa*, además de que la producción de estas comunidades bacterianas son clave para el establecimiento de infecciones crónicas y agudas (De Kievit, 2009). En este estudio se evaluó la producción de biopelícula, determinando que la ausencia de los genes $\Delta pchF / \Delta pvdJ$ regulan que produzcan una gran cantidad de biopelícula; y que de esta forma pueden estar participando en un aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*. Por otro lado, los ramnolípidos secretados por *P. aeruginosa* son necesarios para que las bacterias formen biopelículas de manera eficiente y con una estructura interna que incluye poros y canales (Zheng et al., 2017). Estos ramnolípidos influyen en múltiples facetas de *P. aeruginosa* de formación de biopelículas como la formación de microcolonias, mantenimiento de canales abiertos y desprendimiento de células de las biopelículas, porque los ramnolípidos están sujetos a control QS (De Kievit, 2009). Sin embargo, la cepa $\Delta ambE / \Delta pvdJ$ redujo considerablemente la producción de estos tensoactivos, participando en la regulación de ramnolípidos, ya que disminuye la producción de este factor de virulencia, lo que conlleva a favorecer la producción de las

biopelículas. Sin embargo, las biopelículas producidas por mutantes deficientes en la síntesis de ramnolípidos no mantienen los canales no colonizados que rodean las microcolonias (Davey et al., 2003). Asimismo, *P. aeruginosa* produce una variedad de productos extracelulares que poseen una potente actividad biológica en tejidos de mamíferos, como las enzimas proteolíticas, la elastasa y la proteasa alcalina que son reguladas por el sistema de comunicación QS (Blackwood et al., 1983); en este estudio, no se observaron cambios en la producción de estos dos factores de virulencia dependientes de NRPS.

En *P. aeruginosa*, como en otras bacterias patógenas, la formación de biopelículas es fundamental para el establecimiento de infecciones crónicas y graves, favoreciendo la colonización del hospedero (Brindhadevi et al., 2020). En aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, las estructuras en las biopelículas son muy diferentes; esta variación se ha correlacionado con el grado de virulencia bacteriana, mientras que en forma planctónica la bacteria es menos virulenta que cuando las biopelículas están estructuradas (Thöming et al., 2020). La patogenicidad bacteriana mediada por biopelículas está controlada por varios factores reguladores y la expresión del QS regulado jerárquicamente para producir una diversidad de factores de virulencia (Lee & Zhang, 2015).

González et al., en el 2017, describieron que la mutación de péptido sintetasas no ribosomales (NRPS) modifica la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1 en *A. thaliana* en función de la producción de pirocianina. Por lo tanto, el papel del NRPS en la modulación de la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa* es de gran interés para dilucidar y comprender su relación con la patogenicidad. En este estudio, se determinó en *P. aeruginosa* PAO1 los efectos de la mutación en los genes *pvd* (*pvdJ*, *pvdI* y *pvdL*) implicados en la síntesis de los sideróforos de pioverdina, sobre la patogenicidad bacteriana (Schalk & Guillon, 2013). La morfología de las biopelículas producidas por las mutantes en *pvdI* y *pvdL* mostró que el grosor de la biopelícula disminuyó significativamente, sin embargo, en la otra mutante simple en el gen *pvdJ* no disminuyó, al contrario, se mantuvo similar a la PAO1, mientras que el grosor de la película aumentó en la doble mutante $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$. Por el contrario, en $\Delta pvdL/\Delta pvdI$, la formación y la estructura de la biopelícula se afectó significativamente, lo que concuerda con un aumento en la producción de ramnolípidos (Fig. 1 y 2; Díaz-Pérez et al., 2022). Además, la cepa mutante en el gen *pvdL* mostró mayores modificaciones en la estructura y complejidad de la biopelícula; lo que concuerda con la expresión de ARNm del gen *pelB* involucrado en la síntesis y el transporte

de exopolisacáridos, que son esenciales para la formación de biopelículas (Byrd et al., 2009). Estos resultados indican que la mutación en los genes *pvdI*, *pvdJ* y *pvdL* de *P. aeruginosa* modifica la composición de la biopelícula, mostrando una correlación con la producción de ramnolípidos.

Se ha descrito que los ramnolípidos y la expresión de los genes *pslA* y *pelB* son esenciales para producir, exportar y mantener la arquitectura de las biopelículas, facilitando la degradación de la matriz, disminuyendo la adhesión celular, favoreciendo la dispersión y activando la motilidad de las bacterias contenidas en las biopelículas (Brindhadevi et al., 2020; Byrd et al., 2009; Marmont et al., 2017; Wittgens et al., 2011). Las bacterias patógenas utilizan diversos mecanismos (es decir, la producción de factores de virulencia), para evadir la respuesta inmune al inactivar componentes críticos del sistema inmunitario, lo cual, es crucial para la invasión de los tejidos del hospedero (Laarman, et. al., 2012). *P. aeruginosa* produce una variedad de productos extracelulares que poseen una potente actividad biológica en los tejidos de los mamíferos, como enzimas proteolíticas, elastasa y proteasa alcalina, los cuales están regulados por los sistemas QS (Laarman, et. al., 2012). Recientes estudios describen que, el aumento de elastasa y proteasa está asociado con estructuras de biopelículas altamente complejas y más robustas, mientras que su disminución da como resultado capas de biopelículas superficiales y desestructuradas (Das, et.al., 2020). En este estudio, no se observaron cambios en la producción de estos factores de virulencia en los mutantes NRPS estudiados (**Fig. S1**; Díaz-Pérez, et.al., 2022) y no mostraron una correlación con las modificaciones en la estructura de la biopelícula producida (Fig. 1; Díaz-Pérez, et.al., 2022), lo que sugiere la implicación de otros factores de virulencia, como producción de autoinductores u otras moléculas de señalización de QS, que aumentan la producción de biopelículas y regulan la patogenicidad de la bacteria.

En *P. aeruginosa*, el QS tiene un doble papel: la modulación de los factores de virulencia y la inducción de la respuesta inmune del hospedero (Kariminik, et.al., 2017). Además, se ha descrito que la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* está regulada por el QS dependiente de N-acil homoserina lactonas (QS-AHL) (Brindhadevi, et. al., 2020). El QS dependiente de AHL regula jerárquicamente los consecuentes sistemas del QS, como el sistema Pqs-QS, que utiliza el PQS de quinolona como un autoinductor, el cual, puede modular la producción y las estructuras de las biopelículas (Brindhadevi, et. al., 2020; Cooke, et.al., 2020). En este estudio, se confirmó además que mutaciones en las NRPS codificadas en los genes *pvd*, modifican la señalización de Las-QS dependiente de AHL

(Fig. 3a; Díaz-Pérez, et.al., 2022). La doble mutante en los genes $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$, fue la única cepa que cambió la producción de la quinolona PQS, el cual es autoinductor del sistema Pqs-QS (Fig. 3b; Díaz-Pérez, et.al., 2022); sin embargo, las mutaciones en los genes *pvd*, modificaron la expresión del ARNm del gen *pqsA* (Fig. 3c; Díaz-Pérez, et.al., 2022). Este es el primer reporte que describe en *P. aeruginosa*, que la síntesis de PQS está asociada con la modulación de NRPS, en PvdL y PvdJ. En consecuencia, la regulación de genes dependientes del sistema Pqs -QS puede verse alterados. Estos hallazgos sugieren que la mutación del gen *pvdL* modifica la producción de PQS. Por lo tanto, el sistema Pqs-QS, también conocido como el sistema Las-QS, puede ser responsable de las modificaciones observadas en la estructura de la biopelícula, así como de varios factores de virulencia, el desarrollo de la biopelícula y la respuesta de falta de hierro puede ser modificada por el sistema PQS (Rampioni, et.al., 2016).

Otros factores descritos como moduladores del QS son los CDPs. Estas moléculas están involucradas en la señalización bacteriana de QS independientemente de los sistemas Las/Rhl/Pqs (Ahator & Zhang, 2019). En *P. aeruginosa*, los CDPs son sintetizadas por las NRPS, cuyas moléculas interfieren con la señalización de AHL QS (Gonzalez, et.al., 2017; Campbell, et.al., 2009). En este estudio, los resultados indican que las NRPS (PvdI/PvdJ/PvdL) no modifican la síntesis de CDPs (Fig. 4a-c; Díaz-Pérez, et.al., 2022).

Por otro lado, la síntesis de fenazinas está asociada con la producción de biopelículas, las cuales son necesarias para la adhesión de la bacteria y el establecimiento de la infección, tanto en el hospedero como en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística (García-Reyes, et.al., 2020). *P. aeruginosa* secreta tres fenazinas principales: piocianina, fenazina-1-carboxamida y 1-hidroxifenazina (OHPHAZ), donde OHPHAZ proviene del ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) (Mavrodi, et.al., 2001). Por lo anterior, la piocianina juega un papel en las interacciones de múltiples especies, exacerbación de la patogénesis del hospedero, en la generación de especies reactivas de oxígeno y adquisición de hierro, el cual, ha sido ampliamente relacionado con la patogénesis de *P. aeruginosa* (Das, et.al., 2020). OHPHAZ está implicado en la generación de ROS, la disfunción de los cilios del hospedero y la adquisición de hierro, mientras que PCA mejora la formación de biopelículas, la adquisición de hierro y la resistencia a los antibióticos (O'Brien, et.al., 2017). Nuestro estudio encontró que las mutaciones en *pvdI*, *pvdJ* y *pvdL* aumentaron significativamente la producción de fenazinas, piocianina (PYO) y PCA; por el contrario, la salida de OHPHAZ se vio afectada (Fig. 4d-f; Díaz-Pérez, et.al., 2022). La síntesis de PYO involucra a un

intermediario del ácido corísmico, primero para obtener PCA, y posteriormente PYO; al mismo tiempo, también se produce el ácido fenazina-1,6-dicarboxílico (PDC) y la 1-hidroxifenazina (OHPHAZ), cuyos compuestos poseen múltiples propiedades biológicas (Wang, et.al., 2020). Estos hallazgos indican que en *P. aeruginosa* PAO1, las mutaciones en las NRPS PvdI/PvdJ/PvdL inducen la síntesis de otros sideróforos, como pioquelina o fenazinas (PYO y PCA). Además, se sugiere que OHPHAZ disminuye en función de la demanda de precursores de metabolitos que requirieron la síntesis de PYO (**Fig. 7**; Díaz-Pérez, et.al., 2022). Sin embargo, aunque los genes *pvd* son esenciales para la síntesis de pioverdina, estos también están involucrados en la síntesis de fenazinas.

En *P. aeruginosa* se ha descrito que la quelación del hierro es vital para el establecimiento de la infección bacteriana y la progresión hacia una enfermedad crónica, donde el hierro disponible es limitado (Schalk, & Guillon, 2013). Los sideróforos, como la pioquelina y la pioverdina, pueden secuestrar hierro de los depósitos del hospedero para mejorar el establecimiento de la infección por parte de la bacteria (Fig. 7; Díaz-Pérez, et.al., 2022); además, los sideróforos pueden actuar como moléculas señalizadoras (Little, et.al., 2018). El sistema PQS estimula de forma cooperativa a los sideróforos captadores de hierro, como la pioverdina y la pioquelina, lo que da como resultado la modulación de la producción de sideróforos en diferentes condiciones ambientales y nutricionales (Popat, et.al., 2017). Al contrario de perjudicar la producción de pioverdina, en nuestro estudio, la producción de estos sideróforos se favoreció principalmente en las mutantes dobles de los genes en *pvd* (Fig. 4g y h; Díaz-Pérez, et.al., 2022). Sin embargo, cuando se suplementó con hierro se revirtió la sobreproducción de pioverdina de manera dosis-dependiente (Fig. 5; Díaz-Pérez, et.al., 2022). Por consiguiente, se sugiere que algunos de los participantes en la regulación de la expresión génica de genes estructurales, reguladores y de transporte, entre otras modificaciones en la estructura de pioverdina, muestran la complejidad de la síntesis de pioverdina y los múltiples puntos factoriales que están involucrados en su síntesis y/o modulación (Fig. 7; Díaz-Pérez, et.al., 2022).

Recientemente, se ha evaluado la toxicidad del sideróforo pioverdina en *P. aeruginosa*, revelando que puede matar a *C. elegans* (Bashir, et.al, 2020). Se ha reportado que, la inhibición de los genes *pvdD* y *pvdJ* en *P. syringae* provoca la reducción de la producción de pioverdina y atenúa la virulencia contra *C. elegans* (Bashir, et.al, 2020). Asimismo, estas mutantes tiene un impacto negativo en la producción de fenazinas, lo que afecta la capacidad de muerte de *P. aeruginosa* sobre *C. elegans* (Cezairliyan, et.al., 2013). Sin

embargo, en nuestro estudio, se demostró que en las cepas mutantes en *pvd*, al aumentar la concentración de pioverdina se correlaciona con la disminución de la capacidad de causar mortalidad rápida en *C. elegans*, excepto por la doble mutante en $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$, que disminuyó la supervivencia del nematodo a velocidades similares de la cepa WT (Fig. 6a; Díaz-Pérez, et.al., 2022).

Por otro lado, en *P. aeruginosa*, las biopelículas son una estructura protectora para el crecimiento bacteriano, esenciales para la supervivencia en ambientes nosocomiales; también puede mantener la persistencia de la respuesta inflamatoria en infecciones bacterianas crónicas, favorecida por la excreción de diversos factores de virulencia. Sin embargo, el grado de patogenicidad, la expresión de factores de virulencia o la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias no siempre pueden asociarse con la capacidad de formar biopelículas (Gajdács, et.al., 2021; Moser, et.al., 2021). Pero nuestros resultados apuntan a la posibilidad de que el aumento de la formación de biopelículas se correlaciona con el aumento de los factores de virulencia, es decir, la producción de piocianina como se muestra en la cepa $\Delta pvdI/\Delta pvdJ$, y esta modificación se correlaciona con el aumento de la mortalidad de *C. elegans*. Mientras que las mutantes afectadas en la producción de biopelículas muestran una disminución de la toxicidad en el modelo de patogenicidad *in vivo* de *C. elegans*, mostrando de más virulento a menos: $\Delta pvdI/\Delta pvdJ > PAO1 > \Delta pvdJ > \Delta pvdL > \Delta pvdI > \Delta pvdL/\Delta pvdI > \Delta lasI/\Delta rhII > \Delta pvdJ/\Delta pvdL$. El comportamiento fue similar cuando se utilizaron sobrenadantes y biopelículas (Fig. 6b; Díaz-Pérez, et.al., 2022).

Por otro lado, el sistema PQS en *P. aeruginosa* regula la síntesis de varios factores de virulencia, formando una intercomunicación entre los dos sistemas centrales QS Las y Rhl. En *P. aeruginosa*, la síntesis de PYO es realizada por dos grupos de genes parálogos (*phz1* y *phz2*), en los que la proteína PsqE y el sistema Rhl QS regulan su síntesis, junto con otros factores de virulencia, como biopelículas y ramnolípidos, los cuales son importantes para la patogenicidad bacteriana (García-Reyes, et.al., 2020). Nuestros resultados mostraron que los sistemas Las-QS y Pqs-QS modulan la síntesis de PYO, donde tanto PYO como PCA aumentan significativamente la concentración de las mutantes en *pvd* (Figs. 4 y 7; Díaz-Pérez, et.al., 2022).

Se ha estudiado el papel de la piocianina en la adquisición de hierro, aunque no se ha dilucidado asertivamente, cómo la fenazina PCA, esta favorece la producción de biopelículas al promover la quelación del hierro. En este contexto, la adquisición de hierro en *P. aeruginosa* está asociada con los sideróforos, como la pioquelina y la pioverdina

(Ringel, & Brüser, 2018; Schalk & Guillon, 2013). La pioquelina (baja afinidad por el hierro) es sintetizada por enzimas codificadas en el grupo de genes *pchDCBA*. Por el contrario, los tipos de pioverdina (alta afinidad por el hierro) que codifican para grupos de genes *pvd*, que se encuentran ubicados en diferentes operones en la cepa PAO1, lo conforman alrededor de 20 proteínas reguladoras y estructurales (Moon, et.al., 2008). Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que explora la participación del gen *pvd* en la estructura de las biopelículas y la producción de fenazinas por un mecanismo dependiente de QS, en *P. aeruginosa*.

X. CONCLUSIÓN

Los genes *pvdI*, *pvdJ* y *pvdL* no suprimen la síntesis de PVD, lo que indica que módulos específicos en NRPS son funcionales o que podría ocurrir una redundancia de funciones. Además, las NRPS (*PvdI*, *PvdJ* y *PvdL*) están involucradas en la síntesis del sideróforo pioverdina, así como en la síntesis de fenazinas, las cuales afectan directamente la estructura de las biopelículas y el establecimiento de la bacteria en el hospedero de *P. aeruginosa* PAO1.

XI. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

Revista Digital Universitaria
Vol. 22, Núm. 3, mayo-junio 2021

Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*

Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García

Resumen

La comunicación se basa en un intercambio de información por medio de un lenguaje que va de un emisor hacia un receptor. Éste recibe el mensaje y puede o no emitir alguna respuesta en un determinado contexto. Actualmente, es posible establecer una comunicación sencilla, eficaz y rápida sin importar la distancia, ya que se cuenta con herramientas tecnológicas como dispositivos móviles que utilizan aplicaciones como WhatsApp, Facebook Messenger, Twitter, entre otras. Las bacterias tienen un sistema de comunicación muy similar a WhatsApp, conocido como Quorum Sensing (qs, percepción de cuórum). En este artículo se relatarán las semejanzas entre estos sistemas, pues diversas investigaciones han determinado al qs como un tipo de comunicación célula-célula, el cual desempeña un papel clave en la regulación de la expresión de genes de virulencia, en un sin número de patógenos bacterianos, ya que se producen y liberan pequeñas señales químicas conocidas como autoinductores, semejantes al lenguaje cibernético. Se ha visto que la bacteria patógena de humanos *Pseudomonas aeruginosa* utiliza este tipo de comunicación para modular la producción de factores de virulencia, lo que le permite provocar infecciones agudas y crónicas, en individuos inmunocomprometidos y en pacientes con fibrosis quística, lo que ocasiona que estas infecciones sean difíciles de erradicar con la administración de antibióticos convencionales. Por ello, es de suma importancia entender el papel del "WhatsApp" de la comunicación bacteriana, ya sea en individuos infectados o como mecanismo de control antibacteriano.

Palabras clave: quorum sensing, percepción de cuórum, comunicación bacteriana, virulencia, infecciones, bioluminiscencia.

COMMUNICATION BETWEEN BACTERIA: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA'S* WHATSAPP


Abstract

Communication is based on an exchange of information using a language, that goes from a sender to a receiver, which receives the message and can —or not— send some response in a determined context. Currently, it is possible to establish simple, efficient, and fast communication regardless of distance, since existing technological tools, such as mobile devices, use applications such as WhatsApp, Facebook Messenger, Twitter, and others. The bacteria have a communication system similar to WhatsApp, known as Quorum Sensing (qs). In this article, the similarities between these communication systems will be described. Several investigations have determined that qs is a type of cell-cell communication that plays a key role in regulation of virulence gene expression in different bacterial pathogens, due to the fact that it produces and releases small chemical signals called "autoinducers", and that these are similar to cybernetic language. The human pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* has been described to use this type of communication to modulate the production of virulence factors, provoking acute and chronic infections in immunocompromised persons and cystic fibrosis patients, causing infections to be difficult to eradicate with the supply of conventional antibiotics. Thus, it is important to understand the bacterial communication "WhatsApp" as an antibacterial control mechanism in infected individuals.

Keywords: quorum sensing, bacterial communication, infections, bioluminescence.

Recepción: 04/08/2020. Aprobación: 22/02/2021.

doi: <http://doi.org/10.22201/ruaieed.36076079e.2021.22.3.7>

Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Universidad Abierta, Innovación Educativa y Educación a Distancia (COUABED)
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia de Creative Commons 4.0 

"Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*"
Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García
Vol. 22, Núm. 3, mayo-junio 2021
Revista Digital Universitaria

Sharel Pamela Díaz Pérez

diazp.qfb@gmail.com
orcid.org/0000-0001-5921-575X

Maestra en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (icq-umich). Estudiante de Doctorado del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas (poci), opción Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Jesús Campos García

jesus.campos@umich.mx
orcid.org/0000-0002-8337-5830

Doctor en Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Profesor-Investigador Titular del Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (icq-umich). Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias A.C. (AMC) y del Sistema Nacional de Investigadores (nivel II). Premio Nacional de Investigación en Ciencias Naturales-2008 por la AMC, Premio Estatal de Investigación Científica y Humanística 2009 (Gobierno del Estado de Michoacán), inventor de la primera patente de la UNAM (2009), actualmente posee 4 títulos de patentes. Su trabajo de investigación trata sobre los mecanismos de interacción de *Pseudomonas aeruginosa* en el ambiente: mecanismos de degradación, biocombustibles, interacción huésped-patógeno y metabolitos con potencial biotecnológico.

"Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*"
 Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García
 Vol. 22, Núm. 3, mayo-junio 2021
 Revista Digital Universitaria

Introducción

Desde el origen de las civilizaciones, la comunicación entre individuos es un proceso indispensable para transmitir información e intercambiar ideas para desarrollar potencialidades. Este fenómeno tan cotidiano es importante tanto para seres humanos; plantas, animales, como para los microorganismos; para llevar a cabo funciones biológicas, tales como sobrevivir, adaptarse, crecer, reproducirse, etcétera.

Actualmente, se utilizan herramientas tecnológicas en tiempo real para la comunicación entre seres humanos, como el teléfono celular, con múltiples aplicaciones o *apps*. Tal es el caso de WhatsApp, una de las aplicaciones más populares, ya que es utilizada a nivel mundial por millones de personas. Por otro lado, los microorganismos unicelulares procariontes llamadas bacterias, han utilizado mecanismos de comunicación para poder reproducirse, emitir luz, incluso generar infecciones a humanos, animales y plantas (ver imagen 1).



Imagen 1. El WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*.
 Adaptación del logo de WhatsApp.

Una de las bacterias que posee un mecanismo de comunicación entre ellas es la especie de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria en humanos es patógena y oportunista, causa infecciones de vías respiratorias, lo que afecta el sistema respiratorio e inmunológico del hospedero, en el que la regulación de la comunicación entre sí está

asociada con la producción de múltiples factores de virulencia, que influyen en la colonización y patogenicidad (Lee y Zhang, 2015). Este sistema de comunicación bacteriano se denomina *censado* o *percepción de cuórum* (*quorum sensing*, QS), y es un mecanismo que regula la producción de factores de virulencia, los cuales son esenciales en la infección en humanos, animales y/o plantas, y, por lo tanto, en su patogenicidad.

Érase una vez, hace 41 años

El sistema de comunicación celular, QS, fue descubierto en dos especies bacterianas que viven en el mar, *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, debido a que en ambas se observó emisión de luz. Esta es observada en las playas llamadas *bioluminiscentes*, como Holbox en el Caribe mexicano (ver video 1). Dicha emisión de luz es producida por organismos dinoflagelados, los cuales son algas que viven en el fondo del mar y que contienen dos largas colas llamadas flagelos, que a su vez tienen enzimas denominadas luciferasas (producen luminiscencia). Esta

"Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*"
 Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García
 Vol. 22, Num. 3, mayo-junio 2021
 Revista Digital Universitaria

característica, naturalmente es utilizada por los organismos para confundir a sus depredadores, atraer pareja e incluso comunicarse. Existen microorganismos patógenos que utilizan este mecanismo para la comunicación, como son *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Papenfert y Bassler, 2016).



Video 1. Bioluminiscencia en playas (El rincón curioso, 2018)

Los creadores y administradores del grupo QS de *Pseudomonas aeruginosa*

La percepción o censo de cuórum (*quorum sensing*, QS) es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de la población celular, es decir, es el fenómeno que ocurre cuando existe un aumento de la población bacteriana y en consecuencia modifica la expresión de genes para activar mecanismos de control poblacional. Ahora bien, uno de los microorganismos en los que más se ha estudiado el QS es *Pseudomonas aeruginosa* (ver imagen 3) debido a que es una de las bacterias que causa infecciones durante la hospitalización de pacientes con un sistema inmunológico deficiente. *P. aeruginosa* pertenece al grupo de las bacterias gram negativas, tiene forma de bacilo (cilindro) y en medios de cultivo genera cierta coloración verde-azul, proporcionada por compuestos fenazínicos, llamados piocianina y pioverdina (Moradali et al., 2017). Además, es considerada como una de las bacterias más patógena en humanos, debido a que no existe un tratamiento efectivo que permita matarla por completo. Asimismo, se ha visto que el QS es un importante mecanismo de comunicación en esta bacteria, que le permite a evadir el sistema inmunológico y, por consiguiente, infectar principalmente pulmones, entre otros órganos (Papenfert y Bassler, 2016).

"Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*"
 Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García
 Vol. 22, Núm. 3, mayo-junio 2021
 Revista Digital Universitaria

conversación, o el inicio del *qs*, es el sistema *las*, que comienza a generar un mensaje cuando la enzima LasI produce la molécula señal N-3-oxododecanoil-homoserina lactona (OdDHL). Cuando ésta se genera a una determinada concentración, como escribir palabras y preguntas hasta completar un mensaje, se une con su regulador transcripcional (LasR), el cual funciona como un generador de conversación en el grupo de "WhatsApp", siendo de esta manera capaz de enviar el mensaje a la conversación. Posteriormente, los administradores *rhl* y *pqs* entrarán a la conversación. Con lo cual, *rhl* entra en actividad (o en línea) y, de la misma manera que el administrador *las*, su enzima RhlI produce su autoinductor o molécula señal N-butirilhomoserina lactona (*BHL*) (Ahator y Zhang, 2019). Al generarse acumulación de estas moléculas señal, a similitud en una conversación, se generan los mensajes y estos se unen al modulador de la conversación (RhlR); el cual, a su vez, evitará el envío del mensaje al sistema *pqs* (por sus siglas en inglés,

Pseudomonas Quinolone Signal). RhlR actúa como un moderador dentro del grupo para que no se generen controversia o saturación de mensajes, ya que *pqs* es el participante que reenvía mensajes no deseados, tales como videos o cadenas que no son útiles para la comunicación. Cabe destacar que los sistemas *las* y *rhl* fueron los primeros en descubrirse y son los sistemas clave involucrados en la regulación de procesos fisiológicos, así como la virulencia de *P. aeruginosa*. Sin embargo, el sistema *las* es la cabeza del

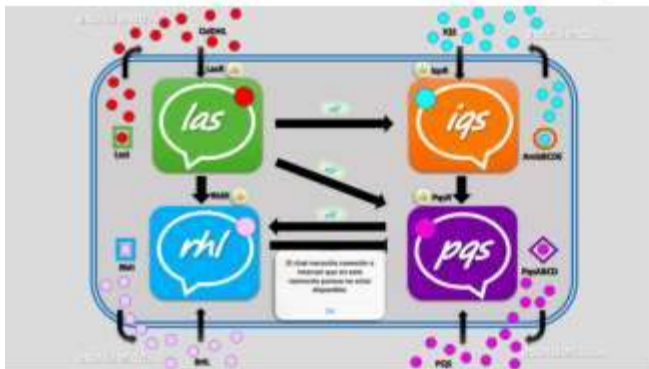


Imagen 3. La comunicación por WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptación de circuito de Lee y Zhang, 2013.

grupo a nivel jerárquico, por lo que le correspondería ser considerado como el creador del "WhatsApp" utilizado por la bacteria *P. aeruginosa*. Asimismo, el tercer sistema *pqs*, inducido a mensajear por el modulador de conversaciones *las*, retroalimenta la conversación para activar a los participantes del grupo, como a *rhl* y conectar así con los 3 módulos de señalización; por lo que éste actúa como el participante "zen" en este grupo, o bien el que siempre desea los buenos días a todos los integrantes y llena de stickers el grupo de WhatsApp. El sistema *pqs* selecciona stickers a través de un grupo de genes conocidos como PqsABCD, gracias a la participación de su autoinductor denominado *pqs* (2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-Quinolona) (Ahator y Zhang, 2019). Finalmente, existe una cuarta señal que actúa en caso de que exista un ambiente de estrés, para generar un ambiente armónico, proporcionando la "buena vibra", *iqs*, donde las enzimas AmbBCDE son las generadoras de la molécula señal *iqs* [2-(2-hidroxifenil) tiazol-4-Carbaldehído] al unirse a su moderador *IqsR* (Lee *et al.*, 2013).

"Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*"
 Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García
 Vol. 22, Núm. 3, mayo-junio 2021
 Revista Digital Universitaria

Las funciones del "WhatsApp" de *Pseudomonas aeruginosa*

Ahora bien, es importante conocer las consecuencias de esta comunicación de "WhatsApp" en *P. aeruginosa*. Una de las funciones más importantes que ejerce el principal administrador de este circuito, *las*, es generar mecanismos para crecer y multiplicarse, de tal forma que crean una red de comunicación tan grande que, en conjunto, es esencial para el proceso de infección bacteriana en cualquier órgano o tejido del individuo; este fenómeno en la ciencia es denominado *formación/producción de biopelículas microbianas*.



Imagen 4. Grupo de "WhatsApp" de *Pseudomonas aeruginosa*.

Por otro lado, el sistema *rhl* regula la producción de enzimas y componentes celulares que favorecen el establecimiento de la infección, con lo que se llegan a destruir tejidos. Asimismo, el sistema *pqs* se encarga de modular la producción tanto de biopelículas microbianas como de un compuesto que es utilizado para evadir el sistema inmunológico y que ocasiona la coloración azul-verde característica de la bacteria *P. aeruginosa* cuando es crecida en medios de cultivo, denominado *piocianina* (Moradali *et al.*, 2017). Estas son algunas de las consecuencias que se generan de este grupo de WhatsApp para regular la producción de factores de virulencia, asociados con la patogenicidad de esta bacteria durante los procesos de infección para el ser humano. Sin embargo, no toda la regulación de esta comunicación tiene como consecuencia ejercer algún daño. Estos administradores de grupos de "WhatsApp" en otras bacterias regulan también la producción de antibióticos, bioluminiscencia, así como la síntesis de compuestos de interés biotecnológico y terapéutico.

Conclusiones

La comunicación bacteriana es tan importante como la comunicación que generamos en las redes sociales y aplicaciones como WhatsApp. Como podrás darte cuenta, dicha comunicación es necesaria para la bacteria de *P. aeruginosa* en el control/modulación de la producción de factores de virulencia, que favorecen las infecciones microbianas en humanos, animales y plantas. Sin embargo, no todo lo generado en esta comunicación o grupo de "WhatsApp" es

"Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*"
 Sharel Pamela Díaz Pérez y Jesús Campos García
 Vol. 22, Núm. 3, mayo-junio 2021
 Revista Digital Universitaria

daño; por el contrario, también se pueden generar moléculas benéficas que ayuden a combatir ciertas enfermedades, como el cáncer. Debido a ello es de interés científico y médico conocer a detalle cómo se comunican las bacterias en sus particulares grupos de "WhatsApp" para generar nuevo conocimiento que contribuya con el establecimiento de tratamientos terapéuticos más eficientes para el combate de las infecciones microbianas.

Referencias

- ◊ Ahator, S. D., y Zhang, L. (2019). Small Is Mighty—Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual review of microbiology*, 73, 559-578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>
- ◊ El rincón curioso. (2018, 19 de septiembre). *5 PLAYS INCREIBLES: que se ILLUMINAN en la OSCURIDAD* [video]. YouTube. https://youtu.be/jg_dBoAG1o
- ◊ Oosthuizen, J. (2013). [*Pseudomonas aeruginosa* bacteria]. Centers for Disease Control. <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=16870>
- ◊ Lee, J., y Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 30-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- ◊ Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P. y Zhang, L. H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature chemical biology*, 9(5), 339-343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- ◊ Marquina Díaz, D., y Santos de la Sen, A. (2011). Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología)*, 3(5), 39-55. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/820/835>
- ◊ Moradali, M. F., Ghods, S., y Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7(39), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- ◊ Papenfort, K., y Basler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576-588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- ◊ Soberón, G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa*. En E. Martínez Romero y J. C. Martínez Romero (Eds.), *Microbiología en línea* (cap. 3). <http://www.bibicoweb.tic.unam.mx/ibros/microbios/Cap3/>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

- ◊ Díaz Pérez, Sharel Pamela y Campos García, Jesús. (2021, mayo-junio). Comunicación entre bacterias: el WhatsApp de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Digital Universitaria* (RDU), 22(3). <http://doi.org/10.22201/rualeed.16076079e-2021.22.3.7>

XII. RESULTADOS NO PUBLICADOS.

12.1. Efecto en la producción de estructura y dinámica de biopelículas en mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa*.

Para el establecimiento de la infección bacteriana es necesaria la producción de biopelículas, ya que de esta manera el hospedero puede colonizarse y conferir resistencia a los antimicrobianos (Breidenstein et al., 2011). Se pueden formar biopelículas en equipos médicos insertados, como catéteres y tubos endotraqueales (Veesenmeyer et al., 2009), y se ha propuesto que *P. aeruginosa* puede crecer como una biopelícula en los tejidos/superficies epiteliales del hospedero durante infecciones crónicas, particularmente en la FQ pulmón (Bjarnsholt et al., 2010).

Asimismo, *P. aeruginosa* regula la producción de biopelícula a través del QS al producir altos niveles de autoinductor perteneciente a las acilhomoserina lactonas (AHL), el cual interactúa con las células hospedero para estimular la producción de diversos mediadores de la respuesta inmune innata (Smith & Iglewski, 2003). De esta forma continuamos determinando la producción de biopelícula in vitro de las cepas mutantes simples y dobles en NRPS (Figura 10A), de esta manera se determinó que la cepa $\Delta lasI/\Delta rhII$ no produce biopelícula, por lo que nuestro control negativo, las otras cepas produjeron una biopelícula similar a la de la cepa WT; sin embargo, la cepa $\Delta pchF/\Delta pvdJ$ produjo una gran cantidad de biopelícula duplicando el valor de la cepa WT. Estos datos sugieren que, estos genes podrían estar regulando la producción de biopelículas en *P. aeruginosa*.

Alternativamente, los ramnolípidos son importantes para el mantenimiento de la arquitectura de las biopelículas y la motilidad bacteriana (Wittgens et al., 2011), por lo que determinamos la producción de ramnolípidos in vitro con el método indirecto orcinol (Figura 10B). Determinamos que todas las cepas mutantes simples y dobles produjeron ramnolípidos de manera similar e incluso se duplicaron o triplicaron en comparación con la cepa WT. Sin embargo, la cepa $\Delta ambE/\Delta pvdJ$ redujo considerablemente la producción de estos tensioactivos, al igual que la cepa $\Delta lasI/\Delta rhII$. Por tanto, este factor de virulencia puede estar regulado por este tipo de genes pertenecientes al NRPS.

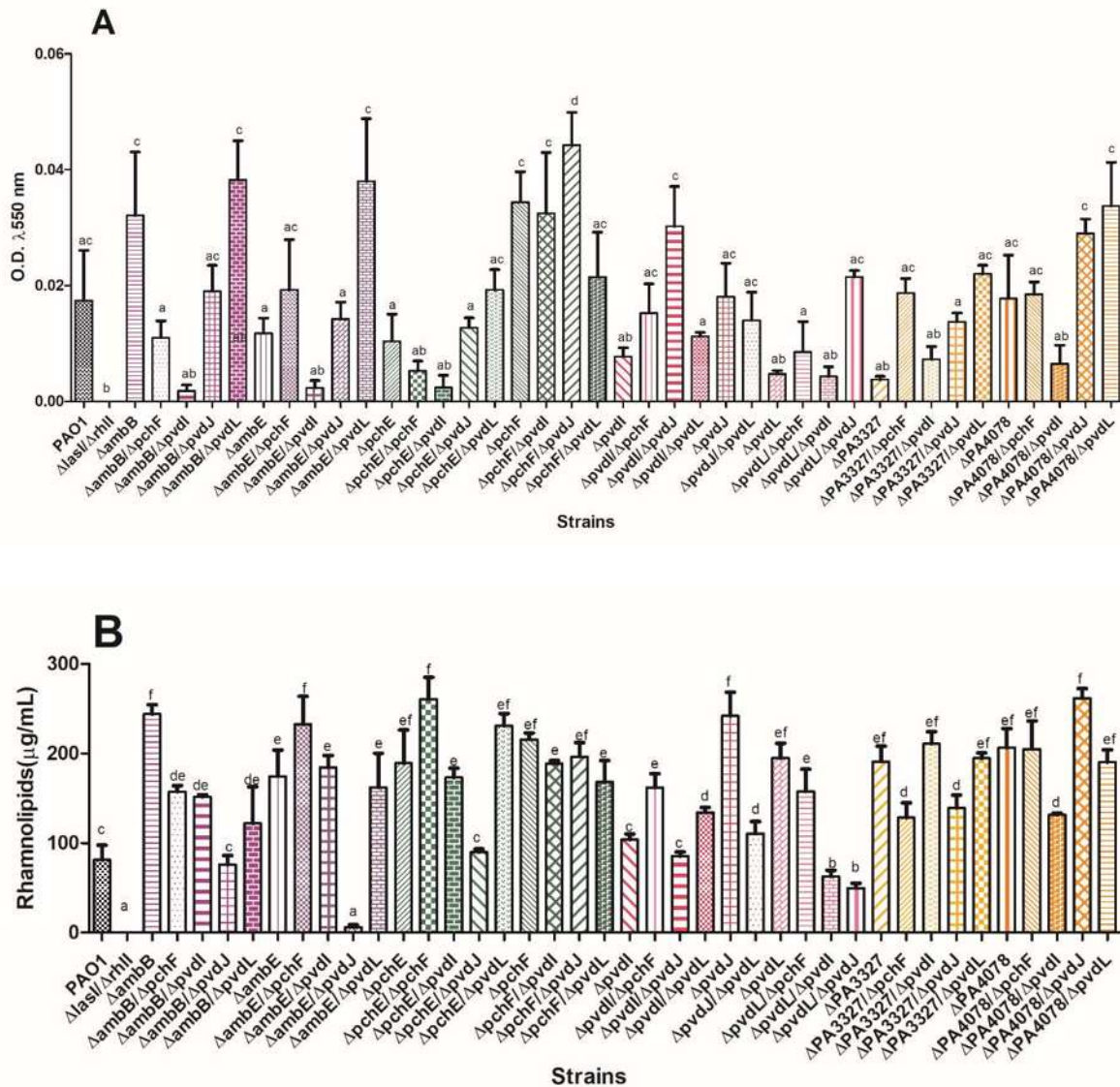


Figura 10. NRPS en *P. aeruginosa* regula la producción y estructura de biopelículas.

Las diferentes cepas de mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa* se inocularon en placas de 96 pocillos para cuantificar la producción de biopelícula (A). Tras 48 h de incubación a 37°C, se tiñeron con cristal violeta y se cuantificó la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 550 nm. (B) Cuantificación de rhamnolípidos de sobrenadantes mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa* (48 h). Los rhamnolípidos se identificaron por el método del orcinol y se cuantificaron en comparación con la curva de ramosa. Las barras representan cinco experimentos independientes que se realizaron en las mismas condiciones. Las letras minúsculas diferentes representan diferencias estadísticas significativas (prueba ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey; $p \leq 0,05$).

12.2. Producción de mecanismos de evasión inmune en mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa*.

Se ha demostrado que el quorum sensing de *P. aeruginosa* juega un papel dual en la modulación de la respuesta inmune, porque tanto el sistema como las moléculas pueden estimular o inducir la respuesta del hospedero (Kariminik et al., 2017). Uno de los mecanismos que utiliza la bacteria para evadir la respuesta inmunitaria es la producción de proteasa alcalina, que inactiva componentes clave del sistema inmunitario, siendo crucial para la invasión del tejido del hospedero (Hoge et al., 2010; Laarman et al., 2012).

Por lo tanto, la determinación de la proteasa alcalina la realizamos de manera semicuantitativa, donde, como se puede observar en la Figura 11A, todas las cepas produjeron cantidades similares o iguales de este factor de virulencia en comparación con la cepa WT. Obteniendo así que ninguno de los genes NRPS evaluados están regulando la producción de este factor de virulencia.

Además, investigaciones recientes han demostrado que la producción de elastasa por parte de las bacterias conduce a la degradación de proteínas como la elastina, el colágeno y la fibrina, lo que provoca daños en los tejidos del hospedero y, por lo tanto, aumenta una invasión e infección graves (Hoge et al., 2010). De esta forma, realizamos la cuantificación de elastasa in vitro (Figura 11B). Demostrando que no hay diferencias significativas con mutantes simples o dobles en comparación con la cepa WT, sin embargo, la cepa $\Delta lasI/\Delta rhII$ redujo significativamente la producción de este factor de virulencia.

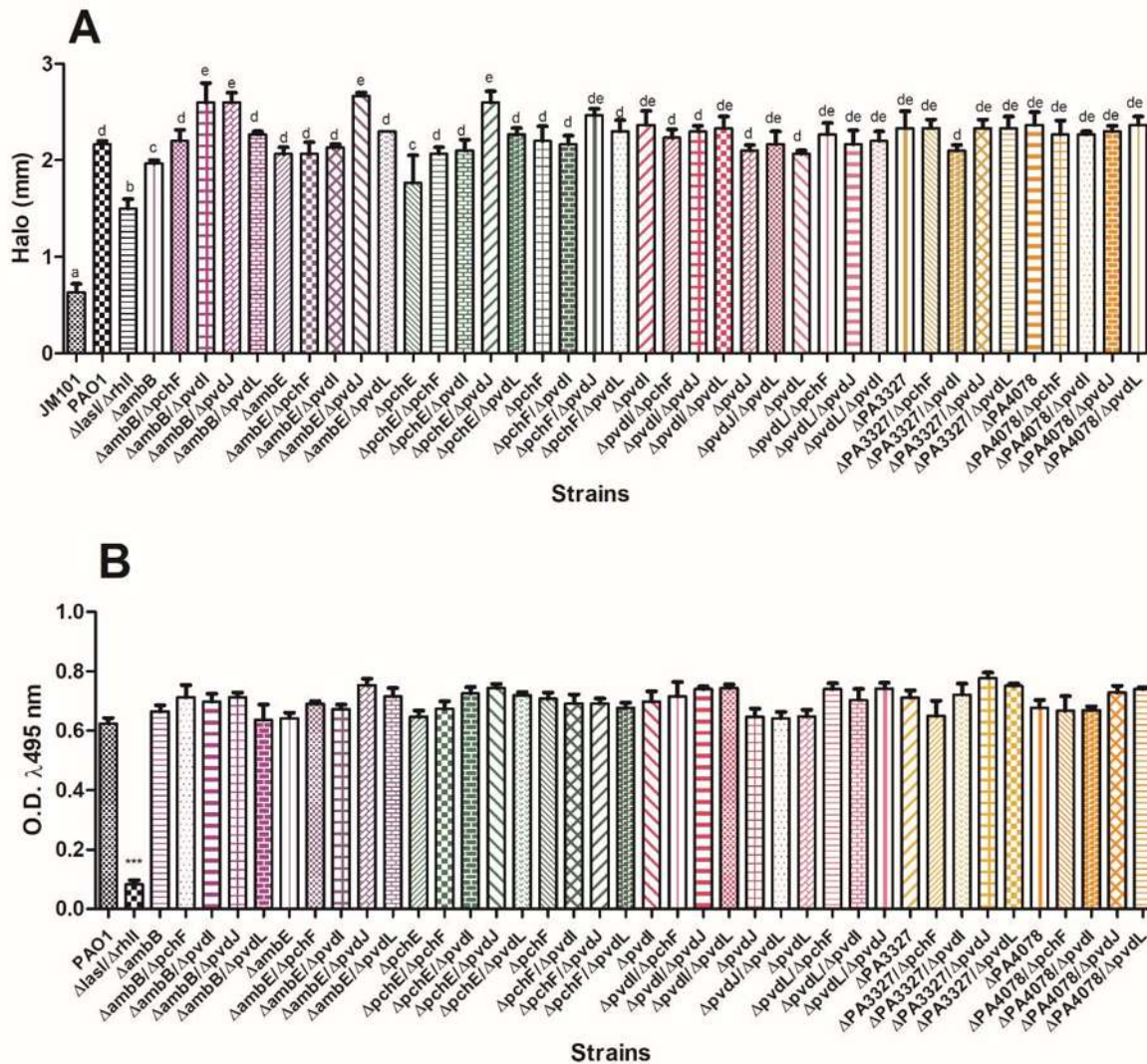


Figura 11. Los mecanismos de evasión inmune de *P. aeruginosa* no son modificados por los NRPS.

Se utilizó un método semicuantitativo para cuantificar la producción de proteasa alcalina (A). A las cepas mutantes en NRPS de *P. aeruginosa* se les ajustó la densidad OD600 = 0.1, permitiéndoles crecer a 37°C por 48h, en el medio YES y posteriormente teñiéndolas con azul de Coomasie. Se midió el halo, el cual define la actividad proteasa de la bacteria (A). Las barras representan cuatro experimentos independientes que se realizaron en las mismas condiciones. Las letras minúsculas diferentes, representan diferencias estadísticas significativas (prueba ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey; $p \leq 0,05$). Los sobrenadantes libres de células de 48 h de mutantes relacionados con NRPS de *P.*

12.4. Los mecanismos de eliminación de hierro por sideróforos en mutantes en NRPS de *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* se ha demostrado que la quelación del hierro es una parte vital para el establecimiento de la infección y la progresión hacia una infección crónica, ya que el ambiente del hospedero tiene pequeñas moléculas de hierro libre debido a sus propias moléculas de secuestro como la lactoferrina y transferrina. Los sideróforos, la pioquelina y la pioverdina, pueden secuestrar el hierro de los depósitos del hospedero y actuar como una molécula de señalización (Gellatly & Hancock, 2013); de esta manera es crucial para el establecimiento de la infección.

Debido a que es un factor importante para el establecimiento de la infección por *P. aeruginosa* en el hospedero, cuantificamos la producción de pioquelina (Figura 13A). Asimismo, nuestros resultados demuestran que las cepas mutantes (sencillas y dobles) produjeron cantidades similares de pioquelina en comparación con la cepa WT; sin embargo, dos cepas, $\Delta ambB$ y $\Delta ambB/\Delta pvdJ$, produjeron la mitad de la cepa WT; mientras que solo la cepa $\Delta pvdJ/\Delta pvdL$ duplicó la cantidad producida por la cepa WT. Por tanto, los genes NRPS regulan la producción de este sideróforo en *P. aeruginosa*.

Además, evaluamos la producción de otro sideróforo, la pioverdina, porque se ha visto que la bacteria prospera en un ambiente pobre en hierro en los pulmones de los ratones al inicio de la infección y que los sistemas individuales de captación de hierro tienen diferentes capacidades para promover la enfermedad letal en ratones, según la siguiente jerarquía: pioverdina > pioquelina > captación de hierro ferroso = captación de hemo (Minandri *et al.*, 2016). Como se puede observar, en la Figura 13B, existe un aumento o similitud en la producción de pioverdina en las cepas mutantes (sencillas o dobles) en comparación con la cepa WT. Si comparamos los dos gráficos, podemos ver que puede haber competencia en los sistemas de adquisición de hierro, por lo que en algunos mutantes en la producción de pioquelina aumenta la producción de pioverdina disminuye y al revés, por lo que los mutantes relacionados con *P. aeruginosa* NRPS regulan la producción de sistemas de adquisición de hierro.

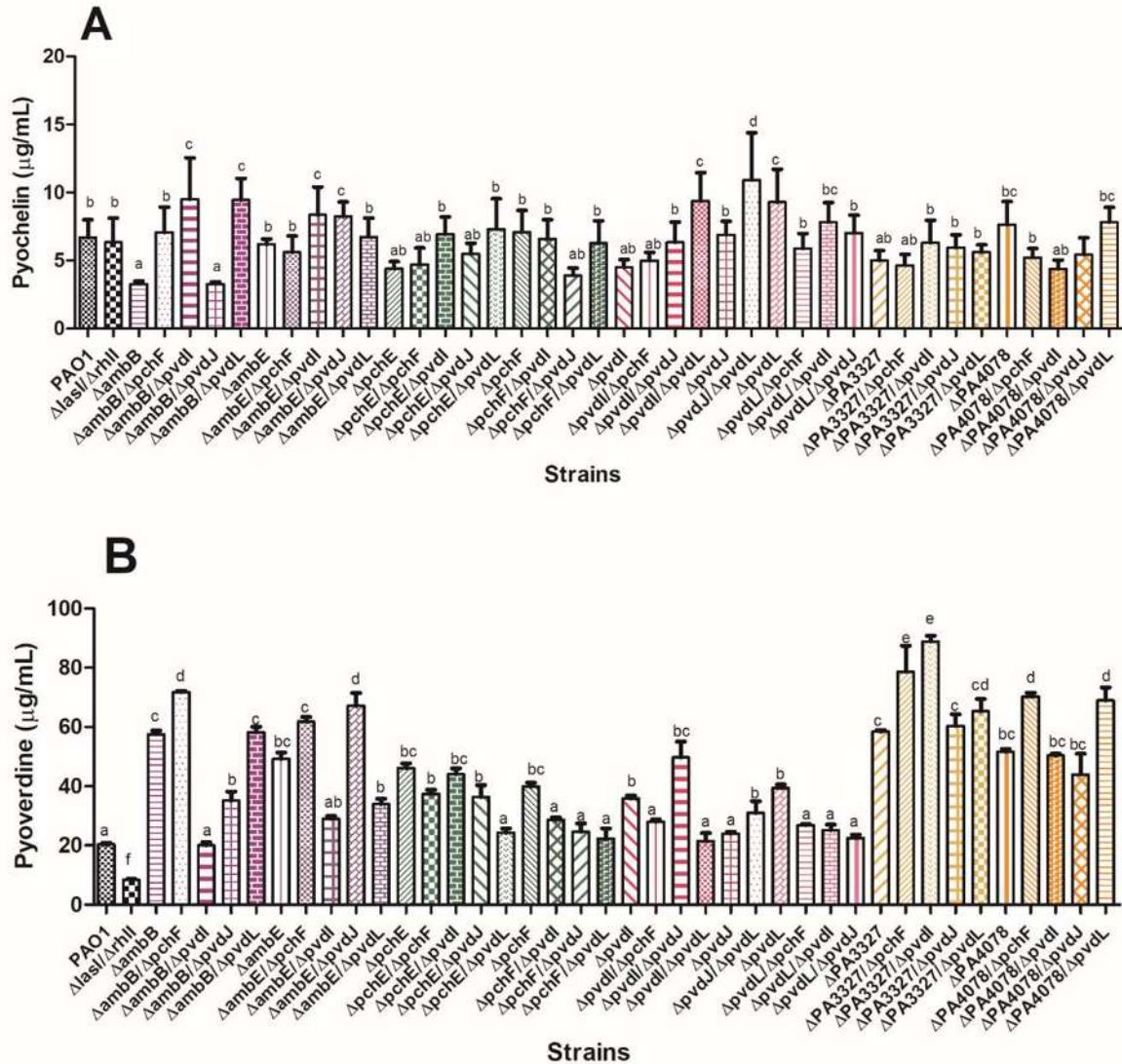


Figura 13. Relación de la producción de pioquelina y pioverdina de los mutantes en NRPS de *P. aeruginosa*.

Se usaron los sobrenadantes libres de células de 48 horas de los mutantes NRPS de *P. aeruginosa*. La pioquelina (A) y la pioverdina (B) se cuantificaron por espectrofotometría según la ley de Beer-Lambert, con el coeficiente de extinción molar. Las letras minúsculas diferentes representan diferencias estadísticas significativas (prueba ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey; $p \leq 0,05$).

12.5. Determinación de la viabilidad en *C. elegans* con los sobrenadantes mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa*.

Caenorhabditis elegans se usa actualmente como un modelo para desarrollar ensayos de infección para varias especies bacterianas, incluida *P. aeruginosa* (Powell & Ausubel, 2008). Asimismo, se ha descrito que *P. aeruginosa* PAO1 paraliza y mata rápidamente al nematodo *C. elegans*. Esta muerte, denominada muerte parálitica, está mediada por un factor difusible que está bajo el control de los reguladores de detección de quórum LasR y RhIR (Darby et al., 1999). Por lo tanto, los sobrenadantes sin células de los mutantes de NRPS se usaron y monitorearon durante 48 horas (Figura 5A). El gráfico muestra que WT PAO1 es más virulento que el doble mutante, sin embargo, de todos los mutantes, ninguno es más virulento que WT. Asimismo, en los dobles mutantes, especialmente de los genes *pvd*, la virulencia disminuye. Entonces, estos genes participan en la regulación de la virulencia en *C. elegans*.

Además, el sistema inmunitario innato humano comparte muchas características con el de *C. elegans*, a pesar de las vías de respuesta inmunitaria relativamente simples de este último. Se ha demostrado que los lipopolisacáridos juegan un papel importante en la estimulación del sistema inmunológico, ejerciendo un efecto tóxico, entre otras funciones, además de ser un componente importante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas; el cual, está compuesto por una parte lipídica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos (Matsuura, 2013). Por ello, se extrajeron y cuantificaron los lipopolisacáridos de las diferentes cepas (Figura 5B), obteniendo los siguientes resultados: PAO1 WT obtuvo el doble de producción en comparación con el doble mutante $\Delta lasI/\Delta rhII$, mientras que los otros mutantes obtuvieron una cantidad similar que las dos cepas, más no así para los dobles mutantes $\Delta pchF/\Delta pvdJ$ y $\Delta pchF/\Delta pvdL$ que tienen menor cantidad de LPS en su membrana, por lo que podrían estar evadiendo la respuesta inmune en el nematodo, ya que no mostraron toxicidad en este modelo.

12.6. Relación en mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa* con el quorum sensing.

Recientemente, se ha descubierto el efecto de mutantes simples sobre el NRPS putativo donde se podría demostrar que estos genes afectan la respuesta QS-AHL (González et al., 2017). Para determinar si estas mutaciones en NRPS afectan la regulación de QS en la bacteria, afectando principalmente la síntesis de AHL (Figura 15), el sobrenadante de 48 h de cada cepa se colocó con la cepa biosensora que emite luz al detectar AHL durante 4 horas, obteniendo que para la cepa control qscr que regula la síntesis de AHL se observa que produce menos cantidad que PAO1, no así para la cepa doble mutante que produce menos del 20% que produce la cepa PAO1. Además, se observa que cada uno de los genes produce una menor cantidad de luminiscencia que la cepa mutante PAO1, no así en el caso de las cepas en $\Delta pvdL$ $\Delta pchF$, $\Delta PA4078$ simples. Determinando que existe una modulación de estos genes implicados en la producción de NRPS con respecto a la señalización QS.

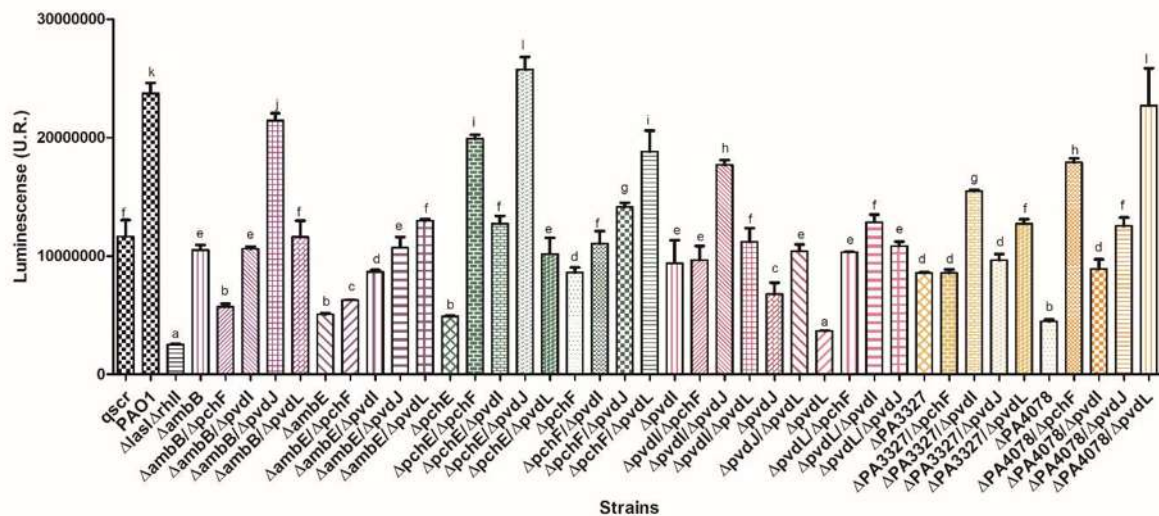


Figura 15. Generación de bioluminiscencia en el biosensor dependiente de AHL por mutantes NRPS de *P. aeruginosa*.

Sobrenadantes libres de células de los mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa* de 48 h. Se utilizó la cepa reportera de *E. coli* JM109, transformada en el plásmido pSB1075, que produce bioluminiscencia en respuesta a 3-oxo-C12-HSL. Las barras representan tres experimentos independientes que se realizaron en las mismas condiciones. Letras minúsculas diferentes representan diferencias estadísticas significativas (prueba ANOVA unidireccional y prueba post-hoc de Tukey; $p \leq 0,05$; $n=5$).

12.7. Producción de CDP en mutantes relacionados con NRPS de *P. aeruginosa*.

La regulación del QS está implicada en la producción de varios factores de virulencia, y también se ha visto que ciertas moléculas pueden regular la señalización del QS, que se han identificado como Ciclodipéptidos (CDPs). Además, se ha visto que los NRPS están asociados a la biosíntesis de estas moléculas de CDP (González et al., 2017). Por lo tanto, era de nuestro interés evaluar si la mutación de dos NRPS está involucrada en la producción de estos CDP. Se cuantificó la producción de Ciclo (L-Pro-L-Phe) (Figura 16A), Ciclo (L-Pro-L-Val) (Figura 16B) y Ciclo (L-Pro-L-Tyr) (Figura 16C). Se observó que para la cuantificación de Ciclo (L-Pro-L-Phe) (Figura 16A) no se observaron diferencias con respecto a la cepa WT, sin embargo, las cepas $\Delta ambB$, $\Delta pvdJ$ y $\Delta PA4078$ disminuyeron la producción de esta CDP. También se determinó que para Ciclo (L-Pro-L-Val) (Figura 16B), de igual manera no se obtuvieron diferencias con respecto a WT, aunque la deformación en $\Delta ambB$ está disminuida en la producción de esta CDP. De la misma manera, se analizó el Ciclo (L-Pro-L-Tyr) (Figura 16C), donde se observó que $\Delta pchF$ aumenta hasta el doble que la cepa silvestre, mientras que $\Delta pchE/\Delta pvdJ$ y $\Delta PA4078$ las cepas disminuyeron la producción de esta CDP, así como las cepas $\Delta ambB$, $\Delta ambB/\Delta pvdJ$, $\Delta ambE/\Delta pvdJ$, $\Delta pchE/\Delta pvdL$, $\Delta pvdI/\Delta pchF$, $\Delta pvdL/\Delta pvdJ$, $\Delta PA3327$, $\Delta PA3327/\Delta pchF$, $\Delta PA3327/\Delta pvdL$, $\Delta PA4078/\Delta pchF$ y $\Delta PA4078/\Delta pvdJ$. Sorprendentemente, en las tres CDPs se ve afectada al disminuir la producción de estas en $\Delta ambB$, por lo que la biosíntesis de estos compuestos podría estar relacionada.

Se continuó evaluando si estos NRPS están involucrados en la regulación del sistema IQS en el QS. Por lo que, evaluamos la producción del autoinductor IQS en HPLC (Figura 17), y se observó que $\Delta PA4078/\Delta pvdL$ disminuye la producción de esta molécula. Mientras que $\Delta ambB/\Delta pvdJ$, $\Delta ambE$, $\Delta pchE$, $\Delta pchE/\Delta pchF$, $\Delta pchF$, $\Delta pchF/\Delta pvdL$ disminuyeron la producción. También se observa que el grupo de $\Delta pchF$'s disminuye a la mitad la producción de esta molécula, con lo que el gen *pchF* puede estar participando en la regulación del sistema IQS en el QS. Además, se observa que estos NRPS participan en la regulación del sistema IQS.

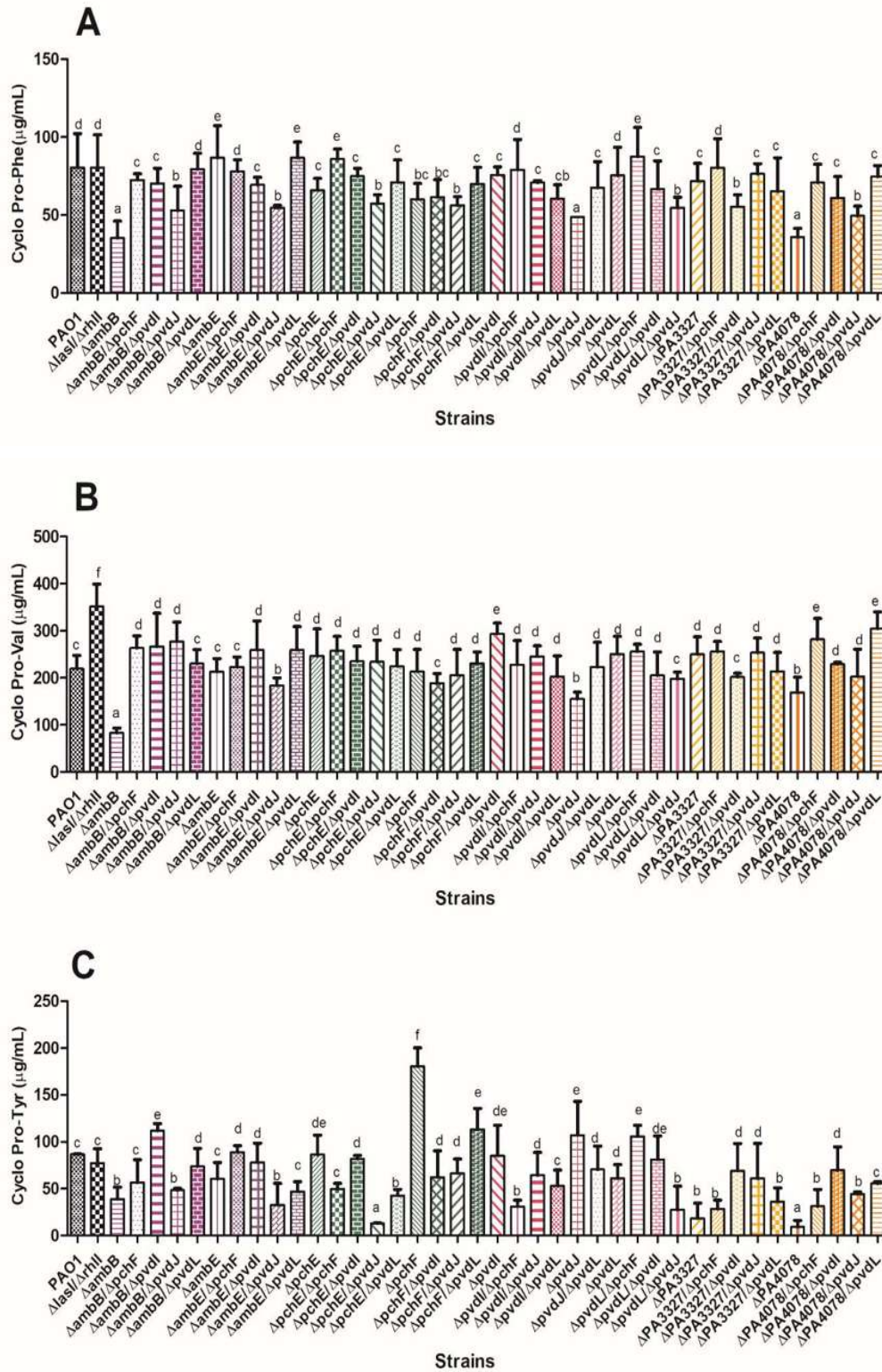


Figura 16. Producción de ciclodipeptidos en cultivos de mutantes NRPS de *P. aeruginosa*.

Los picos de las áreas correspondientes a cada CDP se obtuvieron por HPLC producido por las diferentes cepas a las 48h, luego se continuó con una curva para cuantificarlos y expresarlos en $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de Ciclo-L-Pro-L-Phe (A), Ciclo-L-Pro-L-Val (B) y Ciclo-L-Pro-L-Tyr (C) fueron analizados y la confirmación de las estructuras fue posteriormente realizado por GC-MS. Se realizó la prueba ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n = 3$. Los valores para SE ($p \leq 0.05$) se muestran en minúsculas.

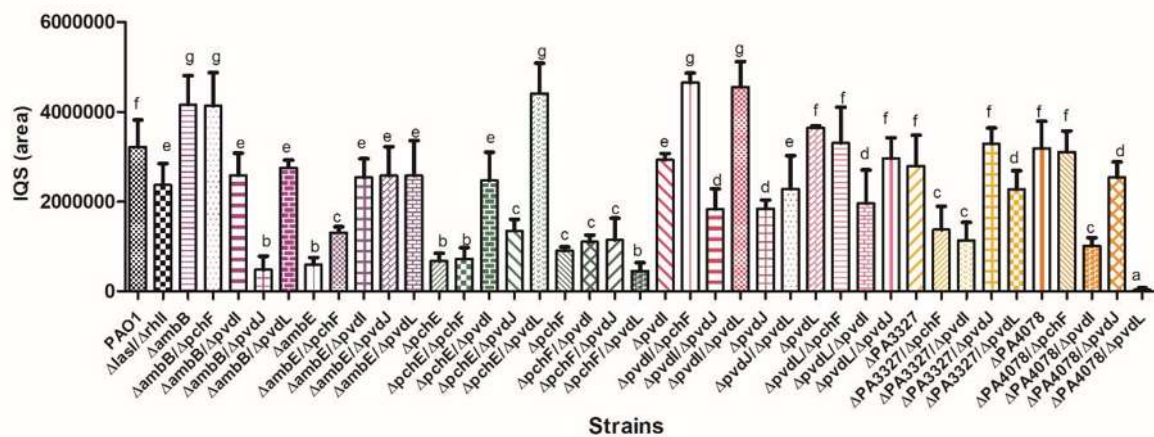


Figura 17. Efecto de la participación de NRPS en la regulación de QS en *P. aeruginosa*.

Se volvió a utilizar el extracto de la mezcla de CDPs y se continuó cuantificando por HPLC la producción del autoinductor IQS perteneciente a la señal integrada de detección de quórum (IQS). Las barras representan cuatro experimentos independientes que se realizaron en las mismas condiciones. Las letras minúsculas diferentes representan diferencias estadísticas significativas (prueba ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey; $p \leq 0,05$).

12.8. Correlación de factores de virulencia respecto a la producción de CDPs por mutantes en NRPS de *P. aeruginosa*.

Debido a la gran cantidad de datos obtenidos respecto a la producción de factores de virulencia, así como a la producción de CDPs, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), el cual, permite describir un conjunto de datos correlacionando tanto las mutantes, como los diferentes factores de virulencia. Como se observa en la Figura 18, el círculo rojo muestra las cepas que producen menor cantidad de factores de virulencia diferente a la WT y que producen menor cantidad de Quinolona, así como de CDPs; sin embargo, producen la misma cantidad de Ciclo- L-Pro-L-Tyr, que si comparamos con la producción de biopelículas que también está contenida en el círculo y que se ha visto, que el aumento de la producción de biopelículas aumenta la capacidad infectiva de la bacteria en el hospedero (Brindhadevi, 2020), por lo que podríamos sugerir que el ciclodipéptido Ciclo- L- Pro-L- Tyr podría estar relacionado con el aumento de toxicidad de *P. aeruginosa*. Mientras que, las mutantes englobadas en círculo negro, son las que tienen mayor diferencia vs la cepa WT y la doble mutante en *lasI/rhII*, aunque los factores de virulencia no estuvieron fluctuando con diferencias significativas. Por otro lado, las mutantes contenidas en el círculo azul están involucradas con la producción de ramnolípidos y pioverdina, además que producen menor cantidad de estos factores de virulencia relacionando con la doble mutante avirulenta, $\Delta lasI/\Delta rhII$. Por lo anterior, existe una gran variabilidad en la producción de factores de virulencia relacionados con la producción de ciclodipéptidos, sin embargo, es de relevancia que el ciclo L-Pro-L-Tyr podría estar involucrado en el aumento de la producción de biopelículas, que está relacionada con el inicio de la infección al hospedero en *P. aeruginosa*.

12.9. Efecto de las NRPS de *P. aeruginosa* en la virulencia en *Mus musculus*.

Para determinar si las mutantes en NRPS generan mayor patogenicidad en ratones hembra Balb/c sanos, se inocularon 1×10^8 UFC de cada una de las distintas cepas, vía intranasal. Estos ensayos fueron realizados de acuerdo con los procedimientos de la NOM-062-ZOO-1999, tanto para el manejo como el cuidado de los ratones.

Únicamente, se inocularon las cepas de *P. aeruginosa* WT PAO1, $\Delta lasI/\Delta rhII$, $\Delta ambB$, y $\Delta ambB/\Delta pvdL$, estas últimas dos cepas fueron elegidas porque se observó con los resultados obtenidos que $\Delta ambB$, generó mayor producción de factores de virulencia y quinolona, sin embargo, disminuyó la producción de ciclodipéptidos. Mientras que, la doble mutante $\Delta ambB/\Delta pvdL$, en el estudio de correlación fue la que se aisló de los 3 círculos, debido a que tiene mayor diferencia respecto a la producción de factores de virulencia, así como de ciclodipéptidos, y relacionando con los datos obtenidos, fue la que produce mayor toxicidad en *C. elegans*, además de que produce mayor cantidad de biopelículas, que son importantes para que *P. aeruginosa* genere patogenicidad.

Por lo anterior, se prosiguió a evaluar a los ratones por 15 días post-infección. Se tomó la temperatura corporal de los ratones (Figura 19A), ya que es un indicador importante del establecimiento de la infección, el cual, fue tomado usando un termómetro infrarrojo en el abdomen. Numerosos estudios han mostrado que las temperaturas altas que produce el cuerpo, mejoran la respuesta inmune, aumenta la movilidad y actividad de los leucocitos, estimula la producción de interferones, produce la activación de los linfocitos-T, por lo que, la respuesta inmune se activa al aumentar la temperatura corporal. Como se puede apreciar en la Figura 19A, la temperatura de los ratones se mantuvo entre los 35-36°C, indicando que no hubo respuesta inmune por parte de los ratones, debido a que la temperatura corporal normal de los ratones Balb/c es de 35-37°C.

A la par, se monitoreo el peso de los ratones post-infección (Figura 19B), como podemos observar, el peso se mantuvo por el transcurso de la infección. Asimismo, se evaluó la supervivencia de los ratones (Figura 19C) observando que, el 100% de los ratones inoculados con la doble mutante $\Delta lasI/\Delta rhII$ hasta el día 28, al día 18 sólo sobrevivió el 70% de los ratones inoculados con la PAO1, mientras que a los 23 días post-infección únicamente sobrevivieron el 70% de los ratones infectados con la doble mutante $\Delta ambB/\Delta pvdL$, y al día 25 se observó una disminución de la supervivencia de los ratones inoculados con la cepa $\Delta ambB$, de un 30%. Estos datos indican, que se necesita inocular cantidades muy altas, para que la infección con estas cepas inicie.

Consecuentemente, para determinar que realmente las UFC infectaron a los pulmones, se sacrificaron los ratones para determinar la carga bacteriana de los pulmones infectados. Se removieron asépticamente y se homogenizaron de forma individual mediante homogenizador, en 1 mL de PBS estéril. Se tomó 20 μ L de este homogéneo y se realizaron diluciones decimales seriadas de las que se sembraron 20 μ L en placas Petri con medio LB. Como se puede observar en la figura 19D, la carga bacteriana es similar en cada uno de los pulmones, por lo que la infección llegó a los pulmones, sin embargo, no fue suficiente para que se diseminará a los órganos, a los 30 días post-infección.

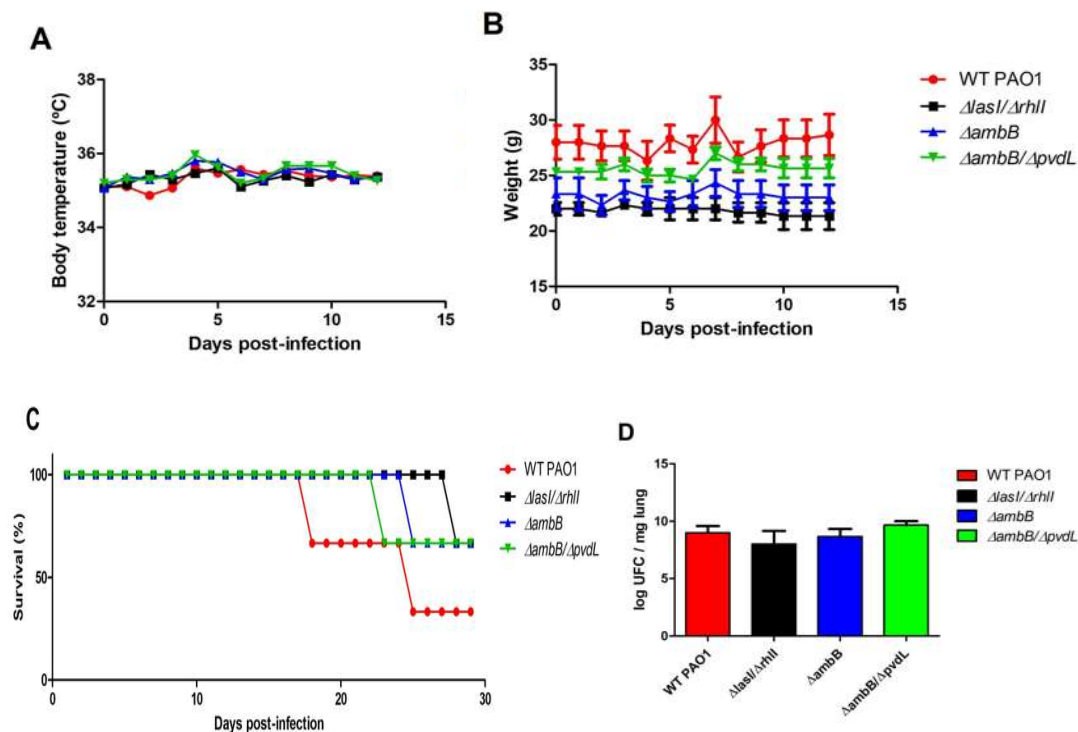


Figura 19. Efecto de la participación de NRPS de *P. aeruginosa* en la supervivencia en ratones.

(A, B, D) Las barras representan cuatro experimentos independientes que se realizaron en las mismas condiciones. Las letras minúsculas diferentes representan diferencias estadísticas significativas (prueba ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey; $p \leq 0,05$). Se inocularon por vía intranasal 1×10^8 UFC de las cepas las cepas de *P. aeruginosa* WT PAO1, $\Delta lasI/\Delta rhII$, $\Delta ambB$, y $\Delta ambB/\Delta pvdL$ en cada ratón Balb/c de 10-12 semanas de edad. N=6 para cada grupo, se repitió el experimento 3 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$.

XIII. REFERENCIAS

- 1) Ahator, S. D., & Zhang, L. (2019). Small Is Mighty—Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 559–578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>
- 2) Ankenbauer, R., Hanne, L. F., & Cox, C. D. (1986). Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdinin production. *Journal of Bacteriology*, 167(1), 7–11. <https://doi.org/10.1128/jb.167.1.7-11.1986>
- 3) Arana-Peña, S., Rios, N. S., Carballares, D., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00036>
- 4) Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- 5) Bastaert, F., Kheir, S., Saint-Criq, V., Villeret, B., Dang, P. M.-C., El-Benna, J., Sirard, J.-C., Voulhoux, R., & Sallenave, J.-M. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering With Bacterial Killing Through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01675>
- 6) Blackwood, L. L., Stone, R. M., Iglewski, B. H., & Pennington, J. E. (1983). Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infection and Immunity*, 39(1), 198–201. <https://doi.org/10.1128/iai.39.1.198-201.1983>
- 7) Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>
- 8) Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: An intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>
- 9) Brenner, S. (1974). THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*, 77(1), 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- 10) Brimacombe, C., & Beatty, J. (2013). Surface Polysaccharide Extraction and Quantification. *BIO-PROTOCOL*, 3(20). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.934>

- 11) Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 96, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
- 12) Butterworth, M. B., Zhang, L., Liu, X., Shanks, R. M., & Thibodeau, P. H. (2014). Modulation of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) by Bacterial Metalloproteases and Protease Inhibitors. *PLOS ONE*, 9(6), e100313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100313>
- 13) Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M. R., Anderson, E. M., Lam, J. S., & Wozniak, D. J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4), 622–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>
- 14) Çakmak, H., Güngörmedi, G., Dikmen, G., Çelik, P. A., & Çabuk, A. (2017). The true methodology for rhamnolipid: Various solvents affect rhamnolipid characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10), 1700002. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700002>
- 15) Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S., & Häussler, S. (2015). The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infection and Immunity*, 84(1), 162–171. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15>
- 16) Castro, R. O., García, J. C., & Bucio, J. L. (2013). Rapid Identification of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Using an Agar Plate Cocultivation System with Arabidopsis. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (pp. 345–353). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch32>
- 17) Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2015). Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 165–186.
- 18) Chhabra, S. R., Philipp, B., Eberl, L., Givskov, M., Williams, P., & Cámara, M. (2005). Extracellular Communication in Bacteria. En S. Schulz (Ed.), *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II: -/-* (pp. 279–315). Springer. <https://doi.org/10.1007/b98319>
- 19) Chin-A-Woeng, T. F. C., van den Broek, D., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2005). The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Sigma Regulator *psrA* Represses the Production of the Antifungal Metabolite Phenazine-1-Carboxamide. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 18(3), 244–253. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0244>
- 20) Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. En A. Filloux & J.-L. Ramos (Eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols* (pp. 631–641). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48

- 21) Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00075>
- 22) Courtney, J. m., Bradley, J., Mccaughan, J., O'connor, T. m., Shortt, C., Bredin, C. p., Bradbury, I., & Elborn, J. s. (2007). Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 42(6), 525–532. <https://doi.org/10.1002/ppul.20619>
- 23) Crabbe, J. R., Campbell, J. R., Thompson, L., Walz, S. L., & Schultz, W. W. (1994). Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 33(2), 103–113. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90030-2)
- 24) D'Arezzo, S., Lanini, S., Puro, V., Ippolito, G., & Visca, P. (2012). High-level tolerance to triclosan may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: Evidence from outbreak investigation. *BMC Research Notes*, 5(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-43>
- 25) Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1027–1036. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003>
- 26) De Kievit, T. R. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 11(2), 279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>
- 27) Díaz-Pérez, S. P., Solis, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H., & Campos-Garcia, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>
- 28) Florez, C., Raab, J. E., Cooke, A. C., & Schertzer, J. W. (2017). Membrane Distribution of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 8(4), e01034-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01034-17>
- 29) Frank, D. (2012). Research Topic on *Pseudomonas aeruginosa*, Biology, Genetics, and Host-Pathogen Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00020>
- 30) Fuchs, T. M., Eisenreich, W., Heesemann, J., & Goebel, W. (2012). Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 435–462. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00301.x>
- 31) Garcia, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J.-C., Si-Tahar, M., Bernard, F.-X., & Bodet, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence*, 9(1), 1163–1175. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1480830>

- 32) Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/biology11121711>
- 33) Gondry, M., Jacques, I. B., Thai, R., Babin, M., Canu, N., Seguin, J., Belin, P., Pernodet, J.-L., & Moutiez, M. (2018). A Comprehensive Overview of the Cyclodipeptide Synthase Family Enriched with the Characterization of 32 New Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00046>
- 34) González, O., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host. *Microbial Ecology*, 73(3), 616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- 35) Grünewald, J., & Marahiel, M. A. (2006). Chemoenzymatic and Template-Directed Synthesis of Bioactive Macrocyclic Peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 121–146. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.121-146.2006>
- 36) Gu, B., He, S., Yan, X., & Zhang, L. (2013). Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(19), 8439–8453. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5175-4>
- 37) Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- 38) Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L. A., Díaz-Pérez, A. L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M. A., Meza-Carmen, V., Cruz, H. R.-D. la, & Campos-García, J. (2017). The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases. *Molecules*, 22(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>
- 39) Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., & Cámara, M. (2018). Differential Regulation of the Phenazine Biosynthetic Operons by Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00252>
- 40) Hoegy, F., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2014). Pyoverdine and Pyochelin Measurements. En A. Filloux & J.-L. Ramos (Eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols* (pp. 293–301). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_24
- 41) Holloway, B. W. (1955). Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 13(3), 572–581. <https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-572>

- 42) Huszczyński, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2020). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
- 43) 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., & Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14339–14344. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036282100>
- 44) Jakobsen, T. H., Warming, A. N., Vejborg, R. M., Moscoso, J. A., Stegger, M., Lorenzen, F., Rybtke, M., Andersen, J. B., Petersen, R., Andersen, P. S., Nielsen, T. E., Tolker-Nielsen, T., Filloux, A., Ingmer, H., & Givskov, M. (2017). A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Scientific Reports*, 7(1), 9857. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09886-8>
- 45) Jamasbi, R. J., & Taylor, N. M. (2010). Correlation Between the Lipopolysaccharide Expression and Adhesiveness of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Laboratory Medicine*, 41(1), 24–30. <https://doi.org/10.1309/LM2UYWSOBDJWHYSU>
- 46) Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- 47) Kariminik, A., Baseri-Salehi, M., & Kheirkhah, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunology Letters*, 190, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>
- 48) Kawalek, A., Kotecka, K., Modrzejewska, M., Gawor, J., Jagura-Burdzy, G., & Bartosik, A. A. (2020). Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1161, a PAO1 derivative with the ICEPae1161 integrative and conjugative element. *BMC Genomics*, 21(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6378-6>
- 49) King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261–312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>
- 50) Köhler, T., Perron, G. G., Buckling, A., & Delden, C. van. (2010). Quorum Sensing Inhibition Selects for Virulence and Cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*, 6(5), e1000883. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000883>
- 51) Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B. E., Jeffries, J. L., Ohman, D. E., & Lau, G. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. *PLOS ONE*, 6(11), e27091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027091>
- 52) Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P., Montanaro, M., Paoletti, S., Visca, P., & Ippolito, G. (2011). Molecular Epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa*

- Hospital Outbreak Driven by a Contaminated Disinfectant-Soap Dispenser. *PLOS ONE*, 6(2), e17064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017064>
- 53) Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., & Zhang, L.-H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- 54) Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- 55) Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., & Shen, X. (2018). The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00230>
- 56) Lindhout, T., Lau, P. C. Y., Brewer, D., & Lam, J. S. (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology*, 155(10), 3449–3460. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030510-0>
- 57) Maciá, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Chronic Lung Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3382–3386. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3382-3386.2005>
- 58) Marmont, L. S., Whitfield, G. B., Rich, J. D., Yip, P., Giesbrecht, L. B., Stremick, C. A., Whitney, J. C., Parsek, M. R., Harrison, J. J., & Howell, P. L. (2017). PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(47), 19411–19422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812842>
- 59) Merino, L. A. (2007). [*Pseudomonas aeruginosa*: A bacterium with multiple personalities]. *Revista Argentina De Microbiologia*, 39(3), 143.
- 60) Mirzaei, A., Hedayati, M., Ashtiani, H. R. A., Rahbar, M., & Rastegar, H. (s/f). A simple method for non phenolic extraction of lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* with high purity and pyrogenicity in rat. *Sci. Res. Essays*.
- 61) Moser, C., Jensen, P. Ø., Thomsen, K., Kolpen, M., Rybtke, M., Lauland, A. S., Trøstrup, H., & Tolker-Nielsen, T. (2021). Immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.625597>
- 62) Murray, T. S., Egan, M., & Kazmierczak, B. I. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Current Opinion in Pediatrics*, 19(1), 83. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3280123a5d>
- 63) Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.

- Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46–65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>
- 64) Nickzad, A., & Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development – an approach for control? *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 447–453. <https://doi.org/10.1111/lam.12211>
- 65) Nosran, A., Kaur, P., Randhawa, V., Chhibber, S., Singh, V., & Harjai, K. (2021). Design, synthesis, molecular docking, anti-quorum sensing, and anti-biofilm activity of pyochelin-zingerone conjugate. *Drug Development Research*, 82(4), 605–615. <https://doi.org/10.1002/ddr.21781>
- 66) Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., & Blázquez, J. (2000). High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science*, 288(5469), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- 67) Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Río, R. E., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>
- 68) Ortiz-Castro, R., Pelagio-Flores, R., Méndez-Bravo, A., Ruiz-Herrera, L. F., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2014). Pyocyanin, a Virulence Factor Produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Alters Root Development Through Reactive Oxygen Species and Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 27(4), 364–378. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0219-R>
- 69) P. de Carvalho, M., & Abraham, W.-R. (2012). Antimicrobial and Biofilm Inhibiting Diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19(21), 3564–3577. <https://doi.org/10.2174/092986712801323243>
- 70) Palleroni, N. J. (1993). *Pseudomonas* classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3), 231–251. <https://doi.org/10.1007/BF00873084>
- 71) Park, A. J., Surette, M. D., & Khursigara, C. M. (2014). Antimicrobial targets localize to the extracellular vesicle-associated proteome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a biofilm. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00464>
- 72) Pearson, J. P., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(18), 5756–5767. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997>
- 73) Perraud, Q., Cantero, P., Munier, M., Hoegy, F., Zill, N., Gasser, V., Mislin, G. L. A., Ehret-Sabatier, L., & Schalk, I. J. (2020). Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in the Presence of Siderophore-Antibiotic Conjugates during Epithelial Cell Infection. *Microorganisms*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111820>

- 74) Pierson, L. S., III, & Pierson, E. A. (1996). Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: Role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiology Letters*, 136(2), 101–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08034.x>
- 75) Poole, K., & McKay, G. (2003). Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: Many roads lead to Rome. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, d661-86. <https://doi.org/10.2741/1051>
- 76) Rahme, L. G., Tan, M.-W., Le, L., Wong, S. M., Tompkins, R. G., Calderwood, S. B., & Ausubel, F. M. (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 13245–13250. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13245>
- 77) Ravel, J., & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends in Microbiology*, 11(5), 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00076-3)
- 78) Riquelme, S. A., Liimatta, K., Wong Fok Lung, T., Fields, B., Ahn, D., Chen, D., Lozano, C., Sáenz, Y., Uhlemann, A.-C., Kahl, B. C., Britto, C. J., DiMango, E., & Prince, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Utilizes Host-Derived Itaconate to Redirect Its Metabolism to Promote Biofilm Formation. *Cell Metabolism*, 31(6), 1091-1106.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.04.017>
- 79) Sainz-Mejías, M., Jurado-Martín, I., & McClean, S. (2020). Understanding *Pseudomonas aeruginosa*–Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. *Cells*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/cells9122617>
- 80) Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
- 81) Schiessl, K. T., Hu, F., Jo, J., Nazia, S. Z., Wang, B., Price-Whelan, A., Min, W., & Dietrich, L. E. P. (2019). Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08733-w>
- 82) Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- 83) Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1460–1465. <https://doi.org/10.1172/JCI20364>
- 84) Soares, A., Alexandre, K., & Etienne, M. (2020). Tolerance and Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.02057>

- 85) Solís Ortiz, C. S. (2017). *Estudio mutagénico de los genes involucrados en la biosíntesis de ciclodipeptidos en Pseudomonas aeruginosa PAO1*. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/3950
- 86) Solis-Ortiz, C. S., Gonzalez-Bernal, J., Kido-Díaz, H. A., Peña-Uribe, C. A., López-Bucio, J. S., López-Bucio, J., Guevara-García, Á. A., García-Pineda, E., Villegas, J., Campos-García, J., & Reyes de La Cruz, H. (2022). Bacterial cyclodipeptides elicit Arabidopsis thaliana immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains on plant development. *Journal of Plant Physiology*, 275, 153738. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153738>
- 87) Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., & Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4322–4327. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002>
- 88) Talà, L., Fineberg, A., Kukura, P., & Persat, A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nature Microbiology*, 4(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0378-9>
- 89) Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- 90) Thöming, J. G., Tomasch, J., Preusse, M., Koska, M., Grahl, N., Pohl, S., Willger, S. D., Kaever, V., Müsken, M., & Häussler, S. (2020). Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0113-6>
- 91) Vázquez-Rivera, D., González, O., Guzmán-Rodríguez, J., Díaz-Pérez, A. L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Bucio, J., Meza-Carmen, V., & Campos-García, J. (2015). Cytotoxicity of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Leads to Apoptosis in Human Cancer Cell Lines. *BioMed Research International*, 2015, e197608. <https://doi.org/10.1155/2015/197608>
- 92) Wang, S., Yu, S., Zhang, Z., Wei, Q., Yan, L., Ai, G., Liu, H., & Ma, L. Z. (2014). Coordination of Swarming Motility, Biosurfactant Synthesis, and Biofilm Matrix Exopolysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6724–6732. <https://doi.org/10.1128/AEM.01237-14>
- 93) Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Syltatk, C., Rosenau, F., & Blank, L. M. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>

- 94) Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271. <https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987>
- 95) Wyatt, M. A., Lee, J., Ahilan, Y., & Magarvey, N. A. (2013). Bioinformatic evaluation of the secondary metabolism of antistaphylococcal environmental bacterial isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(7), 465–471. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0016>
- 96) Zheng, H., Singh, N., Shetye, G. S., Jin, Y., Li, D., & Luk, Y.-Y. (2017). Synthetic analogs of rhamnolipids modulate structured biofilms formed by rhamnolipid-nonproducing mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), 1830–1838. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.042>