



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO - BIOLÓGICAS**

**“Estudio mutagénico de los genes involucrados en la biosíntesis de  
ciclodipéptidos en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO:  
CRISTHIAN SAID SOLIS  
ORTÍZ**

**ASESOR:  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA  
JESÚS CAMPOS GARCÍA**

**MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE/2017**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH**

**ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORIA DEL D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA, EL APOYO TÉCNICO DE LA M.C. ALMA LAURA DÍAZ PÉREZ Y CON EL APOYO DE CONACYT CON EL NÚMERO DE BECARIO 331499.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios padre que siempre que siempre da dirección y bendición.

Al D.C. Jesús Campos García por su asesoría, por la atención y el respeto con los cuales me recibió y dirigió en esta gran etapa.

A mi familia que amo y sin la cual no hubiese podido alcanzar mis metas.

Al equipo de trabajo de mi laboratorio: Laura, Sharel, Wicho, Nancy, Mauricio, Xochitl, Alejandra, Claudia, Lorena, Omar, Enrique, Marco y Alma; gracias por hacer de un espacio de trabajo, una segunda casa.

A mi comité tutorial; gracias por sus observaciones y aportaciones a este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos de Maestría y fuera de Maestría, gracias por acompañarme durante esta etapa.

## **DEDICATORIA.**

**El presente trabajo lo dedico a mi familia por su apoyo, sus enseñanzas, su paciencia y amor incondicional.**

**La voluntad del hombre es el motor de su existencia, los errores son para crecer y los triunfos para ser humildes.**

**SAID SOLIS**

## INDICE

RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT .....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>I.1 Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</b> .....	1
<b>I.2.1 Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>.</b> .....	2
<b>I.2.2 Pigmentos</b> .....	2
<b>I.2.3 Factores de virulencia</b> .....	3
<b>I.1.3.1 Principales sistemas reguladores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i>.</b> .....	3
<b>I.1.3.2 Quorum sensing.</b> .....	3
<b>I.1.3.3 Quorum sensing (QS) en bacterias Gram negativas</b> .....	4
<b>I.1.3.3.1 Autoinductores</b> .....	5
<b>I.1.3.3.1.1 HSL.</b> .....	5
<b>I.1.3.3.1.2 3OH PAM.</b> .....	6
<b>I.1.3.3.1.3 PQS</b> .....	6
<b>I.1.3.3.1.4 Autoinductor 2 (AI-2)</b> .....	6
<b>I.1.3.3.1.5 CDPs</b> .....	6
<b>I.1.3.3.1.6 Bradioxentina</b> .....	7
<b>I.1.3.3.1.7 Factor de señal difusible</b> .....	7
<b>I.1.3.4 Quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i>.</b> .....	8
<b>I.1.3.4.1 Formación de biofilm.</b> .....	9
<b>I.1.3.4.2 Producción de alginato.</b> .....	10
<b>I.1.3.4.3 Regulación de la captación de hierro.</b> .....	10
<b>I.1.3.4.3.2 Pioquelina.</b> .....	12
<b>I.1.3.4.3.3 Otras estrategias de captación de hierro.</b> .....	12
<b>I.1.3.4.3.3.1 Captación de xenosideróforos</b> .....	12
<b>I.1.3.4.3.3.3 Captación de Fe<sup>+2</sup> a través del sistema Feo</b> .....	13
<b>I.1.3.4.3.3.3.1 Piocianina.</b> .....	13
<b>I.1.3.4.4 Toxinas y exoproteínas</b> .....	14
<b>I.1.3.4.5 RNA reguladores en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>.</b> .....	15

I.1.3.5	Importancia de los ciclodipeptidos y el sistema de QS en <i>P. aeruginosa</i> .....	15
I.2	Ciclodipeptidos.....	15
I.2.1	Enlace peptídico originado en los ribosomas.....	16
I.2.2	Síntesis de ciclodipeptidos mediante ciclodipeptido sintetas (CDPS).....	16
I.2.3	Síntesis de ciclodipeptidos mediante péptido sintetas no-ribosomales (NRPS)..	17
I.2.3.1	Dominio de Adenilación (A).....	18
I.2.3.2	Dominio PCP.....	19
I.2.3.3	Dominio de condensación (C). ....	19
I.2.3.4	Dominio Te y su participación en la ciclación. ....	19
I.2.3.5	Modificación lipídica de péptidos no-ribosomales.....	21
I.2.3.6	Integración de D-Aminoácidos a péptidos no-ribosomales por las NRPS.....	21
I.2.3.7	Diversificación de péptidos no ribosomales por enzimas de modificación. ....	23
I.2.3.8	Metilación de N y C de péptidos no ribosomales. ....	23
I.2.3.9	Adhesión de heterociclos. ....	24
I.2.3.10	Entrecruzamiento del esqueleto por oxidación. ....	24
I.2.4	Actividad biológica de los ciclodipeptidos.....	25
IV.	OBJETIVOS. ....	27
IV.1	Objetivo General.....	27
IV.2	Objetivos específicos.....	27
V.	MATERIALES Y METODOS.....	28
V.1	Material biológico.....	28
V. 2	Medios de cultivo y selección.....	30
V.3	Métodos .....	31
V.3.1	Preparación de stock de glicerol 50%. ....	31
V.3.2	Aislamiento de plásmido por método de lisis alcalina.....	31
V.3.3	Electroforesis .....	33
V.3.4	Extracción de DNA total bacteriano.....	33
V.3.5	Purificación de DNA. ....	34
V.3.6	Preparación de células competentes JM101.....	36
V.3.7	Prueba de electroporación de células competentes. ....	37
V.3.8	Técnica de PCR .....	37
V.3.9	Adenilación.....	38

V.3.10 Ligación de DNA. ....	38
V.3.11 Transformación de células competentes por electroporación. ....	39
V.3.12 Restricciones totales y parciales. ....	39
V.3.13 Conjugación tripartita. ....	40
V.3.14 Prueba de antagonismo bacteriano. ....	41
V.3.14.1 Spot on lawn/picadura. ....	42
V.3.14.2 Spot on lawn/gota. ....	42
V.3.15 Extracción de ciclodipéptidos. ....	43
V.3.16 Análisis de HPLC. ....	44
V.3.17 Cultivo de línea celular HeLa. ....	44
V.3.17.1 Viabilidad celular de cultivos de células HeLa (MTT) ....	45
V.3.18 Obtención de mutantes dobles. ....	45
V.3.19 Clonación de fragmentos de DNA en pGEM-T Easy ....	45
VI. RESULTADOS .....	46
VI.1 Construcciones para obtener la mutante por recombinación de <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	46
VI.2 Obtención de mutantes dobles mediante conjugación tripartita. ....	56
VI.3 Preselección de clones mediante Spot on Lawn por picadura. ....	58
VI.4 Preselección de clones mediante Spot on Lawn por gota. ....	59
VI.5 Ensayos de viabilidad celular con HeLa. ....	60
VI.5.1 Análisis microscópico del efecto de los sobrenadantes de las mutantes dobles de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sobre células HeLa. ....	60
VI.5.2 Ensayos MTT con HeLa tratadas con sobrenadantes de las mutantes dobles. ....	62
VI.6 Extracción de ciclodipéptidos en las mutantes obtenidas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	65
VI.7 Relación de la producción de CDPs vs viabilidad celular (HeLa). ....	69
VI.8 Correlación de datos. ....	70
VIII. CONCLUSIÓN .....	78
IX. REFERENCIAS. ....	79

## RESUMEN

Las biomoléculas conocidas como ciclodipéptidos (CDPs) o péptidos cíclicos, son de gran interés biotecnológico debido al potencial bioactivo que poseen. Diferentes estudios reportan actividades biológicas para los CDPs tales como: antibiótica, antifúngica, antiviral, moléculas de señalización, actividad citotóxica, entre otras. Los CDPs son producto del metabolismo secundario de microorganismos y están conformados por dos aminoácidos unidos mediante dos enlaces peptídicos. A estas estructuras pueden añadirse grupos sustituyentes como ácidos grasos, azúcares, halógenos, D-aminoácidos, anillos tiazol y oxazol, entre otros; a estos productos finales se les conoce como dicetopiperazinas (DKPs). Anteriormente, se consideraba que los CDPs podrían ser productos intermediarios de la degradación de las proteínas, sin embargo, actualmente se conocen dos sistemas por los cuales pueden ser sintetizados: mediante las enzimas péptido sintetasa no-ribosomales (NRPS) y por enzimas ciclodipéptido sintetas (CDPS) dependientes de aminoacil-RNAt. *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo que produce CDPs los cuales son base prolina (Pro): ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Val). En trabajos previos se reportó que el sistema involucrado en la síntesis de CDPs en *P. aeruginosa* PAO1 es el sistema NRPS. Un análisis de secuencias de proteínas en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, arrojó como resultados la presencia de nueve probables NRPS. Mutantes simples de los genes que codifican esas proteínas, presentaron alteración en la síntesis de CDPs en *P. aeruginosa* PAO1, sugiriendo una posible redundancia génica involucrada en la biosíntesis de estos. En el presente trabajo se continuó con el estudio de las probables NRPS identificadas en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1; mediante la obtención de mutantes dobles en los genes codificantes de las posibles NRPS. La caracterización de la producción de CDPs en las mutantes dobles obtenidas mostró que el fenotipo cambia dependiendo de la combinación de genes NRPS mutados en *P. aeruginosa* PAO1, modificando la producción en al menos dos de los tres CDPs; algunas mutantes mostraron sobreproducción con valores de hasta 190% en algunos CDPs y otras mostraron disminución de la producción menores a 50% con respecto de la cepa silvestre. Sin embargo, se identificaron dos mutantes (*ambB/pvdI-7* y *pchE/pvdL-2*) las cuales mostraron una disminución del 30% en la producción de los CDPs, con respecto de la cepa silvestre. Con lo cual se concluye que las combinaciones de genes NRPS *ambB/pvdI* y *pchE/pvdL* juegan un papel importante en la producción de CDPs en *P. aeruginosa* PAO1. Adicionalmente, en la caracterización de las mutantes obtenidas se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con la línea celular humana HeLa, se observó que en general, el sobrenadante de algunas mutantes simples presentaron una disminución de 65% en la viabilidad de las células HeLa; mientras que los sobrenadantes de las mutantes dobles presentaron porcentajes arriba del 80% de viabilidad celular. Los resultados obtenidos de viabilidad celular y la cuantificación de los CDPs sugieren que el efecto de los sobrenadantes sobre la viabilidad celular se asocia con la concentración de los CDPs presentes. Por lo que los resultados indican que los CDPs en *P. aeruginosa* PAO1 son sintetizados por enzimas de la familia de las NRPS producto de múltiples genes cuyas funciones son redundantes.

**Palabras clave:** Ciclodipéptidos, *P. aeruginosa* PAO1, mutantes, citotoxicidad, redundancia génica.

## ABSTRACT

Known as cyclodipeptides (CDPs) or cyclical biomolecules, they are of biotechnological interest due to the potential bioactive possessing. Different studies report biological activities for the CDPs such as: antibiotic, antifungal, antiviral, cytotoxic, signaling molecules, among other activity. The CDPs are a product of the secondary metabolism of microorganisms and are made up of two amino acids joined by peptide bonds two. Substituent groups such as fatty acids, sugars, halogens, biosynthetic and thiazole and oxazole rings may be added to these structures, among others, these end products are known as diketopiperazines (DKPs). Previously, deemed to the CDPs may be intermediate product of the degradation of proteins, however, two systems which can be synthesized are currently known: using enzymes non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and enzymes ciclodipeptido synthases (CDPS) aminoacyl-RNAt-dependent. *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative Bacillus that produces CDPs which are base Proline (Pro): ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Phe) and ciclo(L-Pro-L-Val). Previous studies reported that the system involved in the synthesis of CDPs in *P. aeruginosa* PAO1 is the NRPS system. An analysis of sequences of proteins in the genome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, threw as results the presence of nine probable NRPS. Mutant single genes that encode these proteins, presented alteration in the synthesis of CDPs in *P. aeruginosa* PAO1, suggesting a possible genetic redundancy involved in the biosynthesis of these. This work continued with the study of the probable NRPS identified in the genome of *P. aeruginosa* PAO1; by obtaining mutant double in the genes coding for the possible NRPS. The characterization of the production of CDPs in the mutants obtained double showed that the phenotype changes depending on the combination of NRPS genes mutated in *P. aeruginosa* PAO1, modifying production in at least two of the three CDPs; some mutants showed overproduction with values up to 190% in some CDPs and others showed a decrease in the production of less than 50% with respect to the wild type. However, we identified two mutants (*ambB/pvdI-7* and *pchE/pvdL-2*) which showed a 30% decrease in the production of the CDPs, with respect to the wild type. Whereupon, it is concluded that combinations of *ambB/pvdI* and *pvdL/pchE* NRPS genes play an important role in the production of CDPs in *P. aeruginosa* PAO1. Additionally, in the characterization of the mutants obtained cell viability with the human cell line HeLa, trials were carried out it was noted that in general, the supernatant of some single mutants showed a 65% decrease in viability HeLa cells; whereas the supernatants of the double mutants showed percentages above 80% of cell viability. The results of cell viability and the quantification of the CDPs suggest that the effect of the supernatants of cell viability is associated with the concentration of these CDPs. So the results indicate that the CDPs in *P. aeruginosa* PAO1 are synthesized by enzymes of the NRPS family product in multiple genes whose functions are redundant.

**Key words:** Cyclodipeptides, *P. aeruginosa* PAO1, mutants, cytotoxicity, gene redundancy.

## INTRODUCCIÓN.

### I.1 Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pertenece al reino bacteria; filo *proteobacteria*; clase *Gamaproteobacteria*; genero *Pseudomonas*; especie *aeruginosa*. Es un bacilo Gram negativo ligeramente curvado, posee movilidad unipolar debido a la presencia de un flagelo, no forma esporas, y es aeróbica estricta; aunque algunos reportes sugieren que puede sobrevivir en condiciones anaeróbicas, bajo ciertas condiciones. Hasta el momento, se considera que su genoma es uno de los más grandes en bacterias; casi 6.3 MPb y se predice que tiene 5,570 ORFs (Tabla 1). El genoma de *P. aeruginosa* es comparable con el tamaño de los eucariotas simples como *Saccharomyces cerevisiae*. Otra de las características del genoma de *P. aeruginosa* es que es rico en G+C, alrededor de 66.6% (Stover et al., 2000).

**Tabla 1.** Clases funcionales de genes predichos (modificada de Stover et al., 2000).

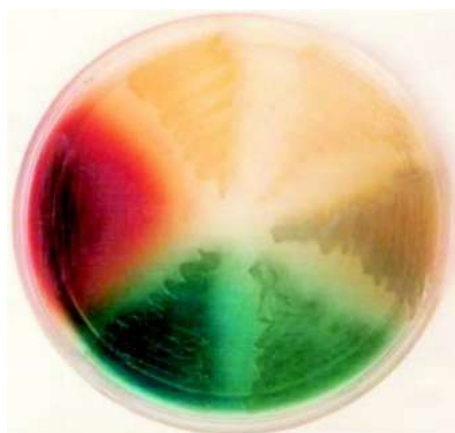
Tipo de función	ORFS	%ORFS
A adaptación, protección (por ejemplo proteínas de choque de baja temperatura)	60	1.1
Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	150	2.7
Resistencia y susceptibilidad a antibióticos	19	0.3
Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y de transporte	119	2.1
Metabolismo de compuestos de carbono	130	2.3
División celular	26	0.5
Pared celular, LPS	83	1.5
Metabolismo intermediario central	64	1.1
Chaperonas y proteínas de choque térmico	52	0.9
Quimiotaxis	43	0.8
Replicación, recombinación, modificación y reparación de DNA	81	1.5
Metabolismo energético	166	3.0
Metabolismo de fosfolípidos y ácidos grasos	56	1.0
Proteínas de membrana	7	0.1
Accesorios y motilidad	65	1.2
Biosíntesis y metabolismo de nucleótidos	60	1.1
Aparatos de secreción y exportación de proteínas.	83	1.5
Enzimas putativas	409	7.3
Relación con fagos, transposones o plásmidos	38	0.7
Factores de secreción (toxinas, enzimas y alginato)	58	1.0
Proceso de transcripción y degradación de RNA	45	0.8
Reguladores transcripcionales	403	7.2
Traducción, modificación y degradación post traduccional	149	2.7
Trasporte de moléculas pequeñas	555	10.0
Sistemas de regulación de dos componentes	118	2.1
Hipotéticos	1774	31.8
Desconocidos (Hipotéticos conservados)	757	13.6
Total	5570	100.0

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

*P. aeruginosa* tiene gran capacidad para sobrevivir en diferentes entornos, sobretodo entornos húmedos, además posee múltiple resistencia a antibióticos y a desinfectantes que eliminan a otras bacterias del medio. Se le considera un patógeno oportunista, todo esto debido a sus múltiples factores de virulencia que le dan ventaja para sobrevivir y colonizar entornos, así como la gran capacidad para desarrollar infecciones en pacientes que estén bajo un estado de inmunodeficiencia u hospitalización durante un largo periodo de tiempo debido a uso de catéteres; sobre todo infecciones respiratorias (Stover et al., 2000; Karatuna y Yagci, 2010).

### **I.2.2 Pigmentos**

*P. aeruginosa* posee la capacidad de formar diferentes pigmentos hidrosolubles, entre los cuales se incluye el compuesto fluorescente pioverdina (también producido por *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*). Cuando la pioverdina se combina con el pigmento fenazínico azul piocianina, se crea el color verde brillante, característico de *P. aeruginosa*, bacteria que también puede producir otros pigmentos hidrosolubles, como la piorrubina (rojo) y la piomelanina (marrón). 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 (Figura 1; Merino, 2007).



**Figura 1.** Colonias de aislamientos hospitalarios de *P. aeruginosa*. Se aprecian los diferentes pigmentos producidos sobre agar Mueller Hinton, luego de 48 h de incubación a 28 °C (tomada de Merino 2007).

### **I.2.3 Factores de virulencia**

Muchos de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* son componentes superficiales de la célula; como lipopolisacáridos (LPS) y alginato de productos extracelulares, como la proteasa alcalina, elastasa, Exotoxina A, ADNasa, y fosfolipasa C (PLC), todos estos factores en conjunto o por separado contribuyen a la patogénesis de esta bacteria. Varios estudios han demostrado que estos productos son liberados al medio ambiente por esta bacteria durante su crecimiento (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995). Muchos de los factores relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa* participan directa o indirectamente en la interacción física con la célula huésped y las proteínas del anfitrión, incluyendo a los sistemas de secreción (tipo II, tipo III y tipo VI) y efectores asociados (incluyendo ExoT, ExoU, ExoS y ExoA, fosfolipasa C y proteasa alcalina), flagelos y estructuras asociadas en la adhesión a las células del huésped tal como el pili tipo IV. Otros factores de virulencia reconocidos incluyen los implicados en quorum (sistemas AHL y PQS), adquisición de hierro (Pioquelina y Pioverdina), moléculas pequeñas/ síntesis de toxinas (fenazinas, cianuro de hidrogeno), alginato, LPS y formación de Biofilm (Feinbaum, et al., 2012).

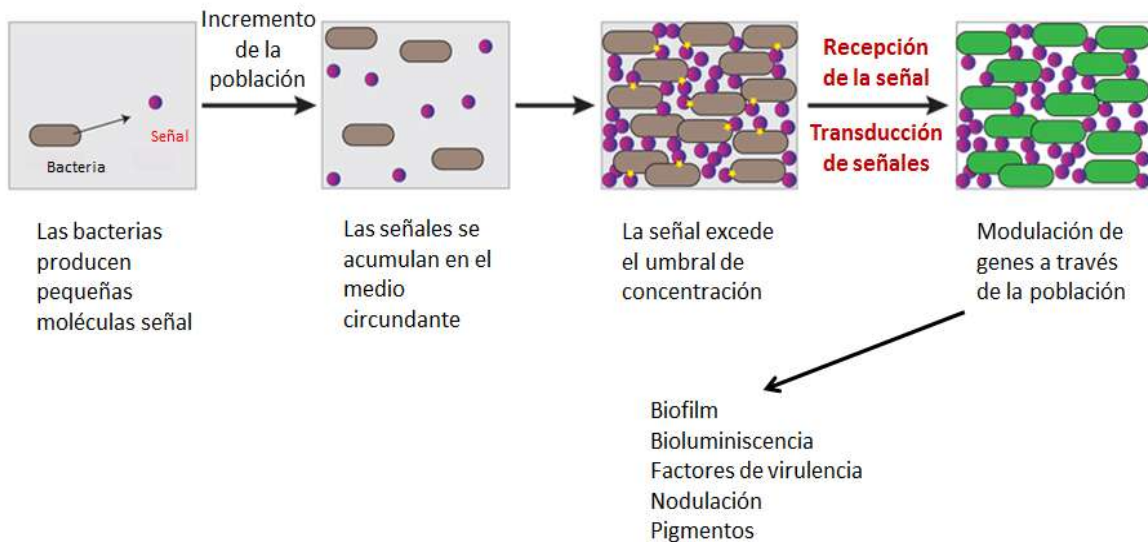
#### **I.1.3.1 Principales sistemas reguladores de virulencia en *P. aeruginosa*.**

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

#### **I.1.3.2 Quorum sensing.**

El quorum sensing es un mecanismo en el que las bacterias se comunican utilizando moléculas como señal química. Como en los organismos superiores, la información suministrada por estas moléculas es crítica para la sincronización de las actividades de grandes grupos de células. En bacterias, la comunicación química implica; producción,

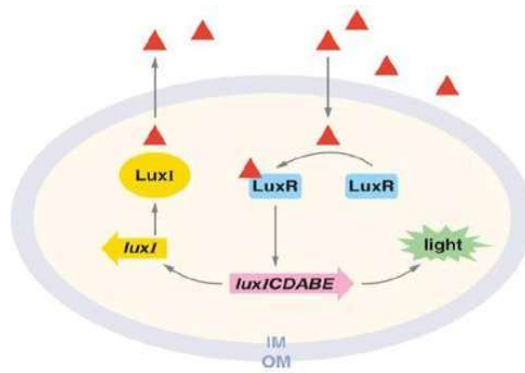
liberación, detección y resuspensión de pequeñas moléculas hormonales llamadas autoinductores. Este proceso, denominado quorum sensing (Figura 2), permite que las bacterias monitoreen otras bacterias del entorno para alterar el comportamiento a escala de toda la población en respuesta a cambios en el número y las especies presentes en una comunidad (Waters y Blassler 2005).



**Figura 2.** Sistema de Quorum sensing bacteriano (tomado de Gonzalez y Keshavan, 2006)

### I.1.3.3 Quorum sensing (QS) en bacterias Gram negativas.

El primer sistema de QS descrito es el de la bacteria *Vibrio fischeri* (Figura 3) que es un simbiote facultativo de peces marinos y calamares, y se considera el paradigma de QS de la mayoría de las bacterias Gram negativas (Nealson & Hastings, 1979). La bacteria vive en los órganos de luz de estos animales marinos y produce luminiscencia, lo cual se cree que ayuda a los animales a escapar de depredadores. Interesantemente, la bioluminiscencia solo se presenta cuando existe la interacción simbiótica y no en el estado de vida libre. Esta regulación de la bioluminiscencia está mediada por el sistema LuxI-LuxR que pertenece a la red de señalización de quórum sensing. LuxI sintetiza la señal que es una acil-homoserina lactona (AHL) de seis carbonos, 3-oxo-hexanoil-HSL, y a medida que las AHL se acumulan llevan a la unión y activación de su regulador específico LuxR. El LuxR activado se une a secuencias palindrómicas específicas del ADN, llamadas “caja lux”, donde recluta a la ARN polimerasa y así aumentan la expresión de genes (Gonzalez y Keshavan, 2006).



**Figura 3.** Mecanismo de Quorum sensing (QS) mediado por el sistema LuxI-LuxR tomada de Waters y Blassler 2005

La gran mayoría de sistemas de quórum sensing en bacterias Gram negativas que han sido estudiadas utilizan AHL como moléculas señalizadoras (Kievit e Iglewski, 2000). Además de las AHL, se sabe que existen otros tipos de señales autoinducidas, cuyas estructuras son químicamente diferentes y cada una de ellas forman parte de una red regulatoria diversa, como autoinductores, ciclo dipéptidos, y otros (Gonzalez y Keshavan, 2006; Atkinson y Williams, 2009).

### I.1.3.3.1 Autoinductores.

Dentro de las biomoléculas que participan en los mecanismos de comunicación o QS entre bacterias se encuentran los autoinductores (Tabla 2), donde los CDPs tienen una participación importante según lo reportado en artículos recientes. A continuación se describen algunos.

#### I.1.3.3.1.1 HSL.

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

#### **I.1.3.3.1.2 3OH PAM.**

3OH metilester de ácido palmítico (PAME 3OH) transmite información a través de dos sensores compuestos de histidina quinasa- en respuesta del par regulador, PhcS-Raps, para causar que el patógeno de planta *Ralstonia solanacearum* cambie de un estado móvil a un estado infectivo (Flavier et al. 1997).

#### **I.1.3.3.1.3 PQS.**

La molécula 3, 4-dihydroxy-2-heptylquinolina, llamado PQS, es una molécula señal que es parte integral de la cascada de quorum-detección de *P. aeruginosa* (Pesci et al., 1999). Esta molécula señal actúa como un enlace regulador adicional entre los circuitos Las y Rhl vinculados a quórum sensing.

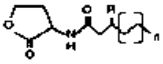
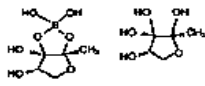
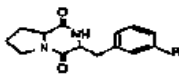
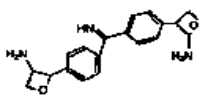
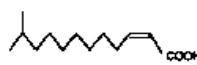
#### **I.1.3.3.1.4 Autoinductor 2 (AI-2).**

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

#### **I.1.3.3.1.5 CDPs.**

Recientemente se ha descrito un número importante de bacterias Gram negativas, que en altas concentraciones de ciclodipéptidos antagonizan la unión de AHL a receptores cognados (Waters y Blassler 2005). Se ha hipotetizado su posible función como Autoinductores debido a la capacidad de activar los biosensores de AHL. Algunos de estos ciclodipéptidos, como ciclo(L-Ala-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Phe-L-Pro), actúan como antagonistas que compiten con 3-oxo-hexanoil-AHL por el regulador LuxR e inhiben los genes regulados por QS. Aunque para los ciclo dipéptidos el umbral de inducción de la proteína LuxR es mucho mayor, alrededor de 0.3 mM, mientras que para el 3-oxo-hexanoil-AHL es de 1 nM (Gonzalez y Keshavan, 2006).

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

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

#### I.1.3.3.1.6 Bradioxentina.

Las investigaciones muestran que las moléculas señal tipo bradioxentina (Tabla 2) están presentes en extractos de varias cepas de *Rhizobium*, así como otras especies del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias. La bradioxentina es un factor de densidad celular que está involucrado en la regulación dependiente de densidad poblacional de los genes *nod*, que regulan el proceso de nodulación en *Bradyrhizobium japonicum*, una bacteria Gram negativa, simbiote fijadora de nitrógeno de plantas leguminosas (Gonzalez y Keshavan, 2006).

#### I.1.3.3.1.7 Factor de señal difusible.

El factor de señal difusible o (DSF) (Tabla 2). En *Xanthomonas campestris*, causa de la enfermedad de la raíz negra, la regulación de la producción de enzimas extracelulares como proteasas, pectinasas y celulasas, utiliza un mecanismo de comunicación que no emplea AHL. La expresión de estas exoenzimas junto con el control de la dispersión de biofilm, resistencia a toxinas y supervivencia es conducida por un pequeño factor de señal difusible (DSF) caracterizado químicamente como ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico (Atkinson y Williams, 2009; Gonzalez y Keshavan, 2006).

### I.1.3.4 Quorum sensing en *P. aeruginosa*.

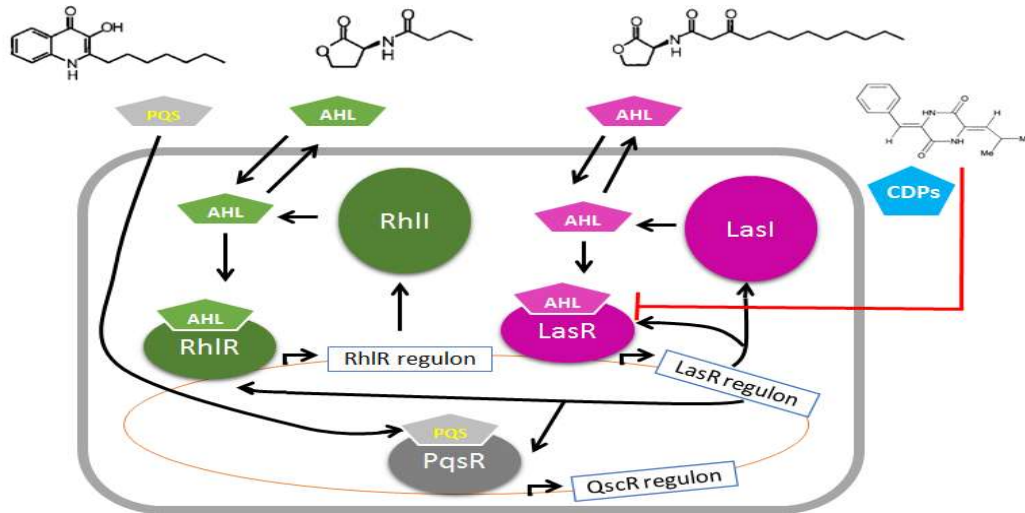
Uno de los sistemas de comunicación célula a célula más estudiados en bacterias es el de *P. aeruginosa*. En este organismo se descubrió que el circuito de QS es esencial para la expresión de factores de virulencia, así como para la formación de biofilm y se ha especulado que la actividad patógena y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

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

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

Dos sistemas de QS íntimamente ligados operan en *P. aeruginosa*, son el sistema *las*, que consiste del activador transcripcional LasR y de la sintasa de AHL LasI, esta última cataliza la síntesis de *N*-3-oxododecanoil-homoserina lactona; y el sistema *rhl*, que consiste del regulador transcripcional RhIR y de la sintasa de AHL RhII, esta última cataliza la síntesis de *N*-butanoil-homoserina lactona (Huang, et al., 2003; Juhas, et al., 2005; Schuster y Greenberg, 2006). Los sistemas *las* y *rhl* son homólogos al sistema LuxR-LuxI de *V. fischeri* (Figura 15), por lo que el modelo de señalización por QS funciona de una manera similar, inicia con el autoinductor (*N*-3-oxododecanoil-homoserina lactona ó *N*-butanoil-homoserina lactona) que es producido a niveles basales a bajas densidades celulares. Entonces la concentración del autoinductor incrementa conforme aumenta la

densidad celular hasta que es alcanzado un umbral de concentración. A esta concentración, el autoinductor se une a su proteína blanco específica (LasR ó RhIR) y así la activa, lo que conduce a la expresión de diversos genes (tabla 3), entre los que incluyen las sintasas de AHL (LasI y RhII), lo que crea un circuito de retroalimentación o autoinducción (Figura 4). Estos sistemas están arreglados de manera jerárquica donde el sistema *las* activa al sistema *rhl* (Pesci, et al., 1997).



**Figura 4.** Sistema de quorum sensing de *P. aeruginosa* (modificado de Juhás et al., 2005)

Existe un tercer sistema de regulación de quorum sensing en *P. aeruginosa*, es llevado cabo por señales de quinolonas, químicamente caracterizado como 2- eptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), y este provee un enlace entre los sistemas *las* y *rhl*. La síntesis de PQS es controlada por ambos sistemas dependientes de AHL *las* y *rhl*. La transcripción de genes requerida para la síntesis PQS es regulada positivamente por LasR pero está bajo control negativo del sistema *rhl*. Por lo que la producción de PQS está directamente relacionado a las concentraciones de N-3-oxododecanoil-homoserina lactona y N-butanoil-homoserina lactona, sugiriendo un delicado balance entre los dos sistemas (Juhás, et al., 2005).

#### I.1.3.4.1 Formación de biofilm.

Los biofilms son comunidades bacterianas multicelulares encapsuladas asociadas a una superficie en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos que regulan interacciones célula a célula y célula a superficie. Los biofilms pueden formarse en superficies bióticas o abióticas.

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

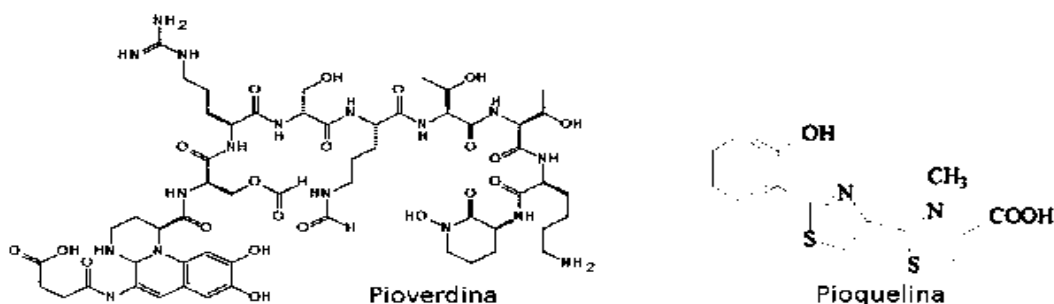
El quorum sensing regula la lisis celular en el biofilm, por lo tanto regulando la liberación de ADN extracelular. El QS también regula la producción de ramnolípidos que promueve la motilidad y de esta manera afecta la estructura de hongo en los biofilms maduros, y también el mantenimiento de los canales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

#### **I.1.3.4.2 Producción de alginato.**

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

#### **I.1.3.4.3 Regulación de la captación de hierro.**

Al igual que la mayoría de los organismos, en *P. aeruginosa* el hierro es crítico para el crecimiento. Biológicamente el hierro utilizable ( $\text{Fe}^{+2}$ ) es escaso y está disponible principalmente en su forma insoluble ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Para ayudar a superar la deficiencia de hierro libre, y en el caso de las bacterias patógenas necesitan competir con las proteínas secuestradoras de hierro (transferrina y lactoferrina), las bacterias producen sideróforos que unen el hierro y lo transportan al interior de la célula a través de receptores en la superficie de la célula (Ankenbauer, et al., 1986; Balasubramanian, et al., 2013). *P. aeruginosa* produce dos sideróforos, pioverdina y pioquelina (Figura 5), caracterizados como de alta y baja afinidad, respectivamente (Cornelis y Dingemans, 2013).



**Figura 5.** Estructura química de la pioverdina y pioquelina de *P. aeruginosa* (tomada de Cornelis y Dingemans, 2013).

Previamente llamada fluoresceína bacteriana, la pioverdina es un complejo péptido que contiene dos grupos hidroxamato y un derivado dihidroxiquinolona (Ankenbauer, et al., 1986). Las pioverdinas son una característica de las especies fluorescentes del género *Pseudomonas*. La pioverdina de *P. aeruginosa* es un sideróforo compuesto de una cadena peptídica y un cromóforo. La parte del cromóforo de la molécula esta conservado y participa en la unión del  $Fe^{+3}$  mientras que la cadena peptídica es muy variable (entre 6 y 12 aminoácidos) entre las especies de *Pseudomonas* o incluso entre cepas de la misma especie, en *P. aeruginosa* se han reconocido tres tipos diferentes. Las pioverdinas unen hierro con una gran afinidad, son capaces de desplazar el hierro de la transferrina (Cornelis y Dingemans, 2013).

Una vez que el hierro ha sido solubilizado es transportado a la membrana exterior de la célula donde es percibido por receptores específicos y después entra en acción el sistema TonB para la translocación a través de la membrana citoplasmática. Cuando el hierro está dentro de la célula, es liberado de los ferri-sideróforos por un proceso reductivo antes de alcanzar sus blancos (Meyer, et al., 1996).

#### **I.1.3.4.3.1 Pioverdina.**

Previamente llamada fluoresceína bacteriana, la pioverdina es un péptido complejo que contiene dos grupos hidroxamato y un derivado dihidroxiquinolona (Ankenbauer, et al., 1986). Las pioverdinas son una característica de las especies fluorescentes del género *Pseudomonas*. La pioverdina de *P. aeruginosa* es un sideróforo compuesto de una cadena peptídica y un cromóforo. La parte del cromóforo de la molécula esta conservado y participa en la unión del  $Fe^{+3}$  mientras que la cadena peptídica es muy variable (entre 6 y 12 aminoácidos) entre las especies de *Pseudomonas* o incluso entre cepas de la misma especie, en *P. aeruginosa* se han reconocido tres tipos diferentes.

Las pioverdinas unen hierro con una gran afinidad, son capaces de desplazar el hierro de la transferrina (Cornelis y Dingemans, 2013). Una vez que el hierro ha sido solubilizado es transportado a la membrana exterior de la célula donde es percibido por receptores específicos y después entra en acción el sistema TonB para la translocación a través de la membrana citoplasmática. Cuando el hierro está dentro de la célula, es liberado de los ferri-sideróforos por un proceso reductivo antes de alcanzar sus blancos (Meyer, et al., 1996).

#### **I.1.3.4.3.2 Pioquelina.**

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

#### **I.1.3.4.3.3 Otras estrategias de captación de hierro.**

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

##### **I.1.3.4.3.3.1 Captación de xenosideróforos.**

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

#### **I.1.3.4.3.3.2 Sistemas de captación de hemo.**

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

#### **I.1.3.4.3.3.3 Captación de $\text{Fe}^{+2}$ a través del sistema Feo.**

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

#### **I.1.3.4.3.3.3.1 Piocianina.**

La fenazina es un compuesto heterocíclico proveniente del metabolismo secundario de color rojo, producido por *P. aeruginosa*, el cual es convertido en ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) de color amarillo y finalmente convertido en piocianina de color azul brillante. Se han identificado siete genes necesarios para la síntesis de piocianina *phzCDEFGMS*, donde *phzM* y *phzS* son los genes responsables de convertir PCA a piocianina (Jayaseelan, et al., 2013). Como se mencionó anteriormente, la piocianina y su precursor el PCA tienen una actividad importante en la reducción del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , debido a la actividad redox de la molécula. Pero además, es conocida la actividad antibacteriana de la

piocianina, que es dependiente de la concentración y tiene una acción diferencial hacia diferentes especies bacterianas. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la piocianina inhibe el crecimiento bacteriano, es a través de la interacción con la cadena respiratoria de la membrana celular con lo que inhabilita a las células bacterianas de realizar adecuadamente el proceso de transporte de electrones al desestabilizarlo por la acción redox de la piocianina sobre las proteínas de la cadena transportadora de electrones (Jayaseelan, et al., 2013).

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

#### **I.1.3.4.4 Toxinas y exoproteínas.**

Las exoproteínas son un importante componente de sobrevivencia bacteriana no solo debido a que permite interactuar a la bacteria con su ambiente inmediato y otros organismos en la vecindad, sino que también desempeñan un papel crítico en la virulencia. En *P. aeruginosa* hay una gran cantidad de proteínas secretadas y cinco de los siete tipos de secreción (tipo I, II, III, V y VI) caracterizados en bacterias. La mayoría de las proteínas secretadas son toxinas que ayudan a la virulencia, como LasA, LasB, PrpL, ToxA, fosfolipasas, etc., que son excretadas a través de los sistemas de secreción Xcp tipo II. Las moléculas efectoras que son cruciales para evadir la respuesta fagocítica del huésped son secretadas a través del sistema de secreción tipo III, mientras que el sistema tipo I secreta la proteasa alcalina AprA y el hemóforo HasAp (Balasubramanian, et al., 2013).

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

#### I.1.3.4.5 RNA reguladores en la virulencia de *P. aeruginosa*.

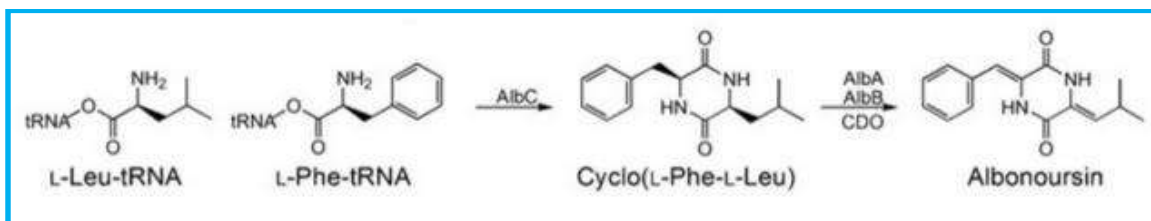
Los llamados ARN pequeños (ARNs) o RNA reguladores (ARNrg), afectan todos los pasos en las vías de expresión de genes en procariontes y eucariontes, estos ARNs son ARN diferentes de los ARN mensajeros (ARNm), RNA de transferencia (ARNt) o ARN ribosomales (ARNr). La regulación por los ARNs ocurre en una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

#### I.1.3.5 Importancia de los ciclodipéptidos y el sistema de QS en *P. aeruginosa*.

Como se ha descrito anteriormente, el sistema de QS es el principal regulador de la virulencia en *P. aeruginosa* y a su vez la regulación del sistema QS se lleva a cabo principalmente por biomoléculas llamadas autoinductores, dentro de los cuales se clasifican los CDPs. Actualmente los CDPs son de gran interés, debido a su participación dentro de la regulación del sistema de QS y además por las diversas actividades biológicas que estos poseen. A continuación se describe a los CDPs, así como los sistemas involucrados en la síntesis de estos y algunas de las actividades biológicas que se les atribuyen.

## I.2 Ciclodipéptidos.

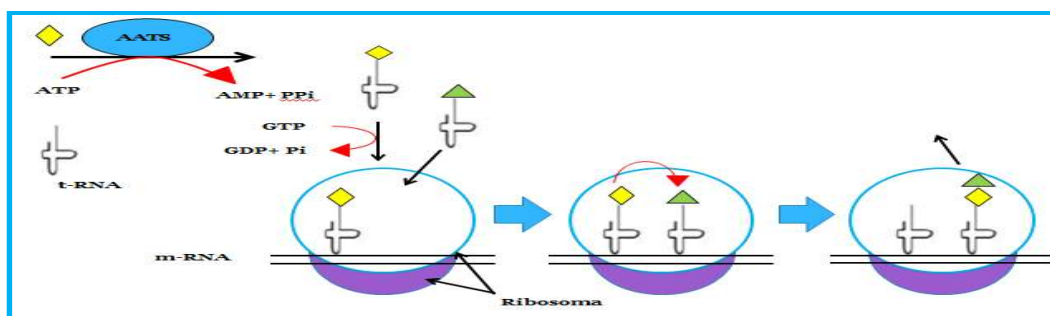
Los ciclodipéptidos o péptidos cíclicos (CDPs) son moléculas que están conformadas por un par de aminoácidos, los cuales pueden variar y están unidos mediante dos enlaces peptídicos para formar dipéptidos cíclico que posteriormente pueden sufrir modificaciones para dar lugar a las dicetopiperazinas (DKPs). Un ejemplo es la síntesis de Albonoursin, que en un primer paso, se integran los aminoácidos L-Leu y L-Phe, formando dos enlaces peptídicos mediante la enzima AlbC en *S. nursei*, para producir el ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Leu). Posteriormente este sufre una modificación por la intervención de las proteínas AlbA/AlbB que presentan actividad de ciclodipéptido oxidasas para producir la dicetopiperazina (Figura 6).



**Figura 6.** Síntesis de ciclo(L- Phe-L-Leu) y Albonoursina a través del sistema AlbC y posterior transformación en 2,5- dicetopiperazina (DKPs) mediante una ciclodipéptido oxidasa (CDO) (Tomado de Belin et al., 2013).

### I.2.1 Enlace peptídico originado en los ribosomas.

El sistema ribosomal de síntesis de péptidos es utilizado por la mayoría de los organismos para síntesis de proteínas y péptidos, caracterizados por contener enlaces peptídicos (Figura 7); sin embargo se ha reportado que algunos organismos emplean sistemas diferentes para la formación de enlaces peptídicos, útiles en la producción de metabolitos secundarios como penicilinas, vancomicina y gramicidina; la familia de las péptido sintetetas no-ribosomales (NRPS) son un ejemplo de estos sistemas alternativos (Finking and Marahiel 2004).



**Figura 7.** Diagrama esquemático de la síntesis de péptidos por el sistema ribosomal. Triángulos y diamantes cerrados indican los aminoácidos. AATS: aminoacil RNA-t sintasa (modificado de Hashimoto, 2006).

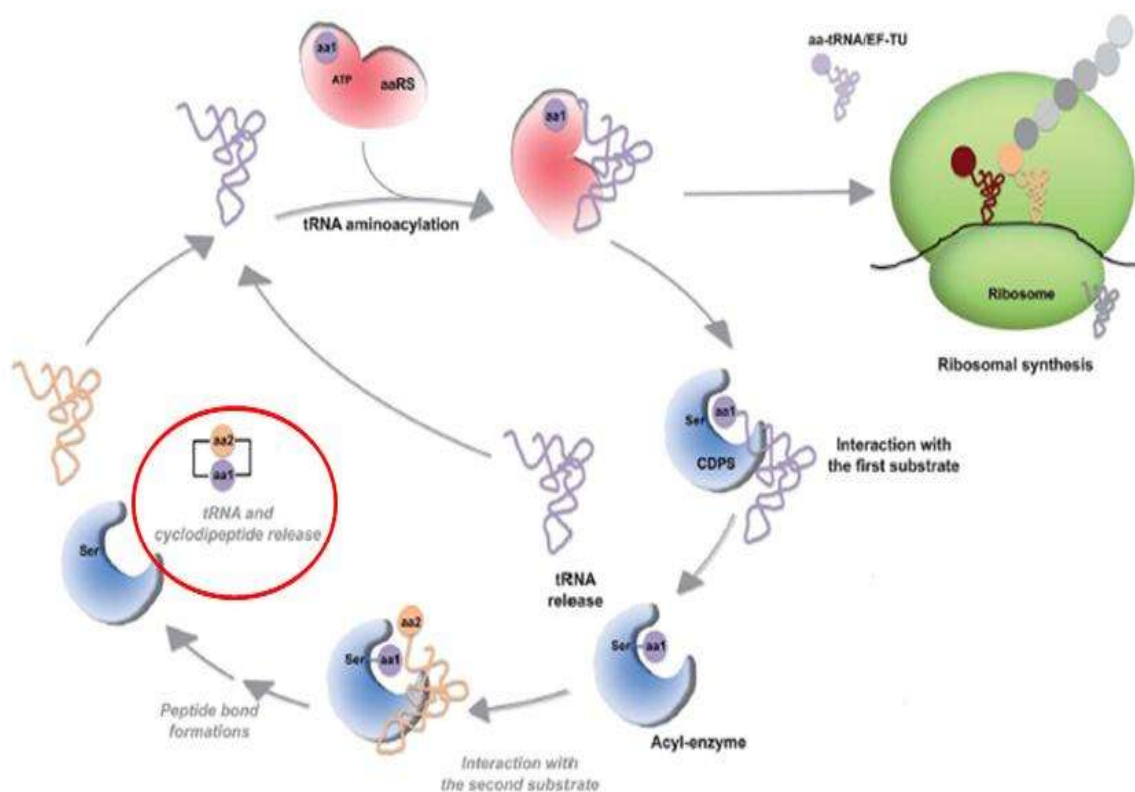
Inicialmente, se creía que los ciclodipéptidos eran formados por aminoácidos intermediarios de la degradación de las proteínas (Hashimoto, 2006). Pero actualmente se describen sistemas alternativos que participan en la formación de enlaces peptídicos para la biosíntesis de ciclodipéptidos; el primero mediante ciclodipéptido sintetas (CDPS) y el segundo mediante péptido sintetetas no-ribosomales (NRPS).

### I.2.2 Síntesis de ciclodipéptidos mediante ciclodipéptido sintetas (CDPS).

En 2002 se describió una vía de biosíntesis de ciclodipéptidos alternativa a las NRPS; se identificó una pequeña enzima a la que se llamó AlbC (239 residuos), la cual participa en la formación del ciclodipéptido ciclo(L-Phe-L-Leu) y fue identificada en *Staphylococcus nursei* (Lautru, 2002), caracterizándose como una ciclodipéptido sintasa (CDPS) (Gondry, 2009).

Las CDPS son enzimas de un tamaño pequeño y son monomodulares. En este sistema se utilizan como sustrato los aminoacil-RNA los cuales usualmente se dirigen a los ribosomas para la síntesis de proteínas. Las CDPS captan algunos aa-RNA para la formación de los ciclodipéptidos, los aa-RNA se generan a partir de un aminoácido, ATP y RNA por las aminoacil-RNA sintetetas (Figura 8).

Inicialmente, se da una primera interacción entre una ciclodipéptido sintasa con un aa-RNAt que lleva consigo un aminoácido, el cual quedará anclado a la CDPS para que posteriormente el RNAt sea liberado. A continuación, se da una segunda interacción entre la misma enzima CPDS que lleva anclado un primer aminoácido con un segundo aa-RNAt, el cual llevará consigo un segundo aminoácido. El aminoácido interactúa con el primer aminoácido y la CDPS forma los dos enlaces peptídicos; y por último, se realiza la liberación del segundo RNAt y el ciclodipéptido (Figura 8).

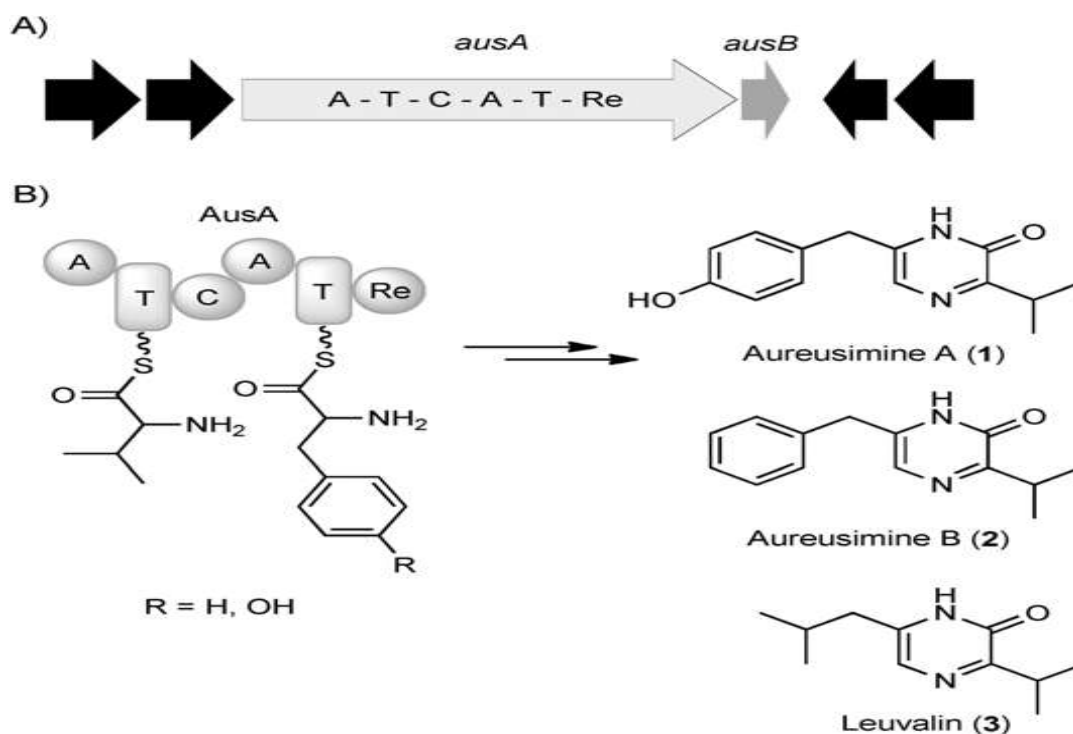


**Figura 8.** Mecanismo de biosíntesis de CDPs por ciclodipéptido sintasas dependientes de aminoacil-tRNAs (Modificado de Belin et al., 2012).

### I.2.3 Síntesis de ciclodipéptidos mediante péptido sintetasa no-ribosomales (NRPS).

El segundo sistema que se ha descrito para la síntesis de ciclodipéptidos, es a través de enzimas conocidas como péptido sintetasa no-ribosomal (NRPS), las cuales difieren de las enzimas CDPS en diferentes aspectos. Las NRPS son de mayor masa molecular que las CDPS, generalmente las NRPS son enzimas 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 (Figura 9).



**Figura 9.** Biosíntesis de un ciclodipéptido mediante enzimas NRPS, el cual es un sistema dependiente de ATP para activación de los aminoácidos. Las enzimas tienen diferentes dominios, los cuales tienen actividades definidas para la formación de los ciclodipéptidos (Morgan et al., 2012).

### I.2.3.1 Dominio de Adenilación (A).

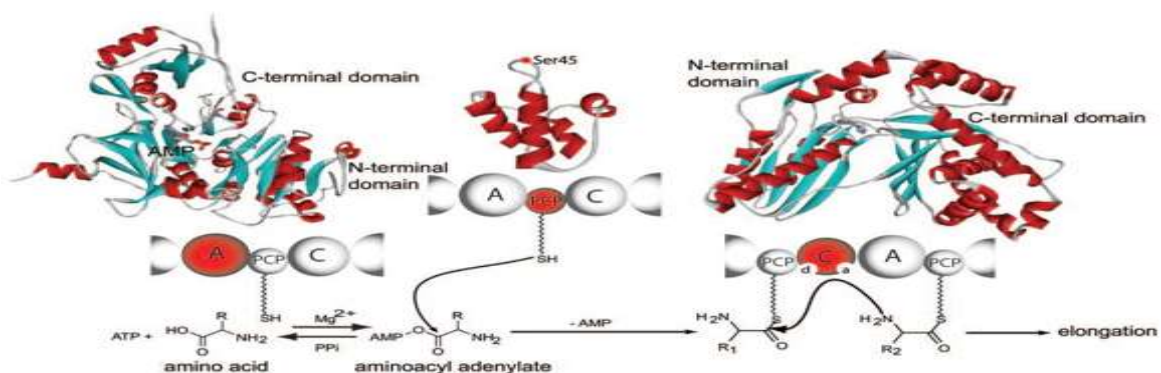
El dominio de adenilación (~ 550 aa) es el primer dominio que interviene en la biosíntesis de péptidos no-ribosomales. El dominio de adenilación reconoce de manera específica y activa a los aminoácidos. Este dominio en primer lugar reconoce de manera específica el aminoácido de entre los substratos disponibles 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 (Figura 5; Grunewald y Marahiel, 2006).

### I.2.3.2 Dominio PCP.

El dominio PCP (~80 aa) facilita el transporte ordenado de sustratos y la elongación intermediaria 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 serina<sub>45</sub> 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 (Figura5; Grunewald y Marahiel, 2006).

### I.2.3.3 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 (Figura 10; Grunewald y Marahiel, 2006).



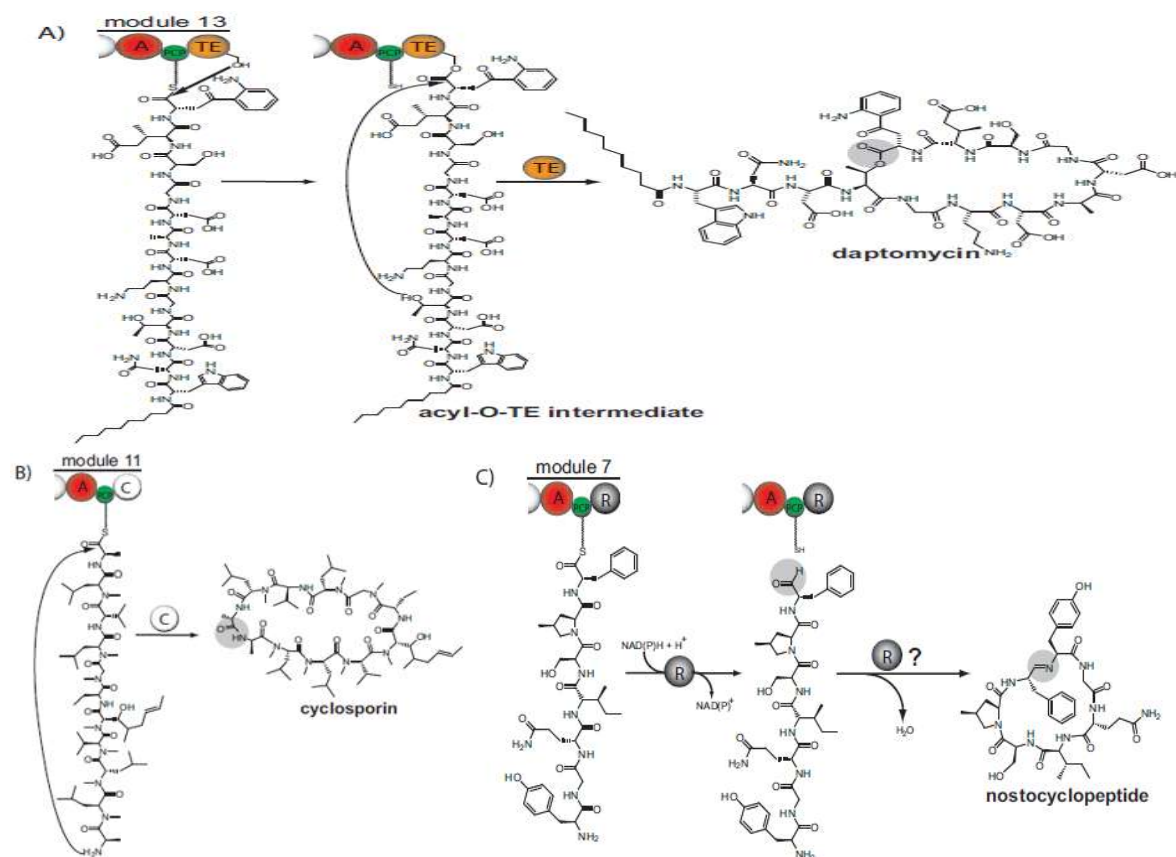
**Figura 10.** Mecanismo de reacción de las NRPS durante la biosíntesis de CDPs. Dominios de adenilación (A), dominio PCP y dominio de condensación (C) (Tomado de Grunewald y Marahiel, 2006).

### I.2.3.4 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 de ppan enlazado a la serina del sitio TE río abajo, para generar un producto intermediario del tipo acilo-O-TE (Grunewald y 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 (Figura 11 A). 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 (Figura 11 B). 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 NAD(P)H de la NRPS; como ocurre en la síntesis del péptido lineal gramicidina A y en la formación de la lactona nostociclopéptido 8 (Figura 11 C; Grunewald y Marahiel, 2006).



**Figura 11.** 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).

### I.2.3.5 Modificación lipídica de péptidos no-ribosomales.

La unión de lípidos al N-terminal de los péptidos lineales, es una característica estructural clave de muchos péptidos no-ribosomales, algunos ejemplos de lipopéptidos son los antibióticos fengicina, surfactina A, siringomicina y micosubtilisina. Lo cual es importante para la interacción con blancos hidrófobos como las membranas de las células. Sin embargo, en contraste con la elongación del péptido, muy poco se sabe sobre el mecanismo de esta transformación química. En el caso de la daptomicina, los productos de los genes *dptE* y *dptF* son los que juegan un papel en la unión de lípidos al N-terminal. La enzima DptE exhibe motivos conservados típicos de enzimas formadoras de adenilato y por lo tanto pueden activar el ácido graso de cadena larga para que sea incorporado al péptido no-ribosomal (Figura 12) (Grunewald y Marahiel, 2006).

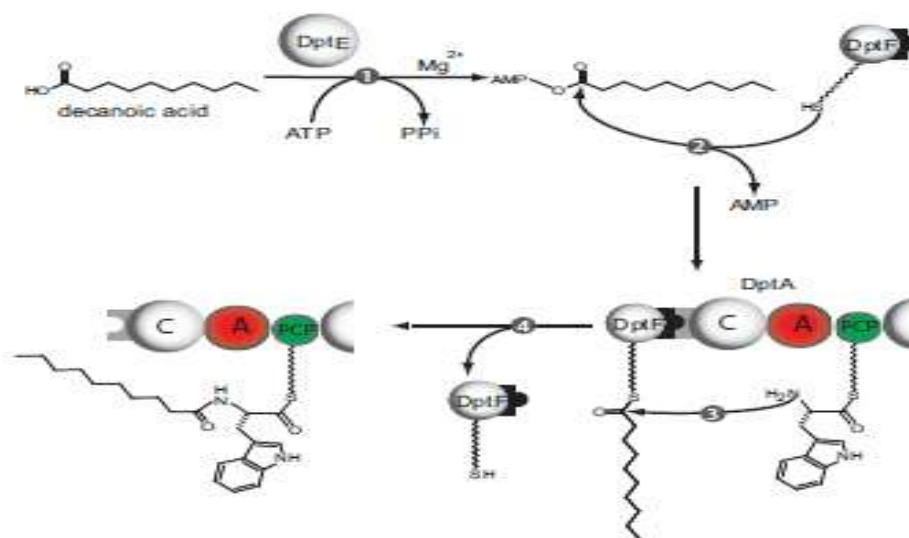
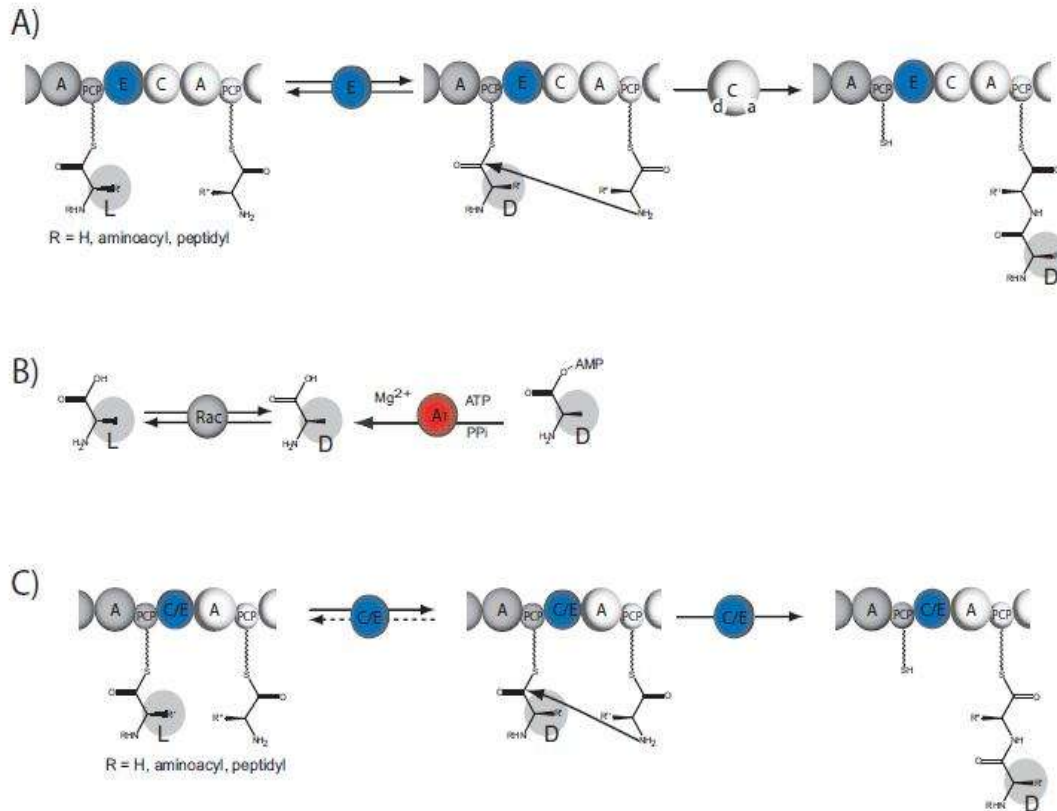


Figura 12. Lipidación de daptomicina (tomado de Grunewald y Marahiel, 2006).

### I.2.3.6 Integración de D-Aminoácidos a péptidos no-ribosomales por las NRPS.

Una característica interesante de las NRPS es que pueden incorporar D-aminoácidos en sus productos peptídicos. Los residuos de configuración D pueden inhibir la degradación de péptidos no-ribosomales por proteasas que naturalmente son específicas para residuos de configuración L, o pueden proveer funciones bioactivas adicionales relacionadas a su estructura. Existen tres formas para la epimerización o agregación de D-aminoácidos a la estructura del péptido naciente. Un primer proceso puede ocurrir en la mayoría de los casos mediante la incorporación de D-aminoácidos a la secuencia del péptido; esta mediada por una interacción entre el dominio de epimerización (E-domain; ~450 aa) y el dominio de condensación C.



**Figura 13.** Mecanismos de Adenilación de péptidos no ribosomales. A) epimerización del aminoácido C-terminal por el dominio E. B) actividad de metilación por los dominios A Y C. C) tres dominios A anteriores activan L- aminoácidos en lugar de D-aminoácidos (Grunewald y Marahiel, 2006).

El dominio E cataliza la racemización (equilibrio entre enantiómeros D) del L-aminoácido unido al dominio PCP o la epimerización del aminoácido del C-terminal (equilibrado entre los epímeros L y D) de la cadena creciente del péptido (Figura 13 A). En un segundo ejemplo el mecanismo para la incorporación de D-aminoácidos es utilizado por la sintetasa de ciclosporina. El cluster de genes biosintéticos codifica una alanina racemasa que provee sustratos para la selectividad de D-Ala del dominio A en el primer módulo. Esto demuestra que además los dominios A y C también pueden representar un filtro estereoselectivo en síntesis de péptidos no ribosomales (Figura 13 B). Recientemente se observó una tercera estrategia para la incorporación de D-aminoácidos en múltiples cepas gram negativas de *Pseudomonas* productoras de artrofactin, siringomicina y siringopeptina. El artrofactin por ejemplo, contiene siete D-aminoácidos, sin embargo, no hay ningún dominio E en cualquiera de los tres NRPS que se estudiaron (ArfA, ArfB y ArfC). Por otra parte, medidas cinéticas revelaron que al menos los tres dominios A anteriores activan L-aminoácidos en lugar de D-aminoácidos (Figura 13 C). Curiosamente, la epimerización de los aminoácidos es catalizada por un nuevo tipo de dominio, un dominio C/E, que propone un papel catalítico dual de epimerización y condensación (Grunewald y Marahiel, 2006).

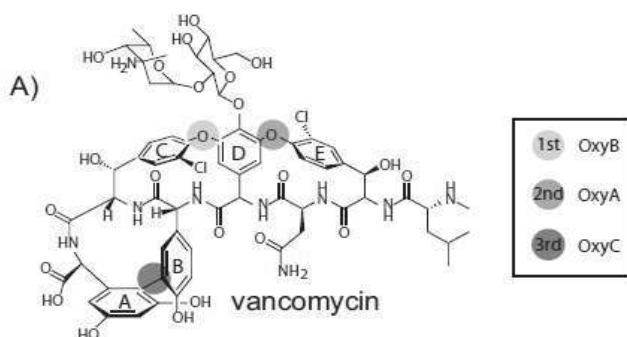


### I.2.3.9 Adhesión de heterociclos.

En algunos casos el dominio C es sustituido por un dominio de ciclización (Cy). El dominio Cy cataliza la ciclo deshidratación del enlace peptídico para generar heterociclos rígidos de cinco miembros, como las oxazolininas derivadas de treonina o serina, y tiazoles derivados de cisteína. En muchos casos, la heterociclación catalizada por el dominio Cy es seguida de una oxidación de dos electrones para formar oxazoles y tiazoles aromáticos. Esto se logra por un dominio de oxidación (Ox) (~250 aminoácidos), el cual usa mononucleótidos de flavina como cofactor. Por ejemplo, la bacitracina contiene el anillo tiazolínico que le confiere complejidad (figura 16, resaltado en color verde), esta complejidad previene la desfosforilación de los fosfolípidos, un paso clave en la biosíntesis de la pared celular, lo cual lleva a la inhibición de péptidoglicano y así matando bacterias no deseables; y vibriobactina que contiene dos anillos oxazolininas, que ayudan a posicionar los grupos hidroxilo de los catecoles para quelar iones metálicos, como Fe (III) (Grunewald y Marahiel, 2006).

### I.2.3.10 Entrecruzamiento del esqueleto por oxidación.

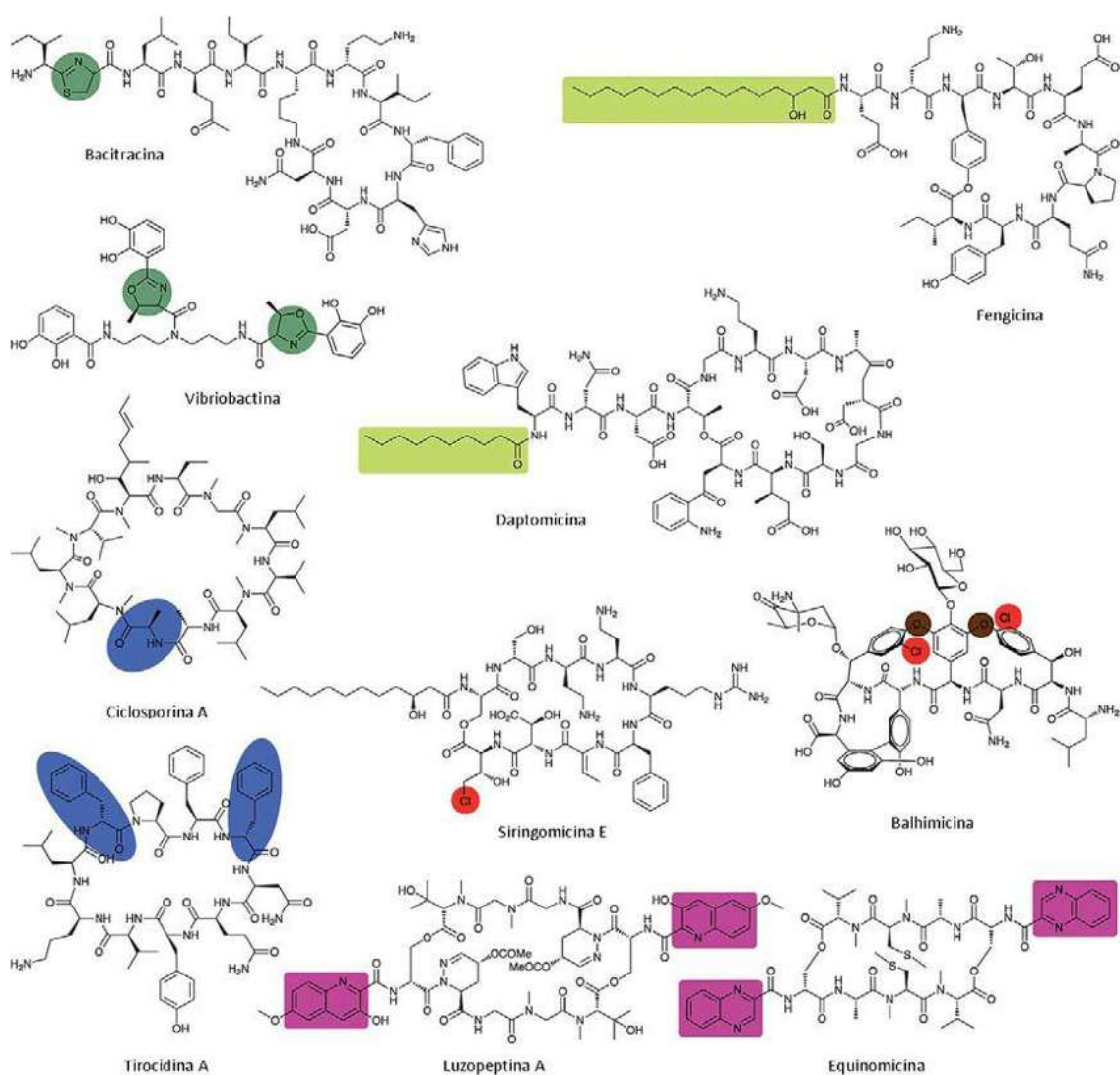
Las reacciones de oxidación del esqueleto peptídico son realizadas por enzimas oxidasas que actúan independientemente de la línea de ensamblaje de las PSNR y confiere una gran rigidez estructural. Aunque se conoce poco acerca del mecanismo, estas oxidaciones son específicas y parece que se llevan a cabo mientras se realiza el proceso de elongación de la cadena peptídica. Por ejemplo, para la síntesis de vancomicina (figura 15) y balhimicina tres reacciones de entrecruzamiento de las cadenas laterales ricas en electrones son catalizadas por enzimas oxidasas tipo citocromo P450 (OxyA, OxyB y OxyC) (Grunewald y Marahiel, 2006).



**Figura 15.** Entrecruzamiento por oxidación para síntesis de vancomicina. Tomada de Grunewald y Marahiel, 2006

## I.2.4 Actividad biológica de los ciclodipéptidos.

Actualmente se ha retomado el interés en los ciclodipéptidos y sus derivados las dicetopiperazinas, debido a que se ha reportado desde hace algunos años que estos poseen actividades biológicas muy diversas (Prasad, 1994; Belin et al., 2012), lo cual es de interés para la investigación y por supuesto para un uso posterior en la industria de la biotecnología y farmacología. Por ejemplo, si bien algunos ciclodipéptidos pueden tener aminoácidos repetidos, sus derivados (dicetopiperazinas) dan una amplia gama de actividades (Figura 16); como actividad antimicrobiana, promotores de quorum sensing, incluso con actividad citotóxica y además son producidos por diferentes microorganismos (Tabla 4).



**Figura 16.** Ejemplos de péptidos no ribosomales con diferentes aplicaciones clínicas, los sitios coloreados son las estructuras que les proporcionan cierta actividad biológica (modificada de Hur, et al., 2012).

**Tabla 4.** Diferentes ciclodipéptidos y derivados de ciclodipéptidos que poseen actividad biológica, producidos por microorganismos.

<b>Ciclodipéptido</b>	<b>Microorganismo productor</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencia</b>
<b>ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo (L-Pro-L-Val) ciclo (L-Pro-L-Phe)</b>	<i>P. aeruginosa.</i>	Citotóxica, Promotor de crecimiento vegetal.	Vázquez-Rivera, et al., 2014; Ortiz-Castro, 2012.
<b>ciclo(Phe-Pro)</b>	Sintetizados en laboratorio.	Inducción de apoptosis en células cancerosas.	Brauns et al, 2004.
<b>ciclo (Pro-Val)</b>	<i>Rosellinia necatrix,</i> <i>Aspergillus ochraceum</i> <i>Metharhizum ansiopha,</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Inhibición de crecimiento celular.	Chen, 1960. Munekata and Tamura, 1981. Prasad, 1995.
<b>Ciclo (L-Gly-L-Pro) ciclo (L-Arg-D-Pro) ciclo (L-Arg-L-Pro)</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Antifúngico	Houston, 2004.
<b>Albonursin derivado de ciclo(Phe- Leu)</b>	<i>Streptomyces noursei,</i> <i>S. alburus</i>	Antibiótico	Khokhlov and Lokshin, 1963. Prasad, 1995.
<b>Echinulin Derivado de ciclo(Ala- Trp)</b>	<i>Aspergillus chevalieri</i>	Alcaloide	MacDonard and Slater, 1966, Allen, 1972.
<b>Ácido rodotorulico (ciclodimero de <math>\delta</math>-N-acetil- <math>\delta</math>-N-hidroxiornitina)</b>	<i>Rhodotorula piliminae,</i> <i>Leucosporidium,</i> <i>Rhodospordium,</i> <i>Sporidiobolus</i>	sideroforo	Aktin et al. 1970, Prasad, 1995
<b>Ciclo (Pro-Leu)</b>	<i>Rosellinia necatrix,</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Atenuación de dependencia a morfina	Chen, 1960. Prasad, 1995.
<b>Ciclo (Ala-Leu)</b>	<i>Aspergillus niger</i>	Alcaloide	Cesar et al., 1969. Prasad, 1995.

## II. JUSTIFICACIÓN.

Los ciclodipéptidos (CDPs) son de gran interés por su potencial bioactivo. Se ha reportado que la síntesis de CDPs en *P. aeruginosa* PAO1 es a través de NRPS multi-modulares. Sin embargo, la participación individual de los genes que codifican para NRPS en *P. aeruginosa* PAO1 no es esencial para la biosíntesis de CDPs, existiendo la posibilidad de presentarse redundancia genética; por lo que es de gran importancia dilucidar la participación conjunta de los genes codificantes de las posibles NRPS.

## III. HIPOTESIS.

La actividad conjunta de genes redundantes cuyos productos son péptido sintetasas no-ribosomales multi-modulares (NRPS) es esencial para la biosíntesis de ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

## IV. OBJETIVOS.

### IV.1 Objetivo General.

Estudiar mediante mutagenesis los genes implicados en la biosíntesis de los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro- L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Val) en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

### IV.2 Objetivos específicos.

1. Obtener mutantes dobles de los genes que codifican a las probables NRPS de *P. aeruginosa* PAO1 implicadas en la biosíntesis de CDPs.
2. Caracterizar fenotípicamente las mutantes en los genes que codifican a las probables NRPS de *P. aeruginosa* PAO1 implicadas en la biosíntesis de CDPs.

## V. MATERIALES Y METODOS.

### V.1 Material biológico.

Para llevar a cabo el presente proyecto, se emplearon diversas cepas (Tabla 5), para la obtención de mutantes dobles, mediante técnicas de cortes y ligaciones de DNA con diversas enzimas (Tabla 7). Para la edición y replicación de DNA, fue necesario diseñar un par de oligos para cada uno de los genes NRPS seleccionados (Tabla 9) y se emplearon diversos plásmidos como él (Tabla 6). Para la selección de mutantes fue necesario el uso de marcadores de selección (tabla 8).

**Tabla 5.** Cepas empleadas

<b>Cepas</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa estándar de laboratorio	Stover, et al., 2000
<i>E. coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio para clona de fragmentos de DNA.	Yanisch et al., 1985
<i>E. coli</i> PRKS2013	Cepa auxiliar para la formación de pili en la técnica de conjugación bacteriana.	Figurski et al., 1979
<i>E. coli</i> S17-1	Cepa donadora útil en la técnica de conjugación bacteriana.	
468	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2402	Jacobs, et al., 2003
778	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2424	Jacobs, et al., 2003
3265	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2400	Jacobs, et al., 2003
4216	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2302	Jacobs, et al., 2003
8984	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2305	Jacobs, et al., 2003
41376	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>sphoA</i> /hah en el ORF PA4225	Jacobs, et al., 2003
42724	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>sphoA</i> /hah en el ORF PA4078	Jacobs, et al., 2003
45465	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>sphoA</i> /hah en el ORF PA3327	Jacobs, et al., 2003
49903	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>sphoA</i> /hah en el ORF PA4226	Jacobs, et al., 2003
CP14	Género y especie no identificada.	Tesis de maestría Martínez-Carranza, 2014.
1 A 9	<i>Halomonas</i> sp. Identificada de aislados bacterianos de fosa Churince, Cuatro Ciénegas, Coahuila.	Tesis de maestría Martínez-Carranza, 2014.

**Tabla 6.** Plásmidos.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación	Yanisch et al., 1985.
pKOK4	Plásmido suicida que contiene gen <i>mob</i> para llevar a cabo técnica de conjugación bacteriana	Werner et al., 1990.
pBSL141	Plásmido que contiene cassette de resistencia a Gentamicina flanqueado por múltiples sitios de corte.	Alexeyev et al., 1995.

**Tabla 7.** Enzimas para realizar construcciones de DNA.

Enzimas	Características
<i>EcoRI</i>	Secuencia de corte g/aattc
<i>SalI</i>	Secuencia de corte g/tcgac
<i>BamHI</i>	Secuencia de corte g/gatcc
<i>XhoI</i>	Secuencia de corte c/tcgag
T4 DNA ligasa	Enzima de ligación de DNA
Taq polimerasa	Enzima de polimerización.
Pfx DNA polimerasa	Enzima polimerasa, amplificadora de fragmentos de DNA.

**Tabla 8.** Antibióticos.

Antibiótico	Características	Referencia.
Ampicilina (Ap)	Marcador de selección para cepas de <i>E. coli</i> estándar usadas en laboratorio.	Yanisch et al., 1985.
Estreptomycin (Sm)	Marcador de selección para cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	Stover et al., 2000
Gentamicina (Gm)	Marcador de selección para fragmentos que integren GM <sup>R</sup> obtenido del plásmido pBSL141.	Alexeyev et al., 1995.
Tetraciclina (Tc)	Marcador de selección para mutantes simples de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 obtenidas por trasposición.	Jacobs, et al., 2003.

**Tabla 9.** Diseño de oligos para la amplificación de fragmentos internos de nueve genes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

<i>Gen</i>	<i>Oligos</i>	<i>Tamaño del fragmento (kb)</i>	<i>Sitio de restricción interno</i>
<i>pvdL</i>	<i>FW 5'CGA CCA GCG CCT CGG CTG CCT GAC 3'</i> <i>RV 5'ACC GTC TCG GTC GGT CCG TAG GCA TTG 3'</i>	1.1	XhoI
<i>pvdJ</i>	<i>FW 5'TAC CTA TGG ACC GAC CGA GGC CAC GGT 3'</i> <i>RV 5'CGG GTA CGC AAC GAC TCG TGA CGC TGT 3'</i>	1.1	XhoI
<i>ambB</i>	<i>FW 5'GGC GCC GTT CGC CCC GCC GCT CCA GGC 3'</i> <i>RV 5'GAG GTT GAC GAA GCA GCC GAC CAG CCC 3'</i>	1,2	SalI
<i>ambE</i>	<i>FW 5'CTC TAC GGT CCT ACC GAA GCC ACG GTG 3'</i> <i>RV 5'GAG CAG CAC ATC CAT TTC CGC GCG CTG 3'</i>	1.1	SalI
<i>pchE</i>	<i>FW 5'GCG TCG AGG TCA GCC ACG CGG CGA 3'</i> <i>RV 5'CCA TCG CGG TCA GCC CCG CGG CCT GCC 3'</i>	1.1	SalI
<i>pchF</i>	<i>FW 5'TCA CCT GCC GGG ACC GCG CTG CGT GCT 3'</i> <i>RV 5'TGC AGG CCC TGG CTG TAC ATG GCC TCG 3'</i>	1.1	BamHI
<i>PA2402</i>	<i>FW 5'ACA TGC AAC CGA CGG CTT GGC AGG TGC 3'</i> <i>RV 5'CCC GCC GGG CGC AGG CCA GCA GCT CCT 3'</i>	1.1	SalI
<i>PA3327</i>	<i>FW 5'CGA AGT ACG CGA CCG CCT CGC GCT 3'</i> <i>RV 5'GCC GGC GAA GCC AGC GCG GCC AGC TCC 3'</i>	1.1	SalI
<i>PA4078</i>	<i>FW 5'CGG GCG TCT GCC TGG CGC GCG AAT ACC 3'</i> <i>RV 5'TGC CGG CCA GCT CGC GAT AGG TTT CCG 3'</i>	1.1	SalI

## V. 2 Medios de cultivo y selección.

### *Medio líquido Luria-Bertani (LB) 100 ml*

0.5g NaCl  
1g Peptona de caseína  
0.5g Extracto de levadura  
H<sub>2</sub>O destilada c.b.p. 100 ml, pH 7.

### *Medio agar Luria-Bertani (LB) 100 ml*

0.5g NaCl  
1g Peptona de caseína  
0.5g Extracto de levadura  
H<sub>2</sub>O destilada c.b.p. 100 ml, pH 7.  
1.5g Agar bacteriológico

### ***Medio completo para células humanas.***

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/  
Nutrient Mixture F-12 Ham con  
L-glutamina.  
15 g/L HEPES 15mM,  
1.5 g/L NaHCO<sub>3</sub>  
10,000 U/ml y 10mg/L [1%]  
(Penicilina/Estreptomina)  
10% Suero fetal bovino (SBF, Sigma)  
H<sub>2</sub>O destilada estéril cbp.  
Ajustar pH a 7.4

### ***Medio incompleto para células humanas.***

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/  
Nutrient Mixture F-12 Ham con  
L-glutamina.  
15 g/L HEPES 15mM.  
1.5 g/L NaHCO<sub>3</sub>.  
H<sub>2</sub>O destilada estéril c.b.p.  
Ajustar pH a 7.4.

## **V.3 Métodos**

### **V.3.1 Preparación de stock de glicerol 50%.**

Para preservar una cepa durante un largo periodo de tiempo, es recomendable guardarla en ultracongelación, para lo cual se necesita un tratamiento previo el cual deberá ser en esterilidad. Es necesaria una colonia de la bacteria de interés aislada para inocular un tubo con 3 ml de medio líquido LB, el cual se incubó a 30° C por 12-18 horas. Posteriormente centrifugando (12mil rmp/ 5min; eppendorf Centrifuge 5415 D) se cosechan las células y se desecha el sobrenadante, las células obtenidas son resuspendidas en 300 µl de glicerol [50%] y 700 µl de medio LB líquido. Para homogenizar la muestra es necesario agitarla usando un vortex. Una vez que se les ha dado este tratamiento a las células, estas pueden ser guardadas en ultracongelación (-80° C).

### **V.3.2 Aislamiento de plásmido por método de lisis alcalina.**

Para recuperar el plásmido de interés, se requiere desechar el sobrenadante y cosechar las células totales que suponemos llevan el plásmido requerido, mediante centrifugación (12mil rpm/5min; eppendorf Centrifuge 5415 D); las cuales deberán haber crecido previamente durante 12 a 18 horas en 3ml de medio líquido LB a una temperatura de 30°C.

Una vez separadas las células en un tubo eppendorf, se les adiciona 150 µl de Buffer STE y se homogenizan mediante agitación con ayuda de un vortex. Posteriormente se procede a realizar un tratamiento para romper las células y exponer el material genético; el tratamiento consiste en colocar 250 µl de una solución de lisis, la cual debe llevar los siguientes reactivos con los volúmenes indicados; 800 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril, 100 µl SDS 10% y 100 µl NaOH 2N, agitar vigorosamente con las manos para homogenizar y llevar la muestra a 4°C/10 min. Ahora el material genético estará expuesto y se procedió a separarlo del RNA y materiales bacterianos que no son de nuestro interés adicionando 150 µl de Acetato de Sodio [ 3M] pH 4.8, se agitó vigorosamente la muestra para homogenizarla, se lleva a 4°C /10 min y posteriormente se centrifuga (12mil rpm/2 min; eppendorf Centrifuge 5415 D). Se colocaron 150µl de Fenol:Cloroformo [1:1] y se homogenizo la muestra agitándola con ayuda de un vortex durante 50 segundos y posteriormente se centrifuga la muestra para obtener 3 fases (12mil rpm/7 min; eppendorf Centrifuge 5415 D).

Se procedió a la separación de la fase acuosa (fase superior) en un eppendorf limpio y estéril con ayuda de una micropipeta y con cuidado de no deshacer la fase intermedia o traer fase orgánica o inferior, las cuales deberán desecharse en un contenedor apropiado para este tipo de material biológico. Posteriormente se realizaron varios lavados para purificar el DNA de interés; un primer lavado se realiza colocando 800 µl de Etanol:Isopropanol [60%:40%] en la fase recuperada y agitar vigorosamente con las manos, se lleva a congelador (-20°C / 10 min) y se centrifuga la muestra (12mil rpm/ 1 min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y se decanta el sobrenadante; en el segundo lavado se resuspende el precipitado obtenido en 700 µl de etanol [70%] y se agita procurando que el precipitado se desprenda de la base del eppendorf, centrifugar la muestra (12mil rpm/5min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y se decanta; por último se realizó un tercer lavado con las mismas especificaciones que el segundo lavado pero después de decantar la muestra, se quita el exceso de etanol con ayuda de una micropipeta y la muestra se llevó una temperatura de 37°C por un lapso de 7 a 10 min dejando el eppendorf abierto para evaporar el etanol que haya quedado.

Cuando la muestra de ADN este seca se resuspenderá en 50 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril y 3 µl de RNasa para disolver el precipitado de DNA, posteriormente la muestra puede ser guardada en congelación (-20°C) para su uso posterior. Si se quiere verificar la presencia del DNA plasmídico deseado, será necesario probar la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa [0.8%].

### **V.3.3 Electroforesis**

Para la corroboración de tamaños de fragmentos de DNA construido y DNA aislado y/o purificado se preparó de un gel de agarosa [0.8%] el cual se preparó con 0.8g de agarosa +100 ml TAE 1X. La solución se calienta hasta ebullición para fundir los cristales de agarosa. La agarosa fundida será vaciada en una base para geles de electroforesis está bien montada, se procede a colocar el gel fundido hasta que alcance el volumen para tener grosor adecuado. A continuación se colocó la base con el gel solidificado dentro de la cámara de electroforesis de tal forma que los pocillos de carga queden en el polo de carga negativa (-) para que las muestras corran hacia la carga positiva (+). La cámara deberá estar llena con TAE 0.8X hasta un nivel que cubra el gel de agarosa.

Una vez que la cámara de electroforesis fue montada correctamente, se procedió a cargar los pocillos; colocando cada una de las muestras mezcladas con 2µl de buffer de carga. Para el corrimiento de las muestras, la fuente de poder fue programada con los siguientes parámetros; 130v para geles delgados o 110v para geles gruesos útiles para purificación de DNA; 500mA; 30 min (gel delgado) o 45 min (gel grueso).

Para visualizar las bandas que hayan quedado en el gel de agarosa, este se tiñó con una solución de Bromuro de etidio ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) por 7-10 min y posteriormente se le quito el exceso de bromuro de etidio con ayuda de agua corriente (si solo se desea ver las bandas obtenidas); pero los lavados se realizaron con agua destilada si el gel se requería para corte y purificación de DNA. Para visualizar las bandas obtenidas, se utilizó un transiluminador y el software BioCapt.

### **V.3.4 Extracción de DNA total bacteriano.**

Para obtener DNA bacteriano no plasmídico inocular 3 ml de medio líquido LB con una colonia aislada de la cepa deseada previamente sembrada en medio sólido con antibiótico. Incubar el medio inoculado 30°C / 12-18 horas en rotación. Posteriormente cosechar las células mediante centrifugación (10mil rpm/ 1 min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y decantar el sobrenadante.

El precipitado de células obtenidas se resuspenden en 400 µl de TE y 20 µl de lisozima [20mg/ µl] y se lleva a incubación a 37°C/ 30 min. Terminado el tiempo de incubación se adiciona 10 µl de proteinasa y se lleva nuevamente a incubación a 37°C / 15 min. Ahora se adicionara 100 µl NaCl 5M y agitar 15 min con ayuda de un vortex.

El eppendorf de la muestra ahora deberá calentarse a 65°C/ 5 min con ayuda de un baño seco (Fisher scientific) y se le agregara 80 µl de CTAB; el cual también debió ser calentado previamente a 65°C/ 5min también con ayuda de un baño incubador seco (Fisher scientific); y mezclar. La mezcla de la muestra con el CTAB nuevamente se dejara incubando en el baño incubador seco ((Fisher scientific) a 65°C/ 10 min.

Transcurrido el tiempo se agregaran 200 µl de cloroformo y agitara la muestra con ayuda de un vortex/ 5 min; ahora se agregara 150 µl Fenol: Cloroformo [1:1] y nuevamente agitar con ayuda de un vortex/ 50 segundos. Terminado este procedimiento la mezcla de reacción se llevara a centrifugar para obtener tres fases (12mil rpm/7 min; eppendorf Centrifuge 5415 D), se separaran las fases recuperando la fase acuosa (superior) y desechando la fase intermedia e inferior (clorofórmica).

Ahora se realizaran una serie de lavados; en el primer lavado adicionar 800µl Etanol:Isopropanol [60%:40%] y agitar vigorosamente con las manos, llevar a congelador (-20°C/ 10 min) y centrifugar (12mil rpm/1 min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y decantar sobrenadante; en el segundo lavado resuspender precipitado en 700 µl de etanol [70%], agitar con las manos para despegar el precipitado, centrifugar (12mil rpm/5 min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y decantar y quitar el exceso de etanol con ayuda de una micropipeta y la muestra se llevara una temperatura de 37°C por un lapso de 7 a 10 min dejando el eppendorf abierto para evaporar el etanol que haya quedado.

Cuando la muestra de ADN este seca se resuspenderá en 50 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril y 3 µl de RNasa para disolver el precipitado de DNA, posteriormente la muestra puede ser guardada en congelación (-20°C) para su uso posterior. Si se quiere verificar la presencia del DNA plasmídico deseado, será necesario probar la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa [0.8%].

### **V.3.5 Purificación de DNA.**

Para purificar fragmentos de DNA y evitar tener secuencias de DNA no deseadas es necesario realizar un corte de la banda que representa al DNA de interés en el gel de agarosa y realizarle un procedimiento de purificación para eliminar la agarosa. La muestra con el DNA de interés debe condensarse hasta un volumen de 30- 50µl, empleando centrifugación de 60 rpm y una temperatura de 65°C manteniendo la tapa del eppendorf abierta. Dar un pulso (5seg/ 10mil rpm; eppendorf Centrifuge 5415 D) y agregar 10µl de buffer de carga 1X. Se deben seguir las indicaciones para la preparación de un gel de agarosa necesario para corrimiento por electroforesis, pero para esta ocasión el gel que se

debe hacer para correr la muestra que lleva el DNA de interés es un gel de agarosa [1%] grueso con pozos de un calibre grueso, lo cual se logra con aproximadamente 50-60 ml del gel fundido, cargar los pocillos con la mezcla de la muestra de DNA y el buffer de carga 1X y programar la fuente de poder con las siguientes especificaciones; 110v, 500mA, 45min.

Seguir las indicaciones de tinción de geles de agarosa y visualización de los geles mediante transiluminador descritas en la técnica de electroforesis, recordando lavar el gel con agua destilada para quitar los excesos de bromuro de etidio. Para la visualización del gel de agarosa y las bandas que quedaron en este, es necesario el empleo de un transiluminador y el software BioCapt; será recomendable tomar una foto del gel inicial y posteriormente proceder a realizar el corte de la banda identificada como la banda correspondiente al tamaño del ADN de interés (hacerlo con luz UV encendida, con ayuda de un bisturí y con las protecciones adecuadas para exponerse a la luz UV). Una vez que se realizó el corte de la banda de interés es recomendable tomar otra foto del gel para compararla con la foto inicial y comprobar que efectivamente cortamos la zona con la banda del DNA de interés.

El corte de gel que se realizó se deberá colocar en un eppendorf que haya sido previamente pesado y rotulado; este eppendorf que ahora llevara el corte de gel se pesara nuevamente para ver la diferencia de peso, ya que según el peso se adicionara una solución de unión (por cada 10mg del peso del gel cortado, adicionar 10µl de solución de unión (kit Wisard SV Gel and PCR Clean- Up System). Con ayuda de un termoblot precalentado a 70°C- 75°C durante 5 min, se debe fundir el gel que lleva la solución de unión y posteriormente con ayuda de una centrifuga dar un pulso (10mil rpm/5 min; eppendorf Centrifuge 5415 D). Ahora se deberá ensamblar y rotular la columna según el kit Wisard SV Gel and PCR Clean- Up System, para que a continuación se vierta la mezcla del gel con la solución de unión fundidos y dejarla reposar 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar la mezcla dentro de la columna (10mil rpm/1 min; eppendorf Centrifuge 5415 D), guardando el filtrado de la solución de unión en un eppendorf debidamente rotulado.

A continuación se realizara una serie de lavados con solución de lavado de membranas del kit Wisard SV Gel and PCR Clean- Up System la cual deberá mezclarse previamente con etanol al 95% según instrucciones del kit; realizar un primer lavado con 700 µl de solución de lavado de membranas/etanol [95%], centrifugar (10mil rpm/1 min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y decantar filtrado; realizar un segundo lavado con 500 µl de solución de lavado de membranas/etanol [95%], centrifugar (10mil rpm/ 5 min; eppendorf Centrifuge 5415 D) y decantar filtrado; por ultimo realizar una centrifugación extra (10000 rpm/ 1 min) y desechar el filtrado.

Finalmente resuspender el DNA realizando dos lavados como se describen a continuación; 15µl de agua destilada estéril, dejar 1 min a temperatura ambiente y centrifugar (10mil rpm/1 min; eppendorf Centrifuge 5415 D). Para verificar que el DNA quedo purificado y que no tendremos ningún otro fragmento se deberá utilizar la técnica de electroforesis con gel de agarosa [0.8%], utilizando 5µl de la muestra mezclada con 3µl de buffer de carga 1X.

### **V.3.6 Preparación de células competentes JM101.**

Las células competentes *E. coli* JM101 son un buen modelo para realizar clonaciones de fragmentos de DNA de interés el cual se previamente puede ser ligado a un plásmido que se pueda ingresar a estas células mediante una técnica de electroporación o transformación de células. El procedimiento para preparar células competentes útiles para realizar la técnica de transformación debe realizarse bajo condiciones de esterilidad. Inicialmente se deben obtener colonias aisladas de *E. coli* JM101 crecidas en medio agar LB/amp<sup>100</sup>. Tomar una colonia aislada para inocular 3ml de medio liquido LB, incubar a 30°C/ 12- 18 horas en rotación. Posteriormente verter el tubo con la cepa JM101 ya crecida en un matraz con 250ml de medio liquido LB e incubar a 37°C/ 3-4 horas en agitación. A partir de las 3 horas 40 min de incubación medir D.O. <sup>600</sup> hasta alcanzar absorbancia 1.0- 1.1 (usar medio liquido LB como blanco de lectura).

Una vez que las células alcanzaron la D.O. <sup>600</sup> (1.0- 1.1 abs) colocar matraz en agua-hielo y agitar el matraz durante 2 min asegurándose que quede bien sumergido en el baño de agua-hielo. Una vez que las células están suficientemente frías, se procede a cosecharlas con ayuda de tubos falcón estériles y pre enfriados, bajo las siguientes condiciones; (5500 rpm/ 4°C/ 15 min; eppendorf centrifuge 5810 R) , y decantar el sobrenadante; colocar más caldo con células JM101 en el tubo y agitar con ayuda de vortex para nuevamente centrifugar el tubo con las condiciones antes señaladas, una vez más decantar y así sucesivamente hasta cosechar el total de las células obtenidas en el matraz.

Una vez obtenidas todas las células se deberán realizar lavados; en un primer lavado agregar 5-10 ml de agua destilada estéril previamente enfriada para disolver las células precipitadas, aforar a 45 ml con el agua destilada estéril fría, centrifugar (5500 rpm/ 4°C/ 10 min; eppendorf centrifuge 5810 R) y decantar sobrenadante; realizar un segundo lavado similar pero ahora aforar a 25 ml con agua destilada estéril fría y nuevamente centrifugar (5500 rpm/ 4°C/ 10 min; eppendorf centrifuge 5810 R) y desechar el sobrenadante; por último se realizara un tercer lavado pero ahora será con glicerol [10%] estéril frio, agregando 5 ml inicialmente para disolver las células precipitadas para posteriormente aforar a 45ml con el mismo glicerol, llevar a centrifugar (5500 rpm/ 4°C/ 15 min; eppendorf centrifuge 5810 R) y decantar sobrenadante.

Una vez realizados los lavados se agregara 3ml de glicerol [10%] frío a cada tubo falcón con células y se agitaran para tener una solución con células homogénea, para que a continuación se realicen alícuotas de células en eppendorf estériles (110 µl de células por cada eppendorf).

### **V.3.7 Prueba de electroporación de células competentes.**

Como control de calidad para verificar que las células que preparamos son suficientemente electrocompetentes se puede emplear la técnica de electroporación que se describe en el presente trabajo, utilizando un plásmido conocido que nos ayude a la transformación de las células obtenidas. Los valores que debemos obtener en la electroporación para las células competentes sin que se les haya agregado plásmido son;  $\geq 4$  ms y  $\geq 1.80$  para considerar que son células con buena electrocompetencia, por otro lado las células a las que se prueben añadiendo el plásmido deben tener valores menores a los obtenidos en la electroporación de las células a las que no se les añadió algún plásmido.

En cuanto al número de colonias obtenidas en las cajas con medios selectivos deben ser casi incontables para las células que fueron transformadas con el plásmido conocido, es decir deben ser demasiadas al grado de que parezca que formaron un tapete en la caja y por otro lado las células a las que no se les transformo con algún plásmido y que solamente se les dio el pulso de electroporación no deben mostrar crecimiento en el mismo medio selectivo donde se crecieron las que fueron transformadas.

### **V.3.8 Técnica de PCR**

La que se utilizó como templado a los oligos descritos en la tabla 9; 1 µl por cada oligo, 2 µl ADN de *P. aeruginosa PAO1* [50ng/ µl] como ADN molde, 2 µl MgSO<sub>4</sub>, *pfx*-DNA polimerasa, 1.5 µl dNTP, 1 µl buffer y se aforo con agua destilada estéril a 25 µl. Se sometió a un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, 35 ciclos conformados por; fase desnaturalización 5 min 95°C, fase de alineamiento de 1 min a 59°C y fase de elongación 4 min 68°C y un ciclo final de elongación de 5 min 68°C.

### V.3.9 Adenilación.

La adenilación es necesaria en caso de que los fragmentos que amplificamos y necesitamos clonar no se pueden unir a un plásmido que utilizaremos el cual tiene sitios de unión con Timina (T).

Se debe realizar una mezcla de reacción con las siguientes especificaciones; 5 µl de solución del fragmento deseado [100 ng/ µl], 1 µl Buffer 10X para Taq polimerasa, 0.2 µl dATP, 1 µl (5u) Taq polimerasa, 2.2 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril y 0.6 µl Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; la cual se colocara en baño de agua 70°C/ 30 min, posteriormente se pueden usar los microlitros necesarios para realizar una ligación del fragmento adenilado con el plásmido que emplearemos.

### V.3.10 Ligación de DNA.

Uno de los pasos cruciales en la realización de construcciones de DNA es la ligación, para lo cual se deberá verificar la concentración del vector según las indicaciones que vengan con este y la concentración del inserto mediante la siguiente formula:

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

\*inserto:vector = a relación molar (5:1)

Una vez obtenidas las concentraciones tanto del vector como del fragmento que ligaremos a este, se realizara una mezcla de reacción con los siguientes reactivos y las cantidades indicadas; 0.5 µl vector [50 ng/ µl], 5 µl Buffer de ligación T4 2X, microlitros necesarios de inserto [50 ng/ µl] calculados con la formula anterior, 1 µl T4 DNA ligasa, Agua destilada estéril c b p 10 µl; posteriormente Mezclar dando un pulso (10mil rpm/ 1 min; eppendorf centrifuge 5415 D) con ayuda de una centrifuga, dejar mezcla de reacción por 3 horas a temperatura ambiente o 2 días a 4°C, o dejar el tiempo necesario para ligación que indique el inserto del vector que utilicemos.

### **V.3.11 Transformación de células competentes por electroporación.**

Una necesidad dentro de la realización de construcciones de DNA es la de clonar fragmentos o replicar vectores necesarios para obtener dicha construcción. Será necesaria una alícuota de células competentes las cuales serán mezcladas con 2µl de la mezcla de ligación, esta mezcla se vacía en una celda para electroporación, cuidando que todo el proceso sea bajo condiciones de esterilidad. A continuación se dará un pulso eléctrico a la mezcla con la fuente de poder para electroporar; posteriormente se resuspenderán las células electroporadas en 1ml de medio líquido LB e incubar a 30°C en rotación. Una vez transcurrido el tiempo de 1 hora mínimo, se vaciara el cultivo completo en una caja con medio selectivo que permita la selección de las células transformantes; procurando esparcir el cultivo por toda la caja con ayuda de perlas de cristal hasta que la humedad del medio vertido se seque; llevar a incubación a 37°C/ 12 -15 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación hay que revisar si hay crecimiento de colonias; de las cuales es recomendable seleccionar de 1-10 colonias para sembrarlas en otra caja Petri con el mismo medio selectivo y además inocular tubos de ensayo con 3 ml de medio líquido LB con las mismas colonias seleccionadas las cuales se llevarán a incubación a 37°C y 30°C respectivamente por un tiempo de 12-18hrs. Posterior a este tiempo de incubación se revisó el crecimiento en el medio selectivo y a los inóculos crecidos en medio líquido se les realizó la extracción de plásmido por el método de lisis alcalina y electroforesis para verificar que las colonias seleccionadas son las transformantes requeridas. Guardar la caja de réplicas para que en base al resultado del aislamiento de plásmido, indiquemos cual o cuales de las colonias sembradas son las transformantes que deseamos para experimentos posteriores.

### **V.3.12 Restricciones totales y parciales.**

Para realizar construcciones de DNA es necesario realizar cortes de este, para poder integrar fragmentos, secuencias de marcadores de selección o cortar fragmentos requeridos de algún plásmido en el que haya estado integrado. Para llevar a cabo los cortes de DNA parciales es necesario realizar una mezcla de reacción la cual se obtendrá con los siguientes reactivos y las cantidades indicadas; volumen total de plásmido aislado, 15 µl Buffer tango 10X, 0.5 µl enzima (elegida), agua destilada estéril cbp 150 µl.

A continuación homogenizar la mezcla dando un pulso (10mil rpm; eppendorf centrifuge 5415 D) con ayuda de una centrifuga e incubar la mezcla (37°C / 2 horas), probar las muestras mediante electroforesis con gel de agarosa [0.8%] con las siguientes especificaciones de corrimiento (130 V/ 500 mA/ 30 min); si en ese tiempo la reacción de

restricción aun no da el fragmento deseado será necesario repetir la incubación por algún par de horas más y volver a probar la muestra en electroforesis con las mismas especificaciones y así sucesivamente hasta obtener los fragmentos que se desean. Si la restricción no está lista o en su defecto se logró la restricción pero se desea seguir trabajando otro día, la muestra se puede guardada en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior, procurando que si la reacción esta lista debemos inactivar la enzima mediante calor ( $75^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$ ) para evitar que la enzima siga trabajando y no perder el fragmento que necesitamos.

Para realizar restricciones totales es necesario realizar la siguiente mezcla de reacción; 15  $\mu\text{l}$  de plásmido aislado, 5  $\mu\text{l}$  Buffer tango 10X, 0.5  $\mu\text{l}$  Enzima (elegida),  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril cbp 50  $\mu\text{l}$ . A continuación homogenizar la muestra con ayuda de una centrifuga dando un pulso (10mil rpm; eppendorf centrifuge 5415 D); posteriormente incubar la mezcla de reacción ( $37^{\circ}\text{C} / 2 -6$  horas). De igual manera para probar que cortamos el o los fragmentos necesarios de la construcción es necesario probar las muestras mediante electroforesis con gel de agarosa [0.8%] bajo las siguientes indicaciones (130 V/ 500 mA/ 30 min). Recordar que se debe inactivar la enzima mediante calor ( $75^{\circ}\text{C}/10\text{min}$ ); si se requiere seguir trabajando en otro momento será necesario guardar la mezcla de reacción en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **V.3.13 Conjugación tripartita.**

Una de las técnicas de mutación es mediante recombinación de DNA, para poder llevar a cabo la recombinación de DNA se puede utilizar la técnica de conjugación tripartita, la cual consiste la interacción entre tres tipos de bacterias, una donadora que llevara el DNA que queremos integrar al genoma de otra bacteria mediante recombinación; una cepa auxiliar, la cual ayudara a la donadora a formar un pili sexual para que por medio de este pueda movilizar el material genético (generalmente un plásmido suicida que lleva una construcción) requerido para integrarse al genoma de la cepa receptora mediante recombinación para dar origen a nuevas mutantes.

Inicialmente se deberán inocular tres tubos de ensayo con 3 ml de medio liquido LB con las cepas donadora (en este proyecto se usó S17-1); otro con la cepa auxiliar (PKRS2013) y otro con la cepa receptora (en el presente trabajo las cepas receptoras fueron mutantes simples de *P. aeruginosa* para obtener mutantes dobles); llevar a incubación ( $30^{\circ}\text{C}/12-18$  horas/ en rotación).

Transcurrido el tiempo de incubación se realizara una mezcla de conjugación con las tres cepas empleadas en proporciones [1:1:3]; 500 µl S17-1 +500 µl PKRS2013 las cuales se deberán centrifugar (10mil rpm/1 min; eppendorf centrifuge 5415 D) y decantar sobrenadante; adicionar 1500 µl cepa mutante simple PAO1, homogenizar con ayuda de un vortex y centrifugar nuevamente (10mil rpm/1 min; eppendorf centrifuge 5415 D), posteriormente decantar sobrenadante y agregar 1 ml de medio liquido LB; homogenizar nuevamente con ayuda de un vortex. Esta mezcla se deberá espátular en una caja con agar LB, esperar un poco para que la mezcla se seque un poco para después incubar a 37°C/ 15-18 horas, procurando incubar las cajas Petri boca arriba para evitar derrames.

Al día siguiente tendremos un crecimiento de un tapete en toda la placa el cual se deberá cosechar en un eppendorf con ayuda de un haza de Henle y bajo esterilidad. Las células cosechadas deberán ser resuspendidas con 1 ml de medio líquido LB. A continuación se realizaran diluciones con medio liquido LB, desde 1:10 hasta 1:10<sup>4</sup>; de las diluciones obtenidas se espatularan 100µl de cada dilución, con ayuda de perlas de cristal en cajas con marcadores de selección; en el presente trabajo se utilizó medio agar LB//Gm<sup>30</sup>/TC<sup>60</sup> ya que la construcción ingresada lleva un marcador de selección de Gentamicina (Gm) y las mutantes simples a las que se ingresara la construcción son resistentes a Tetraciclina (Tc).

Una vez que se secaron las cajas se llevaran a incubar a 37°C/ 12-18 horas pero esta vez boca abajo. Al día siguiente se revisara si crecieron colonias, de las cuales se seleccionaran las necesarias para resembrarlas, procurando guardarlas en glicerol 50%, para realizar experimentos posteriores.

#### **V.3.14 Prueba de antagonismo bacteriano.**

Se ha reportado que algunos ciclodipéptidos tienen actividad tipo antibiótico, y para comprobar si una cepa los produce, es recomendable este tipo de prueba en la que se hace una confrontación de la cepa en estudio contra otra cepa (generalmente una cepa sensible). En el trabajo de maestría de Martínez Carranza, 2014; se realizó un ensayo en el que se confrontaron diversas cepas; se confrontaron todas contra todas para identificar cuáles eran productoras de ciclodipéptidos y cuales eran sensibles a los ciclodipéptidos, por lo que se tomaron como referencia dos cepas de ese trabajo; una sensible a los ciclodipéptidos CP14 (indicadora) y una no productora de ciclodipéptidos 1 A9 (control negativo), las cuales serán usadas para las pruebas de antagonismo bacteriano del presente proyecto.

### **V.3.14.1 Spot on lawn/picadura.**

Inicialmente se debe inocular las cepas requeridas para probar su antagonismo así como con las cepas control procurando obtener colonias aisladas siguiendo las siguientes instrucciones:

- Mutantes dobles (LB/Gm<sup>30</sup>/Tc<sup>60</sup> con perlas de cristal).
- Mutantes simples (LB/ Tc<sup>60</sup> con perlas de cristal).
- PAO1 (control positivo) (LB/ Sm<sup>200</sup> con perlas de cristal).
- 1 A9 (control negativo) (LB con perlas de cristal).
- CP14 (cepa sensible) (LB mediante estría cerrada).
- Incubar (37° C/ 12-18 horas) en rotación.
- CP14 en medio liquido LB (30°C/2-3 horas) en rotación y medir D.O.<sup>600</sup> hasta obtener una absorbancia de 0.4-07, (hacerlo el día del montaje).

Una vez que se tienen todas las colonias necesarias, colocar 1 µl de la cepa CP14 en caja con medio agar LB y esparcir con ayuda de un hisopo estéril mediante estría cerrada procurando pasar el hisopo por toda superficie del medio. Cuando el estriado este seco; colocar sobre este tapete las colonias a las que se revisaran para producción de ciclodipéptidos, incluyendo los controles de producción y no producción de ciclodipéptidos, con ayuda de palillos estériles. Cuando se hayan terminado de colocar todas las colonias llevar a incubar a 37°C/ 20- 24 horas.

Al día siguiente verificar el crecimiento de las colonias y la presencia o ausencia de halos de inhibición de la cepa CP14 con la que se hizo el tapete. Por ultimo medir halos de inhibición para hacer el análisis comparativo entre los controles y las cepas problema. Las cepas seleccionadas deben guardarse en glicerol [50%] a ultracongelación (-80°C) para su uso posterior.

### **V.3.14.2 Spot on lawn/gota.**

Para este tipo de confrontación todas las cepas deberán crecerse en medio liquido LB (30°/ 12-16 Horas/ rotación). Todas las cepas deberán diluirse bajo condiciones de esterilidad colocando; 500µl de cultivo y 1 ml de medio liquido LB para que posteriormente se mida la D.O.<sup>600</sup> hasta obtener una absorbancia de 0.4 - 06, con el propósito de tener hipotéticamente el mismo número de células de cada cepa con las que se montara el ensayo de confrontación.

Realizado lo anterior se procederá al montaje; colocando 1µl de la cepa CP14 en una caja con medio agar LB, realizando una estría cerrada con ayuda de un hisopo estéril; una vez que el tapete este seco, se colocan 10µl de cada una de las cepas control y las cepas problema, con el cuidado de que las gotas tengan la forma más parecida a un círculo; será necesario secar las cepas colocadas manteniendo la caja abierta dentro de la campana de flujo laminar. Una vez que las cepas estén secas, se colocaran a incubar a 37°C/ 18-24 horas.

Al día siguiente se revisara la presencia o ausencia de halos de inhibición, y se procederá a medir para realizar el estudio comparativo contra las cepas control y de esta forma elegir las colonias deseadas. Las cepas seleccionadas deben guardarse en glicerol [50%] a ultracongelación (-80°C) para su uso posterior.

### **V.3.15 Extracción de ciclodipéptidos.**

La extracción de ciclodipéptidos es una extracción de naturaleza orgánica con el solvente acetato de etilo, muy útil para el análisis de la presencia de estos metabolitos secundarios mediante la técnica de HPLC.

Inicialmente se debe inocular un tubo de ensayo con 3 ml de medio líquido LB con una colonia aislada de la cepa de interés el cual se debe incubar a 30°C /12-18 horas en rotación. Cuando la cepa ha crecido se toman 500 µl para inocular un matraz con 50 ml de medio líquido LB, el cual se pondrá a incubar a 30°C / 48 horas en agitación. Concluido el tiempo de incubación se deberá medir la D.O.<sup>600</sup> la cual deberá estar entre 1.5 y 2.0 de absorbancia. Con ayuda de tubos falcón se procederá a centrifugar la muestra (8mil rpm/ 10 min/ 4°C; eppendorf centrifuge 5810 R); se recupera el sobrenadante y se desecha el precipitado.

Del sobrenadante recuperado se tomaran 10 ml para realizar la extracción de los ciclodipéptidos (fase orgánica), para lo cual se necesita hacer una mezcla [1:2] con acetato de etilo acidificado con ácido acético [0.01%], la mezcla debe colocarse en un recipiente libre de sales y estéril, en el que la mezcla se agitará vigorosamente con las manos durante 2 minutos y se dejara reposar la mezcla por otros dos minutos; este proceso de agitación y reposo se repetirá 3 veces y posterior a este procedimiento se llevara a centrifugar (8mil rpm/ 5 min/ 4°C; eppendorf centrifuge 5810 R) para poder separar las fases acuosa, intermedia y orgánica. Con ayuda de una pipeta se recuperara la fase superior (orgánica) en otro tubo falcón libre de sales y estéril. A continuación se procede con la segunda etapa de la extracción, la cual consiste en la volatilización del acetato de etilo; con ayuda de un baño de agua calentado a 60°C se sumergirá el tubo abierto con la fase orgánica y se agitará

lentamente para lograr evaporar el acetato de etilo, concentrando la muestra hasta un volumen de 3 ml, realizar un lavado con 2 ml de acetato de etilo acidificado y agitar el tubo falcón para recuperar los compuestos que hayan podido quedar adheridos en las paredes, una vez más someter la muestra al calor del baño de agua para evaporar el exceso de acetato de etilo y concentrar la muestra hasta un volumen final de 700 µl, se recomienda guardar las muestras a 4°C para su uso posterior. Si las muestras se usaran en experimentos posteriores, se recomienda desecar la muestra y disolver en DMSO.

### **V.3.16 Análisis de HPLC.**

Los extractos que se analizaron en el equipo de HPLC deben concentrarse hasta sequedad con una temperatura de 60°C en rotación. El extracto seco se re suspendió en 1 ml de acetonitrilo y se disolvió con agitación. Se realiza una dilución 1:10 en acetonitrilo y se inyecta en el HPLC. La fase móvil del HPLC fue agua desionizada filtrada y desgasificada, acidificada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0.05%. . Antes ingresar el extracto al HPLC se deberá realizar un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O:acetonitrilo a un flujo constante de 0.5 mL/min. En el presente experimento se utilizó la columna para cromatografía en fase inversa Agilent Polaris C18-A a 50°C, El volumen de muestra inyectada fue de 5µL. Se utilizó la absorbancia de 210 nm en el intervalo del ultravioleta y elución en gradiente con el detector ELITE LaChrom HITACHI UV-VIS L2420.

### **V.3.17 Cultivo de línea celular HeLa.**

El ensayo de viabilidad celular funciona para verificar la toxicidad de alguna sustancia, en el presente estudio se empleó debido a que los metabolitos secundarios de nuestro interés; los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* están descritos como citotóxicos. En este ensayo se emplearon células cancerosas de la línea celular HeLa, las cuales fueron tratadas previamente para tener un total de 20000 células por pozo en placas de 96 pozos. Una vez que las células alcanzan el número necesario para el ensayo, la confluencia adecuada, estas se sincronizan en la misma etapa del ciclo celular, cambiando el medio a medio completo (desprovisto de suero), se procede a colocar los tratamientos con las sustancias que probaremos (en el presente estudio se realizó con el sobrenadante obtenido de las distintas mutantes dobles crecidas por un periodo de 40 horas/30°C en rotación); los tratamientos se colocan 100 µl por pozo por triplicado, posteriormente las placas se llevan a incubación a 37°C / 12 horas en una incubadora con 5.0% de CO<sub>2</sub>. Una vez concluido el periodo de incubación se procede a revisar las células con ayuda de un microscopio invertido para analizar la morfología de las células pos tratamiento y con ayuda del software (Gen5) se obtienen las fotos deseadas.

### **V.3.17.1 Viabilidad celular de cultivos de células HeLa (MTT)**

La segunda parte del ensayo de viabilidad celular es el ensayo colorimétrico MTT. Como control positivo se utilizó la mezcla de CDPs de PAO1 (0.1 µg/mL), como control negativo se utilizó el medio líquido LB, debido a que las mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 fueron crecidas en ese medio. Se utilizó MTT [5mg/µl] (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide); (Sigma) disuelto en PBS, agregando 10 µl a cada pozo de la placa de cultivo celular, la cual se incubó a 37°/ 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se resuspendieron los cristales de formazan con 100µl de isopropanol/HCl 1M [19:1], se dejó transcurrir un tiempo de 30 min y se procedió a realizar la lectura a 595nm con ayuda de un espectrofotómetro para microplacas Biotek Epoch mezclando durante 60 segundo en cada lectura y con ayuda del software Gen5.

### **V.3.18 Obtención de mutantes dobles.**

La amplificación de los fragmentos internos de cada gen seleccionado se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando como plantillas los oligos diseñados (Tabla 9) que flanquean fragmentos internos de 1.1 a 1.2 Kb de cada gen. En total se realizó la amplificación de fragmentos internos de cuatro genes; *pchF*, *pvdJ*, *pvdL* y *pvdI*, los cuales miden 1.1 Kb cada uno. Mediante una serie de restricciones y ligaciones de DNA así como clonaciones y subclonaciones en pGEM-T Easy y pKOK4 respectivamente; se llevaron a cabo las construcciones deseadas para la obtención de mutantes por recombinación las cuales fueron necesarias para que mediante la técnica de conjugación tripartita se obtuvieran mutantes dobles en genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1.

### **V.3.19 Clonación de fragmentos de DNA en pGEM-T Easy**

Teniendo una construcción de ADN circular se llevó a cabo la transformación de células competentes *E. coli* JM109, mediante la técnica de electroporación (ver técnica en el punto **VII.3.10** del presente documento). Con las células electroporadas se inoculó 3ml de medio líquido Luria Bertani (LB) y se incubaron a 30°C/ 1 hora/ rotación, para posteriormente inocular con un volumen de 1 ml de estas células electroporadas, una placa de agar Luria Bertani /Amp<sup>100</sup>/Xgal<sup>30</sup>/Iptg<sup>20</sup>; la cual se incubó a 37°C por 18 horas. Una vez que se obtuvieron colonias, se picaron un total de 5 colonias al azar; cada una con un palillo estéril y se inocularon 3 ml de medio líquido LB por separado, los cuales se incubaron a 30°C/ 18 horas/ rotación. Posterior al tiempo de inoculación se llevó a cabo el aislamiento de plásmido, mediante la técnica de aislamiento de plásmido por método de lisis alcalina (ver técnica en el punto **VII.3.2** del presente documento) y finalmente se verificó mediante electroforesis; cuál de los extractos es el plásmido que tiene el tamaño de la construcción requerida.

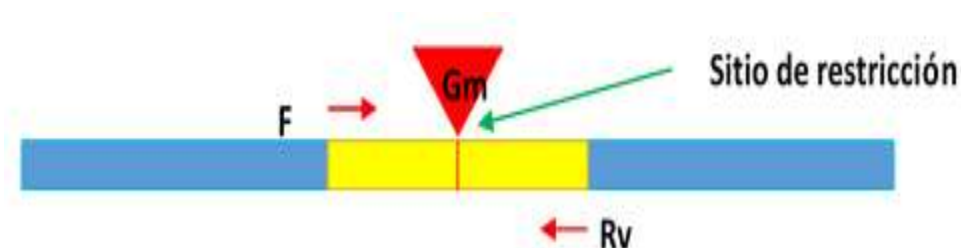
## VI. RESULTADOS

### VI.1 Construcciones para obtener la mutante por recombinación de *P. aeruginosa* PAO1.

La obtención de mutantes dobles en genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1, se realizó mediante la interrupción de genes con cassette  $Gm^R$  mediante la técnica de conjugación tripartita donde por recombinación, se llevó a cabo la segunda mutación en mutantes simples de *P. aeruginosa* PAO1 las cuales tenían un gen NRPS mutado por trasposición. A continuación se muestran los resultados en cada uno de los pasos que se llevaron a cabo para la obtención de las mutantes dobles.

### Diseño de oligonucleótidos para amplificación fragmentos internos de los genes seleccionados.

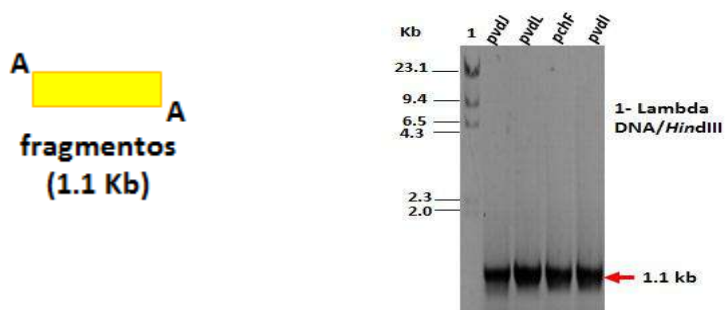
Se diseñó un par de oligos que flanquearan un fragmento interno de entre 1.1 y 1.2 Kb para cada uno de los nueve genes seleccionados (Tabla 9). Cada oligo está constituido por veintisiete bases constituyendo un total de nueve tripletes; los cuales están ordenados en un sentido de 5' a 3'. Adicional dentro del diseño de los oligos se revisó que el fragmento que amplificaran tuviera un sitio de restricción enzimática, que permitiera hacer un corte donde posteriormente se integrara un cassette de resistencia a Gentamicina que interrumpiera la secuencia del gen y por lo tanto su función (Figura 18), además de que el cassette serviría para la selección de las transformantes deseadas.



**Figura 2.** Diseño de oligos y ubicación del fragmento interno elegido para amplificar en cada gen NRPS, con su sitio de restricción interno.

## Amplificación del fragmento interno.

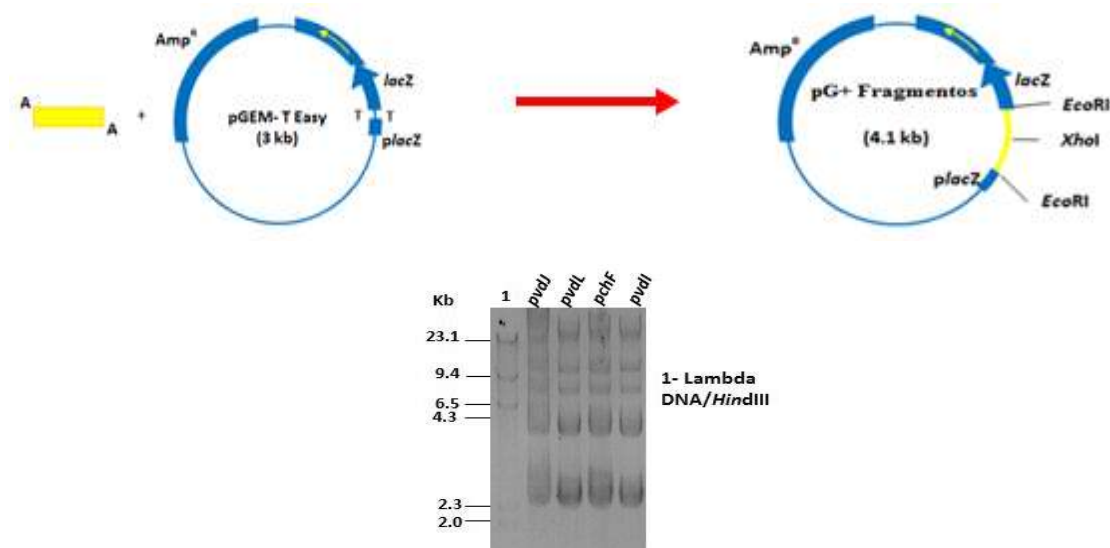
Inicialmente se realizó la amplificación de los fragmentos internos de 1.1 Kb de los genes mediante la técnica de PCR. Para la corroboración de que el fragmento estaba amplificado, se realizó el corrimiento de 5 µl de la mezcla de PCR en un gel de agarosa al 0.8 %, sumergido en TAE 1X en una cámara de electroforesis programada para correr a 500mA por 30 min (Figura 19).



**Figura 3.** Amplificación de fragmentos internos de 1.1 Kb de los genes *pvdJ*, *pvdL*, *pchF* y *pvdI* mediante técnica de PCR.

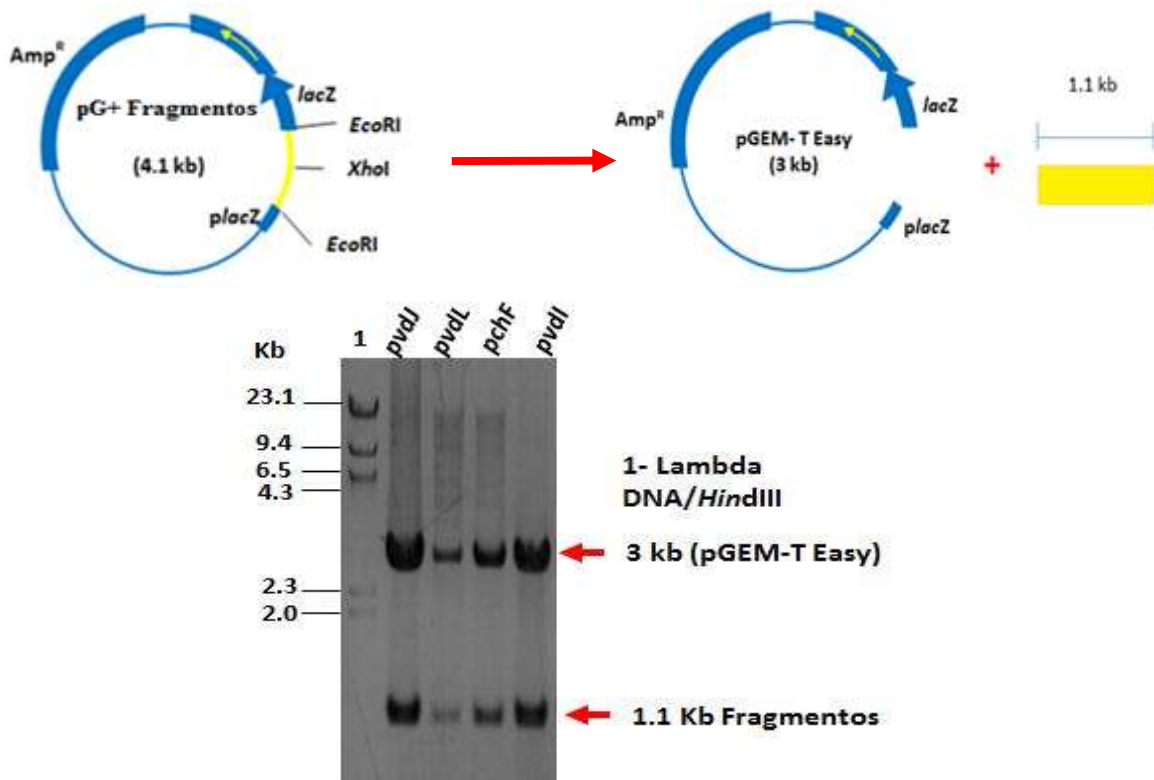
## Clonación del fragmento interno de 1.1 Kb del gen *pvdL* en pGEM-T Easy.

Cuando se logró amplificar el fragmento de 1.1 Kb de cada uno de los genes, se llevó a cabo una adenilación del fragmento (ver técnica en el punto VII.3.8 del presente documento), para realizar posteriormente una ligación a pGEM-T Easy (3 Kb), obteniendo así un construcción de DNA circular de 4.1 Kb. (Figura 20).



**Figura 4.** Clonación de los fragmentos amplificados de 1.1 Kb en pGEM-T Easy, (carriles 2-4), Lambda DNA/HindIII (Carril 1). Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

En una segunda corroboración de que elegimos la clona con el plásmido correcto, se realiza una restricción con la enzima *EcoRI* ya que pGEM-T Easy tiene sitios de corte para esta enzima en los extremos del sitio de unión para el fragmento ligado. De tal forma que en el corrimiento electroforético obtendremos las bandas correspondientes de 3 Kb para pGEM-T Easy y 1.1 Kb para los diferentes fragmentos que habíamos ligado a este plásmido (Figura 21).

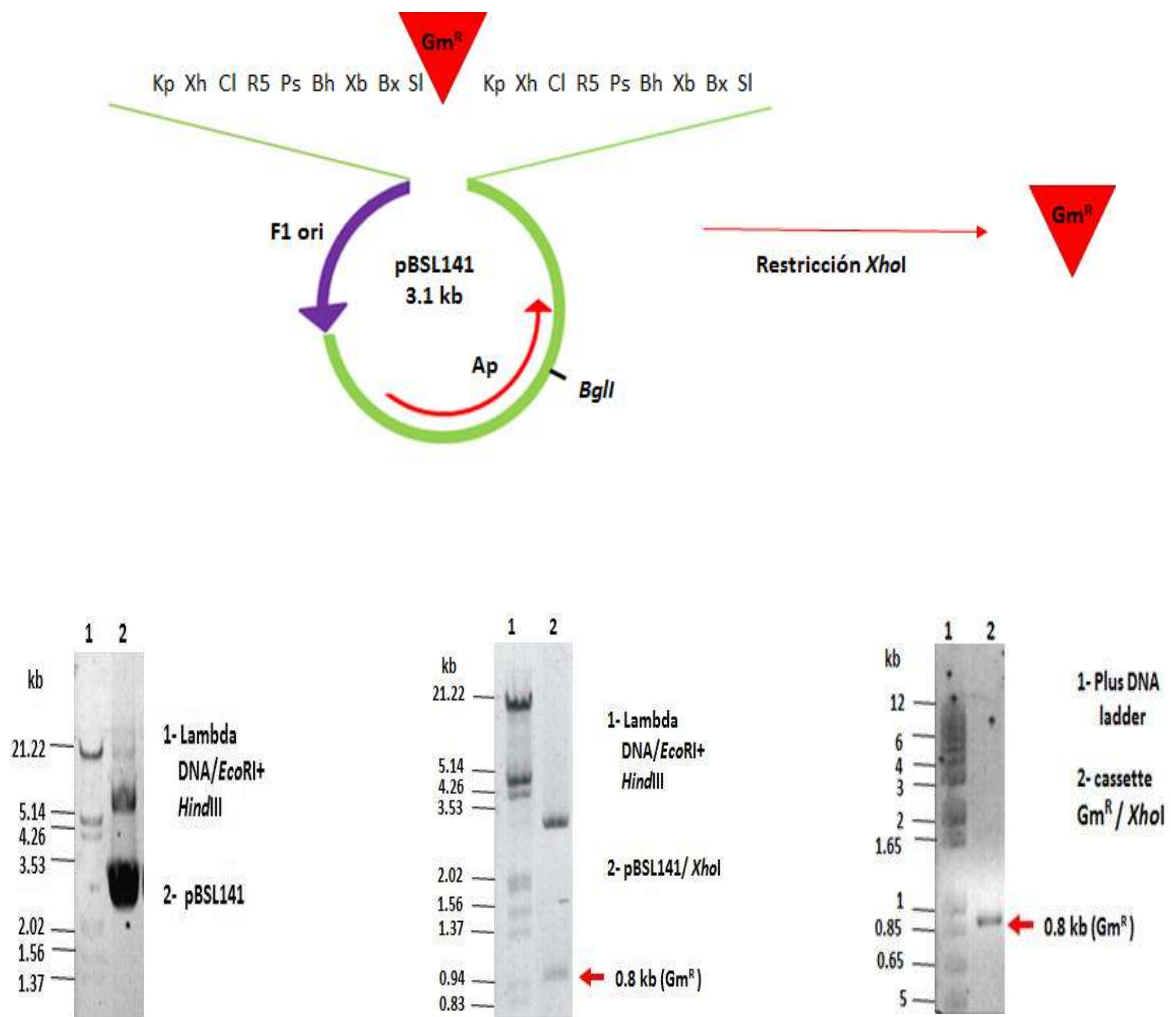


**Figura 5.** Corroboración de la integración de los fragmentos de 1.1 Kb al plásmido pGEM-T Easy mediante restricción total con enzima *EcoRI*. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

### Obtención del cassette Gm<sup>R</sup>.

El cassette Gm<sup>R</sup> es necesario para llevar a cabo la interrupción de los fragmentos amplificados de los genes NRPS seleccionados. Este cassette se obtuvo del plásmido pBSL141 aislado de una cepa de *E. coli* mediante restricciones con las diferentes enzimas marcadas para el sitio de restricción del fragmento interno de cada gen (Tabla 9). Es decir se realizaron restricciones por separado con las enzimas *Sall*, *XhoI* y *BamHI* con el fin de que el cassette tuviera el mismo tipo de corte que los fragmentos de los diferentes genes.

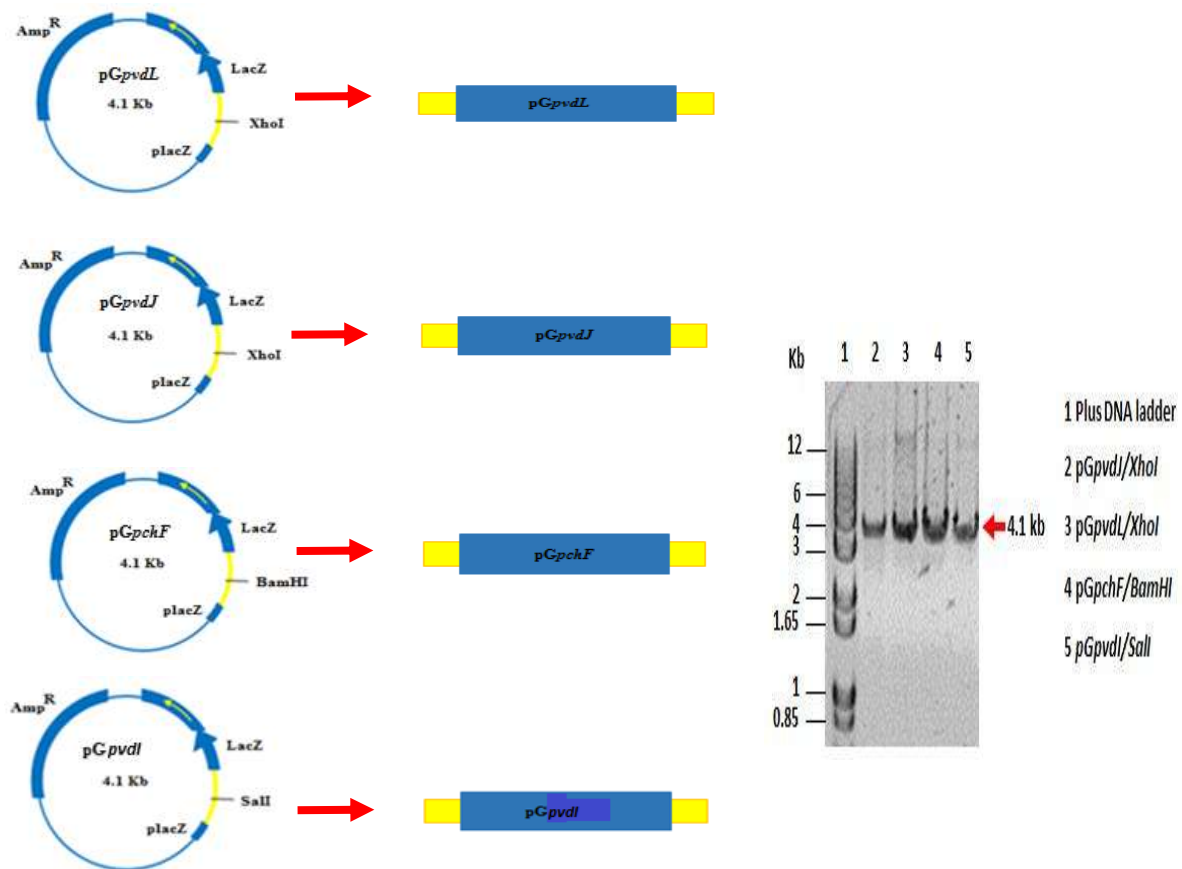
Se inocularon 3 ml de medio líquido LB con una colonia aislada crecida previamente en agar LB / Gm<sup>100</sup>, los cuales fueron incubados a 30°C/ 18 horas/ rotación. El aislamiento del plásmido se realizó mediante la técnica de lisis alcalina (ver técnica en el punto VII.3.2 del presente documento). Se realizaron restricciones totales con las diferentes enzimas (ver tecnica en el punto VII.3.11 del presente documento). Y finalmente se corroboró la obtención del fragmento correspondiente al casset Gm<sup>R</sup> (0.8 Kb) mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% (Figura 22).



**Figura 6.** Obtención de Gm<sup>R</sup> (0.8Kb) del plásmido pBSL141 mediante restricciones totales con las enzimas *XhoI*, *SalI* y *BamHI*. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

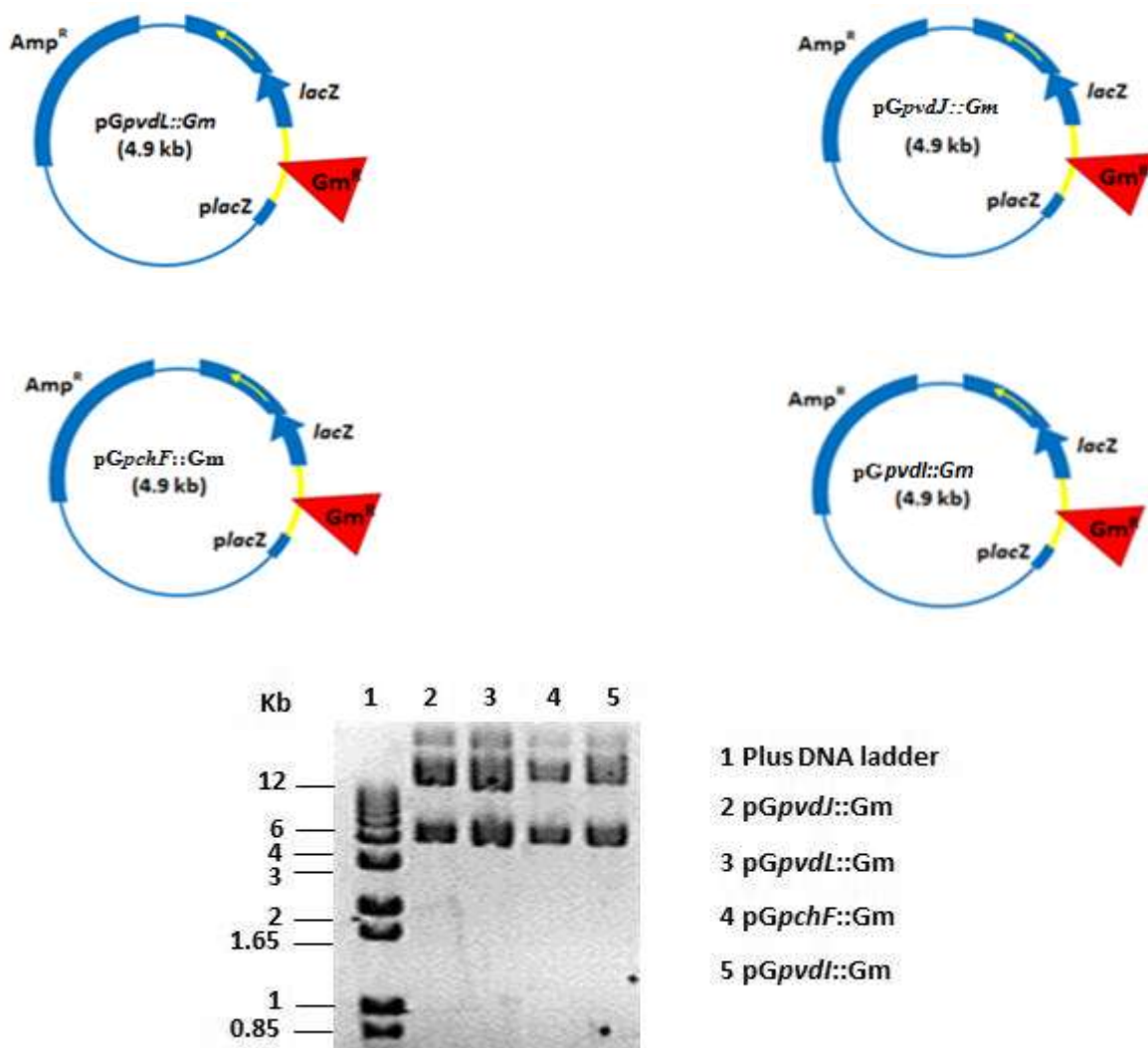
## Interrupción de los fragmentos con el cassette de resistencia a Gm<sup>R</sup>.

Siguiendo con el procedimiento para la interrupción con Gm<sup>R</sup> de los fragmentos de los genes NRPS *pvdJ*, *pvdL*, *pchF* y *pvdI* de *P. aeruginosa* PAO1 y obtener las mutaciones por recombinación; se realizó la restricción total (ver técnica en el punto VII.3.11 del presente documento) de la construcción pGEM-T Easy mas los fragmentos con la enzima de restricción indicada en la tabla 9. Para verificar que la enzima de restricción no había cortado en otros sitios de la construcción; se llevó a cabo la verificación del tamaño del fragmento corriendo 3 µl de la reacción de restricción, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 23).



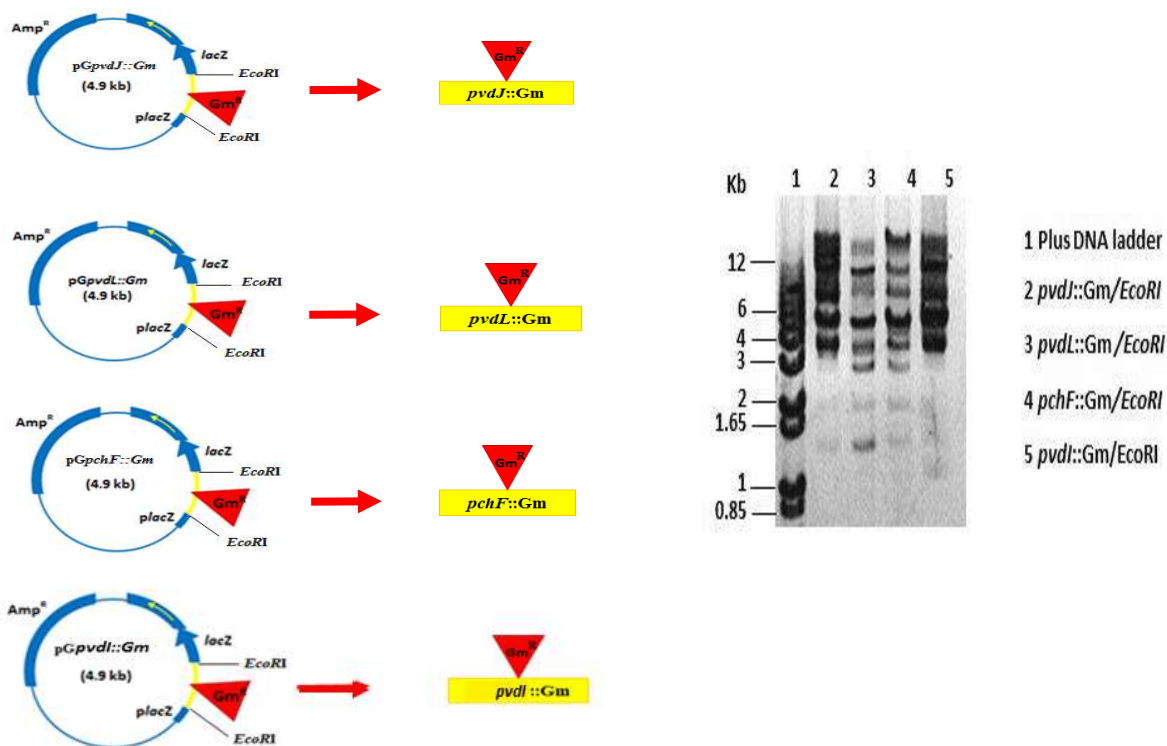
**Figura 7.** Linealización de las construcciones pGEM-T Easy – *pvdJ*, pGEM-T Easy – *pvdL*, pGEM-T Easy – *pchF*, pGEM-T Easy – *pvdI*; mediante cortes de ADN con enzimas de restricción. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

Posteriormente se realizó la ligación de Gm<sup>R</sup> con la construcción pGEM-T Easy + *pvdJ*, pGEM-T Easy+ *pvdL*, pGEM-T Easy+ *pchF* y pGEM-T Easy+ *pvdI*; mediante una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (ver técnica en el punto **VII.3.9** del presente documento). Para verificar si las ligaciones con Gm<sup>R</sup> se habían logrado, se llevó a cabo la transformación de células competentes *E. coli* JM109; mediante electroporación (ver técnica en el punto **VII.3.10** del presente documento). Se seleccionaron colonias mediante en medio agar LB /Amp<sup>100</sup>/Gm<sup>30</sup>, las cuales se incubaron a 30°C/ 18 horas/ rotación, y finalmente se les realizo el aislamiento de plasmido mediante la tecnica de lisis alcalina (ver técnica en el punto **VII.3.2** del presente documento). Y finalmente se reviso la obtencion del plasmido corriendo 5 µl con la construccion deseada (4.9 Kb) mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 24).

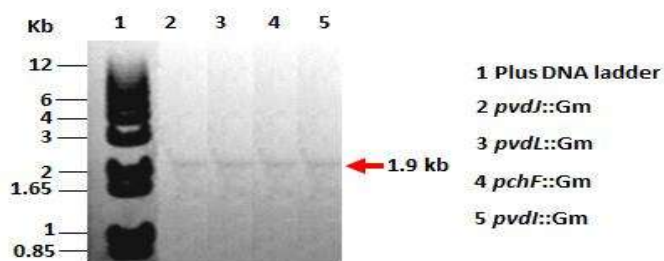


**Figura 8.** Ligación de Gm<sup>R</sup> con la construcción pGEM-T Easy – fragmentos NRPS. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

Una vez que el fragmento de los genes NRPS ya se encontraba interrumpido por  $Gm^R$  ( $pvdJ::Gm^R$ ,  $pvdL::Gm^R$ ,  $pchF::Gm^R$  y  $pvdI::Gm^R$ ) se procedió a realizar una restricción parcial con *EcoRI* para la separación de los fragmentos interrumpidos (1.9 Kb) del actual plásmido pGEM-T Easy (3 Kb) donde se realizó la construcción (Figura 25). Una vez lograda la restricción de los fragmentos interrumpidos; se realizó su purificación (ver técnica en el punto VII.3.5 del presente documento), para el uso posterior de estas construcciones (Figura 25). Para verificar la correcta purificación del fragmento, se corrieron 3  $\mu$ l del fragmento purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 26).



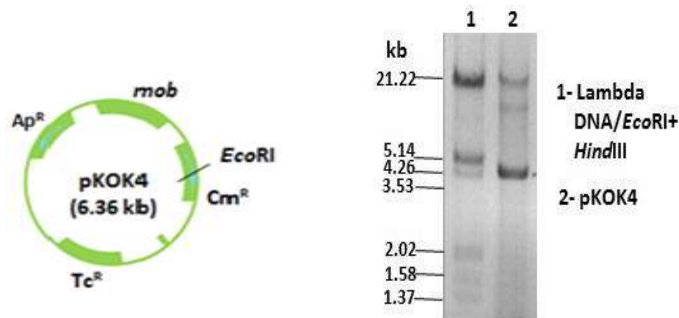
**Figura 9.** Restricciones parciales para separación de fragmentos de genes NRPS interrumpidos con  $Gm$  de pGEM-T Easy. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%



**Figura 10.** Purificación de los fragmentos interrumpidos de los genes NRPS interrumpidos con  $Gm^R$ . Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

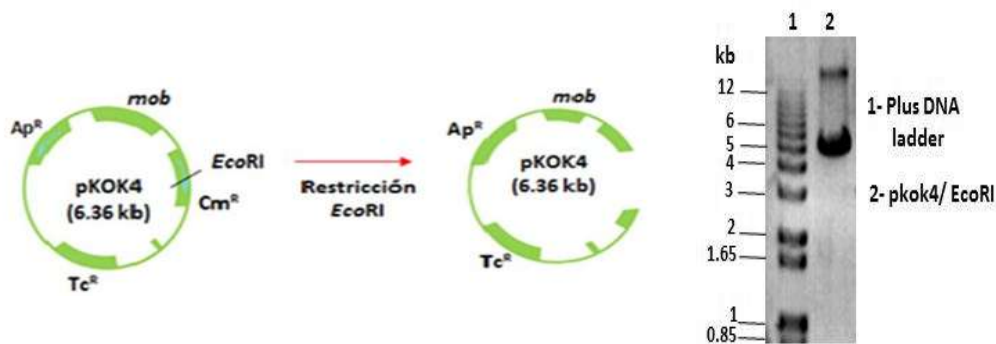
## Subclonación de Fragmentos interrumpidos en pKOK4

Para obtener las mutantes dobles fue necesario realizar una subclonación de los fragmentos interrumpidos (*pchF*::Gm<sup>R</sup>, *pvdJ*::Gm<sup>R</sup>, *pvdL*::Gm<sup>R</sup> y *pvdI*::Gm<sup>R</sup>) en un plásmido suicida; pKOK4 es un plásmido de 6.36 Kb que posee un gen *mob* que es necesario para poder transferir la información genética mediante un pili según la técnica de conjugación tripartita (ver técnica en el punto VII.3.13 del presente documento); adicionalmente este plásmido tiene genes de resistencia a Tetraciclina (Tc), Ampicilina (Ap) y Cm y dentro de este último un sitio de corte *EcoRI*. Inicialmente pKOK4 tuvo que aislarse mediante la técnica de lisis alcalina (ver técnica en el punto VII.3.2 del presente documento) y se verifico el correcto aislamiento del plásmido, corriendo 5 µl mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 27).



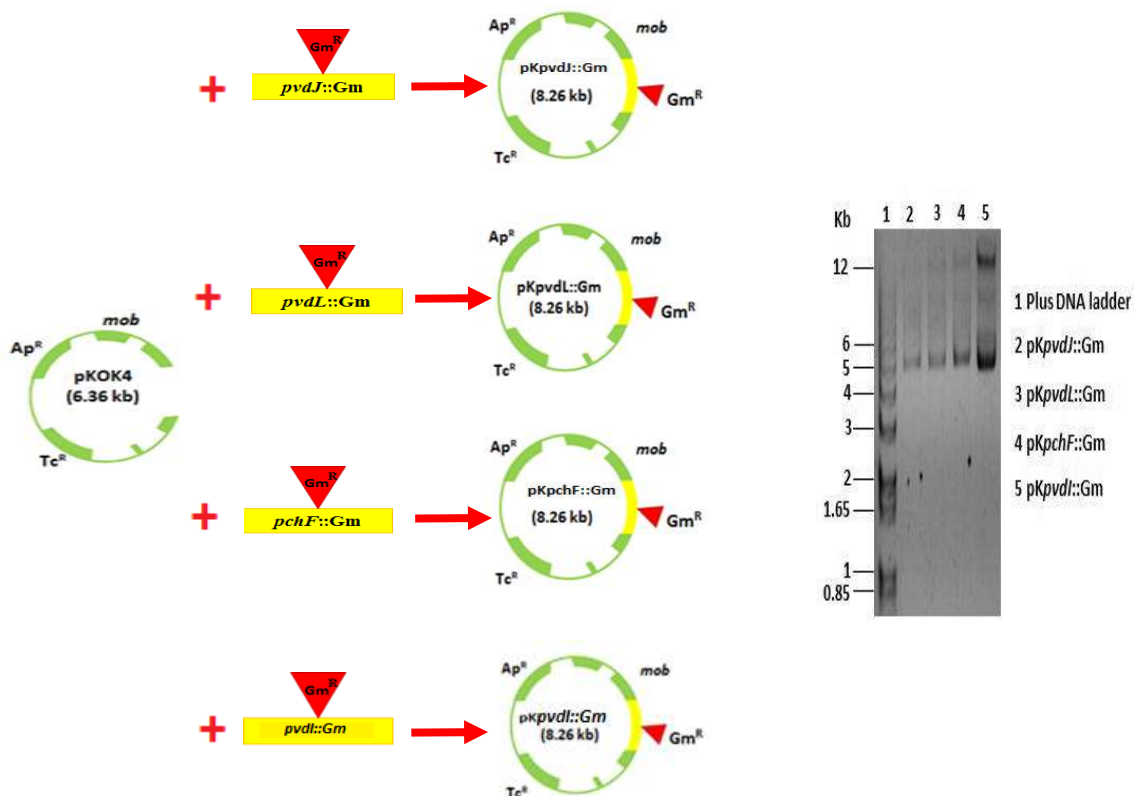
**Figura 11.** Obtención del plásmido pKOK4. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

Para poder ligar cada uno de los fragmentos interrumpidos a pKOK4 por separado es necesario que tanto el fragmento interrumpido como el plásmido tengan el mismo tipo de corte, en este caso como los fragmentos interrumpidos <sup>anteriormente</sup> habían sido separados de pGEM-T Easy mediante una restricción parcial con *EcoRI*; además fue necesario realizar una restricción total (ver técnica en el punto VII.3.11 del presente documento) de pKOK4 con la misma enzima *EcoRI*. La restricción se verifico corriendo 3 µl mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 28).



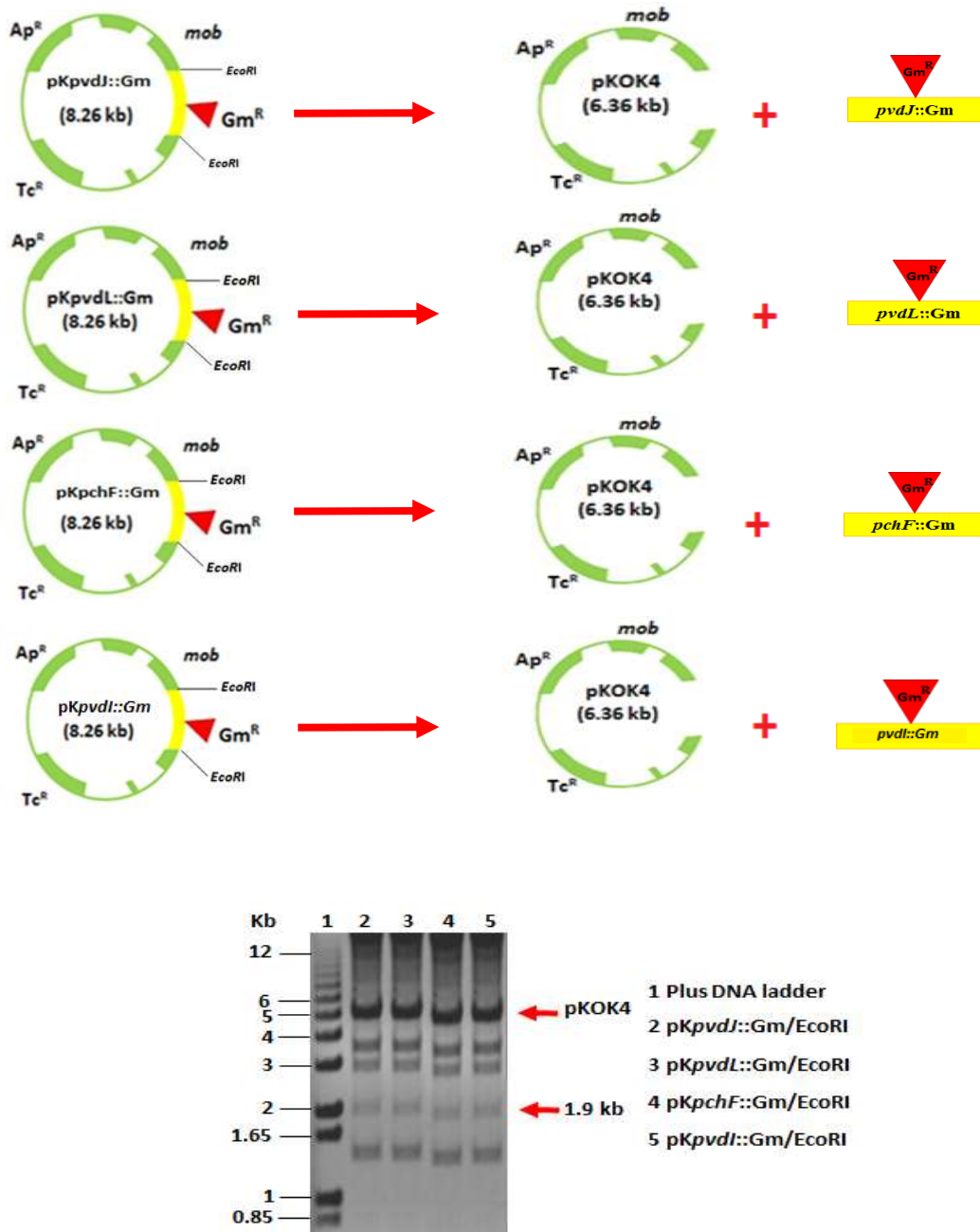
**Figura 12.** Linealización de pKOK4 (6.36 Kb) con *EcoRI*. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

Con pKOK4 y los fragmentos interrumpidos con  $Gm^R$  cortados con *EcoRI*, se procedió a realizar la ligación de estos; empleando la enzima T4 DNA ligasa (ver técnica en el punto VII.3.9 del presente documento). Una vez hecha la reacción de ligación, se electroporaron nuevamente células competentes *E. coli* JM109 colocando 2  $\mu$ l de la mezcla de ligación (ver técnica en el punto del presente documento), y pasado el tiempo de incubación descrito en la técnica, se tomó 1 ml de las células electroporadas e incubadas para plaquearlas con ayuda de perlas de cristal en placas con medio agar LB/Tc<sup>30</sup>/  $Gm^{60}$  y se llevaron a incubar a 37°C/ 18 horas. Una vez que se obtuvieron colonias, se seleccionaron 5, se sembraron en cajas con medio agar LB/Tc<sup>30</sup>/  $Gm^{60}$ , incubándolas a 37°C/ 18 horas y adicionalmente se inocularon tubos con 3 ml de medio liquido LB/ Tc<sup>30</sup>/  $Gm^{60}$  debidamente rotulados, los cuales fueron incubados a 30°C/ 18hrs/ rotación. Para verificar cuál de las colonias era la transformante deseada se procedió a realizar el aislamiento de plásmido de cada tubo habiendo cumplido el tiempo de incubación, mediante la técnica de lisis alcalina (ver técnica en el punto VII.3.2 del presente documento). El tamaño de pKOK4 con cada uno de los fragmentos interrumpidos por  $Gm^R$  fue de 8.26 Kb y se verifico corriendo 5  $\mu$ l de cada aislamiento mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 29).



**Figura 13.** Ligación de los fragmentos interrumpidos con un gen de resistencia a gentamicina ( $Gm$ ) al plásmido pKOK4. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

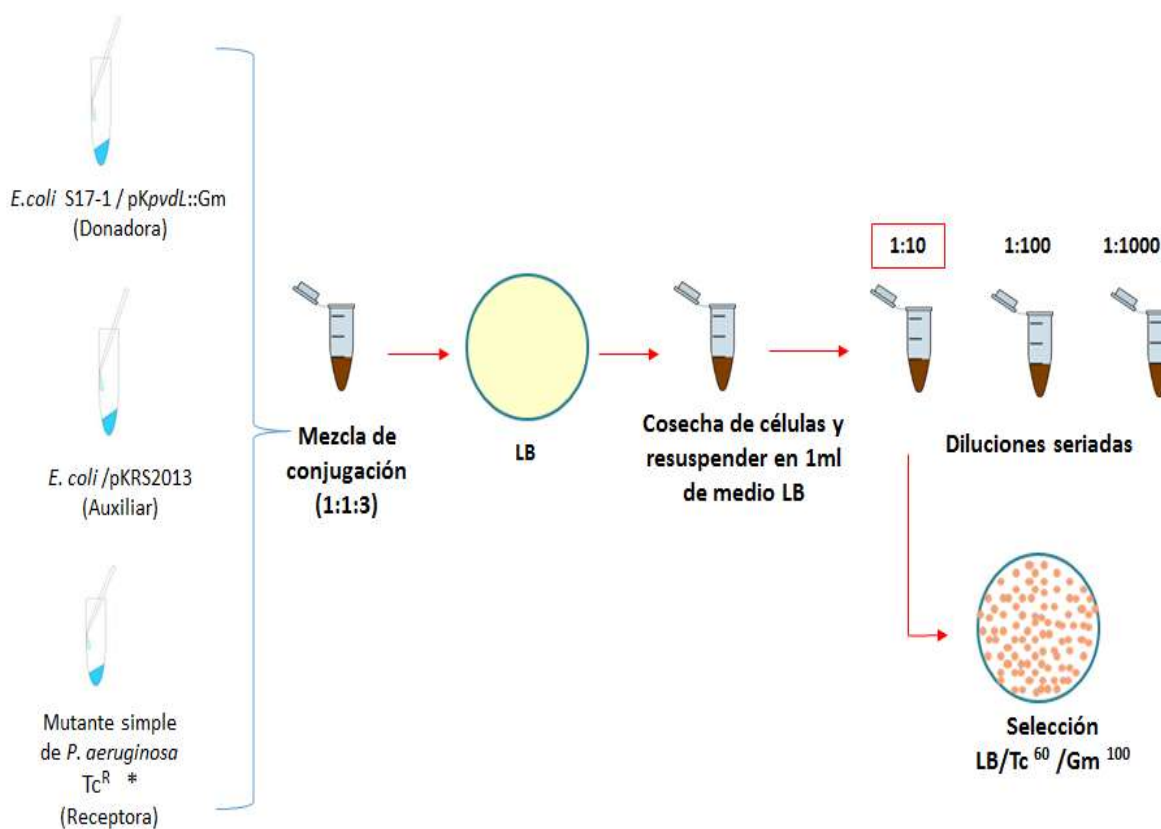
Para verificar que efectivamente la construcción de 8.26 Kb obtenida con la ligación de pKOK4 y cada uno de los fragmentos interrumpidos con Gm<sup>R</sup>, era la correcta, se realizó una segunda corroboración realizando una restricción parcial con la enzima *EcoRI* (verificar técnica en el punto VII.3.11 del presente documento) y se corrieron 3 µl mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 30).



**Figura 14.** Corroboración de la integración de fragmentos interrumpidos con un gene de resistencia a gentamicina (Gm) al plásmido pKOK4 mediante restricción con *EcoRI*. Corroboración en gel de agarosa al 0.8%.

## VI.2 Obtención de mutantes dobles mediante conjugación tripartita.

Una vez que se obtuvieron los fragmentos interrumpidos  $pchF::Gm^R$ ,  $pvdJ::Gm^R$ ,  $pvdL::Gm^R$  y  $pvdI::Gm^R$ , fueron utilizados para realizar combinaciones de mutaciones dobles con las mutantes simples de los genes indicados en la tabla 9 mutados por trasposición; mediante el sistema de conjugación tripartita (ver técnica en el punto VII.3.13 del presente documento); llevando a cabo una segunda mutación por recombinación de un gen NRPS de *P. aeruginosa* PAO1. La selección de las mutantes dobles fue mediante medio agar LB/Tc<sup>60</sup>/Gm<sup>100</sup> (Figura 31).



**Figura 15.** Esquema de la técnica de conjugación tripartita para obtención de mutantes dobles de *P. aeruginosa* por recombinación.

De las mutantes obtenidas mediante el plaqueo, se realizó una selección de 15 a 20 colonias al azar. Para los experimentos posteriores, las colonias fueron resembradas en cajas con medio agar LB/Tc<sup>60</sup>/ Gm<sup>100</sup> y guardadas en medio líquido LB con glicerol al 50% a una temperatura de -80°C.

Se realizaron combinaciones de mutaciones entre los fragmentos interrumpidos con Gm<sup>R</sup> y las mutantes por trasposición de los genes de la tabla 9, de tal forma que el número total de combinaciones obtenidas fue de 32 (Tabla10), aunque de cada combinación se tomaron un total de 15 a 20 colonias para los ensayos posteriores, en los que se realizó una preselección y una selección final de las mutantes requeridas para los experimentos finales del objetivo 2.

**Tabla 1.** Combinaciones dobles obtenidas de mutantes por trasposición y fragmentos interrumpidos de genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1.

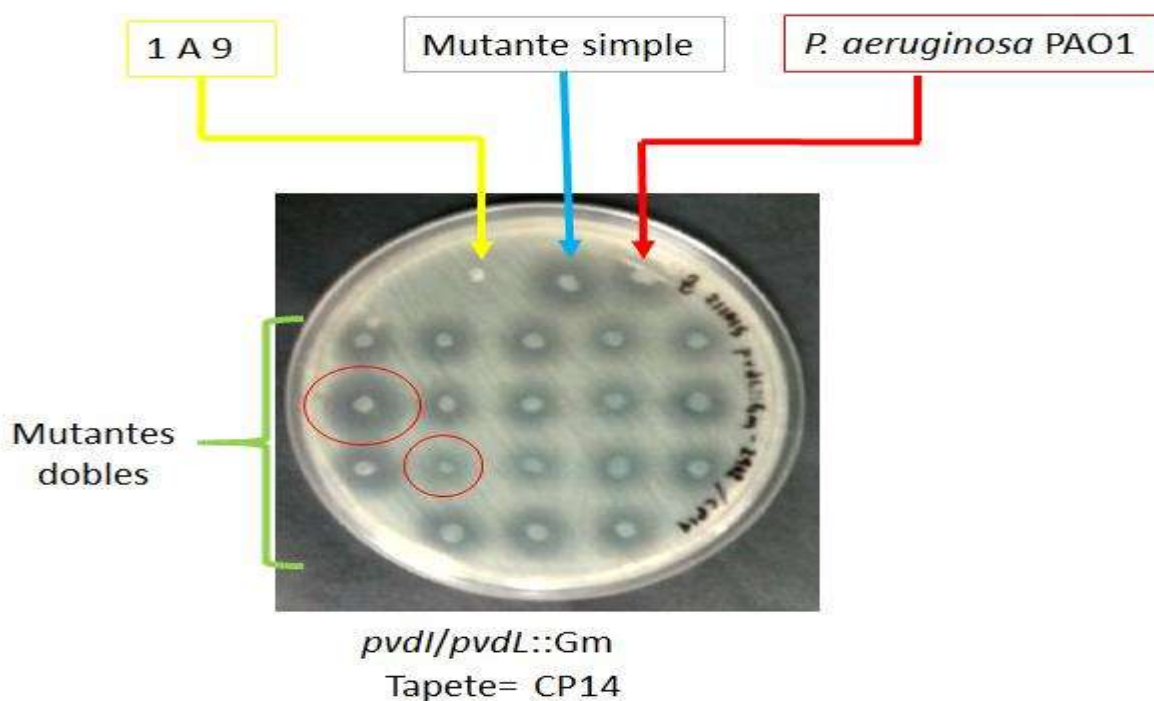
										Combinaciones
	<i>ambB</i>	<i>ambE</i>	<i>pchE</i>	<i>pchF</i>	<i>pvdJ</i>	<i>pvdL</i>	<i>pvdI</i>	PA3327	PA4078	
<i>pvdJ</i> ::Gm	*	*	*	*	/	*	*	*	*	8
<i>pvdL</i> ::Gm	*	*	*	*	*	/	*	*	*	8
<i>pchF</i> ::Gm	*	*	*	/	*	*	*	*	*	8
<i>pvdI</i> ::Gm	*	*	*	*	*	*	/	*	*	8
									Total	32

(\*) **Combinación realizada.**  
 (/) **Combinación no realizada.**

Con la realización de las combinaciones se concluyó el objetivo 1; el cual corresponde a la obtención de mutantes dobles de los genes que codifican a las NRPS implicados en la biosíntesis de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1.

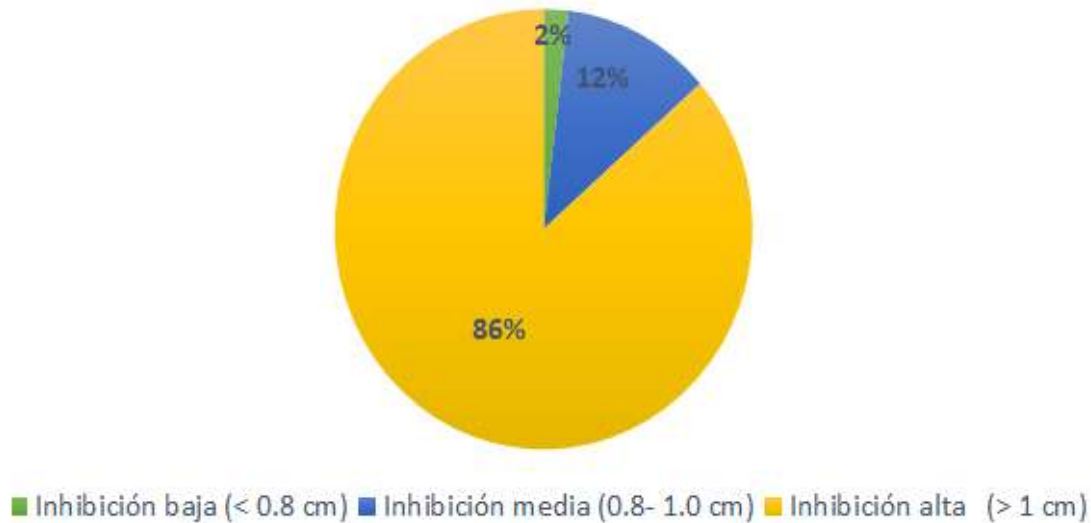
### VI.3 Preselección de clones mediante Spot on Lawn por picadura.

Una de las propiedades biológicas de los ciclodipéptidos es que pueden actuar como antibióticos y como tal estos pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos (tabla 1). Una de las formas de revisar la actividad tipo antibiótico de los microorganismos es la confrontación bacteriana; existen técnicas diferentes para montar experimentos de confrontación, sin embargo en el presente proyecto se utilizó la técnica de Spot on Lawn por picaduras (ver técnica en el punto VII.3.14.1 del presente documento). Para cada una de las combinaciones se seleccionaron 15 a 20 colonias para analizar su fenotipo y de esta forma representar el fenotipo de las colonias de cada una de las combinaciones obtenidas. El experimento se montó como se muestra en la figura 32.



**Figura 16.** Ensayos de cepas de *P. aeruginosa* mediante Spot on lawn por picaduras.

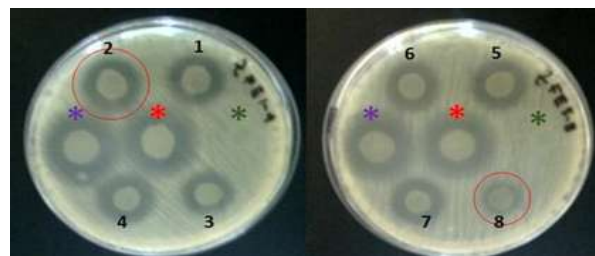
Una vez montados los experimentos de Spot on Lawn, se procedió a realizar la medición de los halos de inhibición, y se compararon con respecto al halo formado con *P. aeruginosa* PAO1 y mutantes simples; la cepa 1 A9 es una cepa control que no produce ciclodipéptidos. Los halos de inhibición se catalogaron en halos de inhibición alta, inhibición media e inhibición nula (Grafica 1) para distinguir los fenotipos arrojados por las cepas seleccionadas y de esta forma seleccionar un número representativo por fenotipo identificado para cada combinación.



**Grafica 1.** Halos de inhibición obtenidos mediante ensayos spot on lawn por picadura de las mutantes dobles; los halos fueron catalogados comparando el tamaño de su halo contra el tamaño del halo de inhibición de *P. aeruginosa* PAO1 (0.8 - 1.0 cm), ensayo realizado por triplicado.

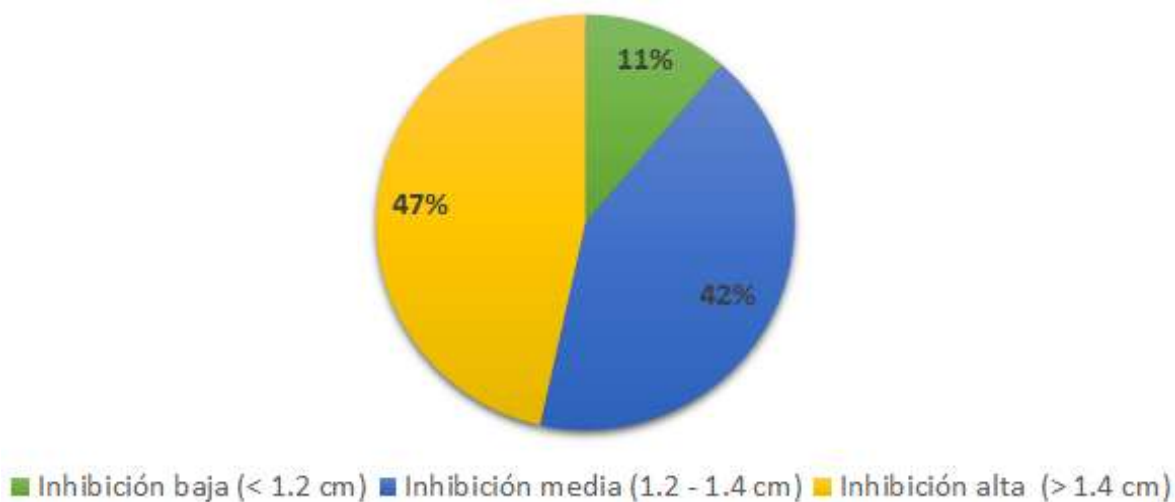
#### VI.4 Preselección de clonas mediante Spot on Lawn por gota.

Posterior a la selección de las cepas representativas de los diferentes fenotipos representados en el experimento de Spot on Lawn por picadura para cada una de las combinaciones; se realizó una variante del experimento de Spot on Lawn, en el que se utilizan gotas (ver técnica en el punto **VII.3.14.2 del** presente documento) en lugar de picadura; controlando la cantidad de inóculo, creciendo los controles y las cepas mutantes a D.O.<sup>600</sup> con absorbancias entre 0.4 y 0.7. Se colocaron en el centro las cepas control; PAO1, Mutante simples y cepa 1 A9 y alrededor las gotas de las mutantes dobles que se probarían; todas estas sobre un tapete de la cepa CP14 crecida también a la misma densidad que todas las anteriores (Figura 33).



**Figura 17.** Ejemplo del montaje de ensayos de Spot on Lawn por gota. \* Mutante simple, \* *P. aeruginosa* PAO1, \* 1 A 9, 1-8 = mutantes dobles, tapete= CP14, D.O. 600 = (0.4 - 0.7 abs).

En este ensayo también se midieron los halos de inhibición, se compararon contra los halos de PAO1 y las mutantes simples y además se clasificaron de igual forma que en el pasado experimento de Spot on Lawn por picadura; en halos de inhibición baja, inhibición media e inhibición alta (Grafica 2). Dados los resultados, nuevamente se realizó una segunda selección de cepas, eligiendo un número de cepas que representara a cada uno de los fenotipos para cada una de las 32 combinaciones realizadas. En este experimento se observó con más claridad el tamaño de los halos que formaban las mutantes facilitando la selección de las mutantes que fueron utilizadas para los experimentos posteriores.



**Grafica 2.** Halos de inhibición obtenidos mediante ensayos spot on lawn por gota de las mutantes dobles; los halos fueron catalogados comparando el tamaño de su halo contra el tamaño del halo de inhibición de *P. aeruginosa* PAO1 (1.2 - 1.4 cm), ensayo realizado por triplicado.

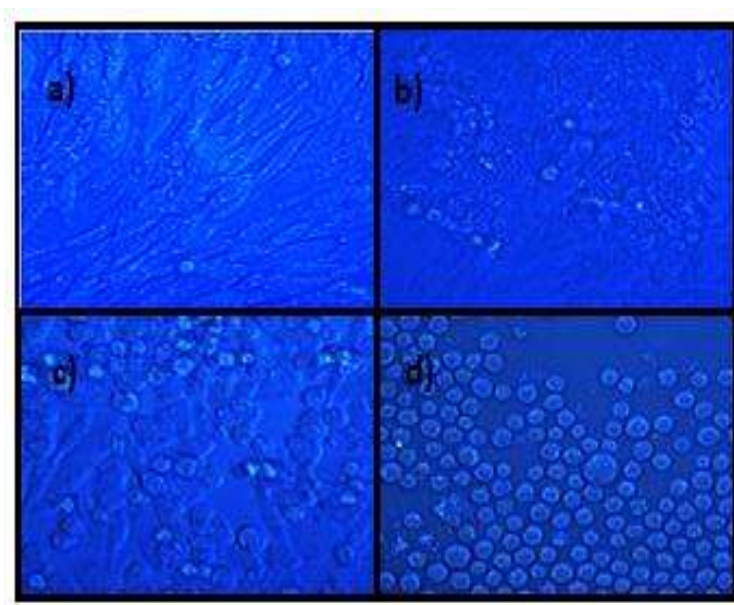
## **VI.5 Ensayos de viabilidad celular con HeLa.**

### **VI.5.1 Análisis microscópico del efecto de los sobrenadantes de las mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1 sobre células HeLa.**

Mediante la segunda selección con el ensayo de Spot on Lawn por gota, se eligieron un total de 16 cepas con la mutación *pvdJ::Gm*, 16 cepas con la mutación *pvdL::Gm*, 25 cepas con la mutación *pchF::Gm* y 16 cepas con la mutación *pvdI::Gm*; todas respectivamente combinadas con las mutantes simples por trasposición de los genes de la tabla 9.

Con las 73 cepas de diferentes combinaciones de genes mutados se realizaron ensayos viabilidad celular mediante la técnica de MTT (ver técnicas en los puntos VII.3.16 y VII.3.16.1 del presente documento) en la línea celular HeLa. Las cepas mutantes seleccionadas fueron incubadas durante un periodo promedio de 40 horas en medio líquido LB 30°C/ rotación; posterior a su periodo de incubación, se realizó la obtención del sobrenadante mediante centrifugación y un filtrado final con filtros de 0.22µm.

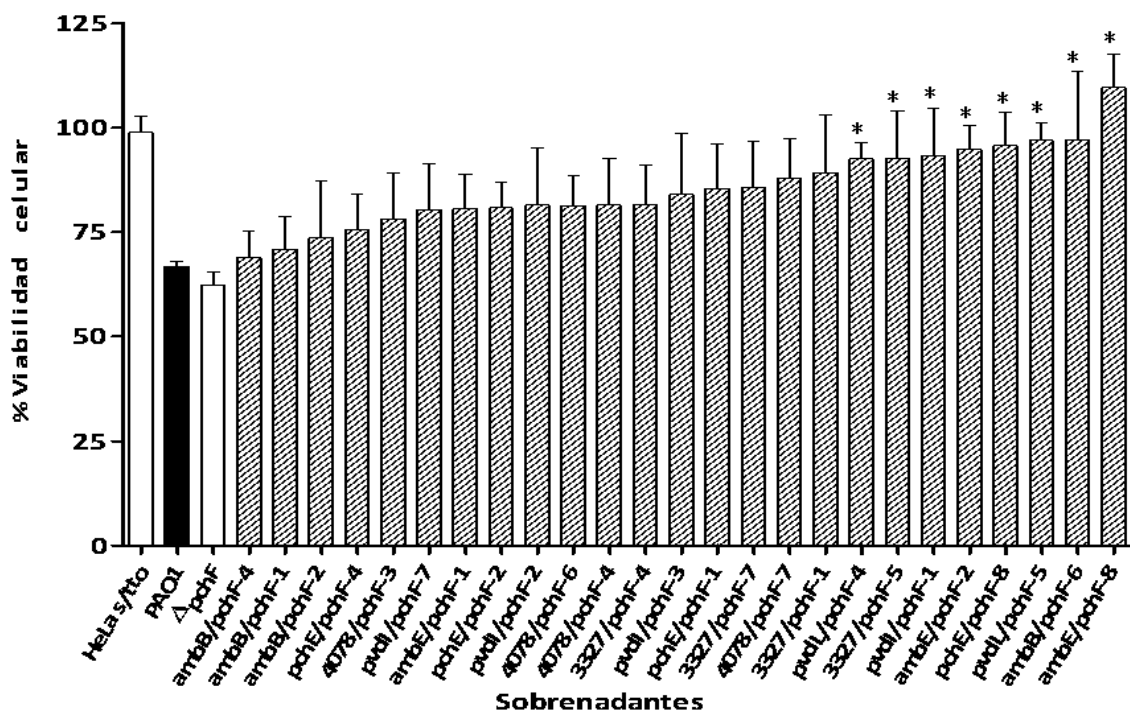
Se realizaron experimentos por duplicado en tres ensayos distintos, con un periodo de 12 horas con el tratamiento de los sobrenadantes y los controles respectivos. Transcurrido el tiempo de incubación de las células con el tratamiento de los diferentes sobrenadantes se observaron al microscopio; lo observado al microscopio nos indicó que hubo cambio de morfología celular, las células HeLa son células que poseen una morfología alargada (figura 34 a), pero pasado el tiempo de incubación con los diferentes tratamientos, estas presentaron un cambio en su morfología, mostrando formas en su mayoría redondas, con bordes irregulares y además se observó que el tratamiento propiciaba la pérdida de la matriz celular, ya que las células se mostraban en todos los casos despegadas unas de otras (figuras 34 c y d); el efecto presentado era similar al observado en células HeLa tratadas con una dosis de 0.1µg/ml de la mezcla de CDPS obtenidos de *P. aeruginosa* PAO1 (figura 34 b).



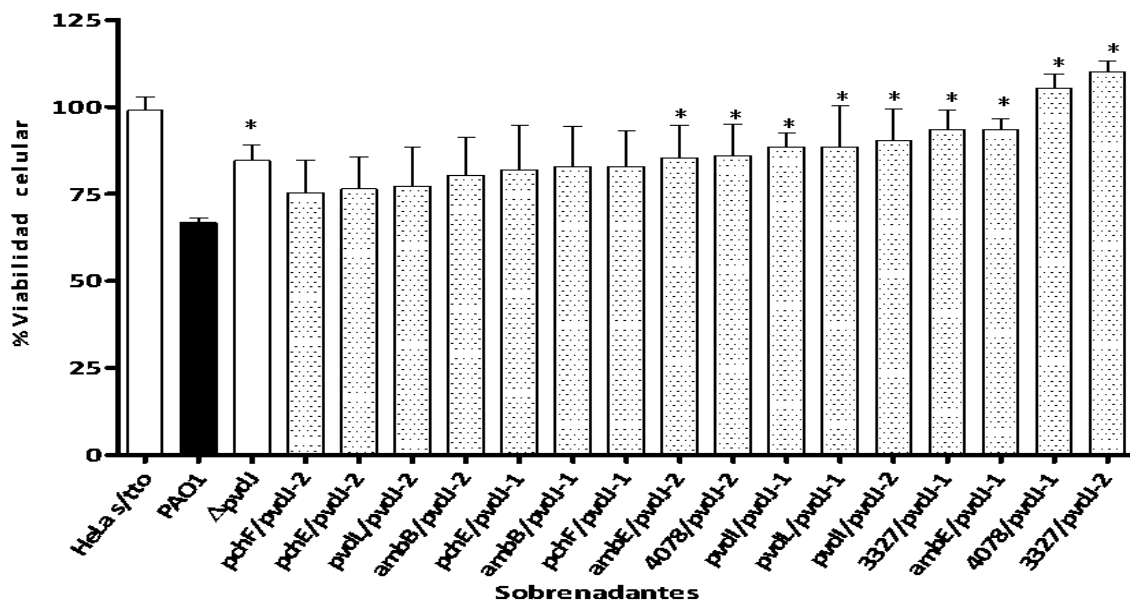
**Figura 18.** Vista al microscopio de células HeLa después de 12 horas de tratamiento; **a)** HeLa sin tratamiento, **b)** HeLa + CDPS (0.1µg/µL), **c)** HeLa + sobrenadante (*ambB/pvdJ::Gm-4*) y **d)** HeLa + sobrenadante (PA4078/*pvdJ::Gm-1*).

### VI.5.2 Ensayos MTT con HeLa tratadas con sobrenadantes de las mutantes dobles.

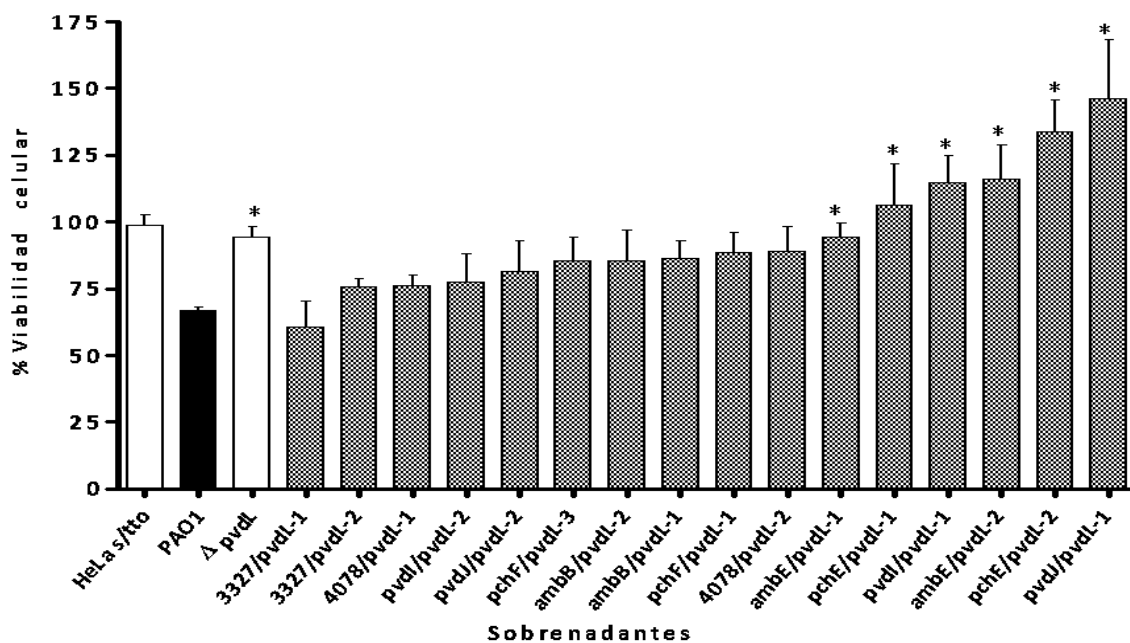
Los resultados de los ensayos de MTT (Graficas 3-6), mostraron que en general la mayoría de los sobrenadantes de las mutantes dobles seleccionadas hasta esta etapa del proyecto, disminuyeron su efecto sobre la viabilidad celular; es decir que la viabilidad celular se mantenía a porcentajes mayores, en comparación con el efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 o que el efecto de la mezcla de CDPS de *P. aeruginosa* PAO1 donde el porcentaje de viabilidad disminuye considerablemente, a pesar de que los resultados vistos al microscopio indicaban un cambio de morfología. Sin embargo algunos de los sobrenadantes mostraron efectos similares a los que produjo el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1, con una pérdida de la viabilidad celular cercano al 65 % .



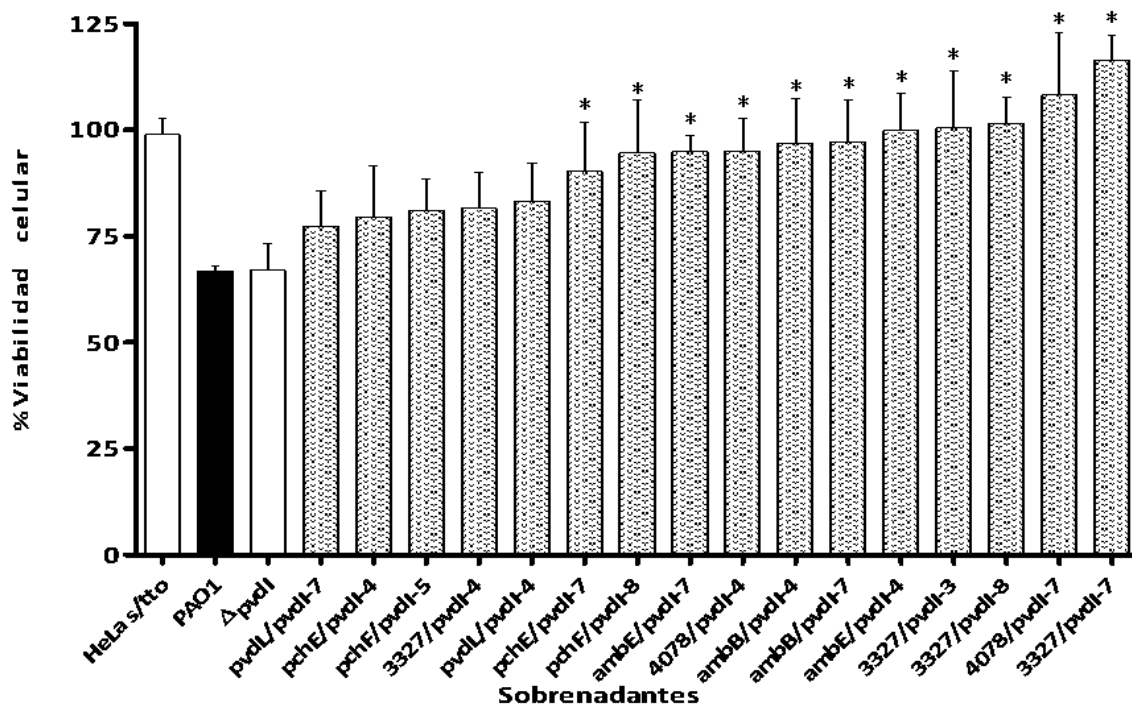
**Grafica 3.** HeLa 12 horas de tratamiento con sobrenadante de mutantes dobles combinadas con *pchF::Gm* de *P. aeruginosa* PAO1 (crecimiento de 40 horas/ 30° C/ rotación). ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y las líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*(p <0.05).



**Grafica 4.** HeLa 12 horas de tratamiento con sobrenadante de mutantes dobles combinadas con *pvdJ::Gm* de *P. aeruginosa* PAO1 (crecimiento de 40 horas/ 30° C/ rotación). ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y la líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*(p <0.05).



**Grafica 5.** HeLa 12 horas de tratamiento con sobrenadante de mutantes dobles combinadas con *pvdL::Gm* de *P. aeruginosa* PAO1 (crecimiento de 40 horas/ 30° C/ rotación). ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y la líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*(p <0.05).



**Grafica 6.** HeLa 12 horas de tratamiento con sobrenadante de mutantes dobles combinadas con *pvdt::Gm* de *P. aeruginosa* PAO1 (crecimiento de 40 horas/ 30° C/ rotación). ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y la líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*(p <0.05).

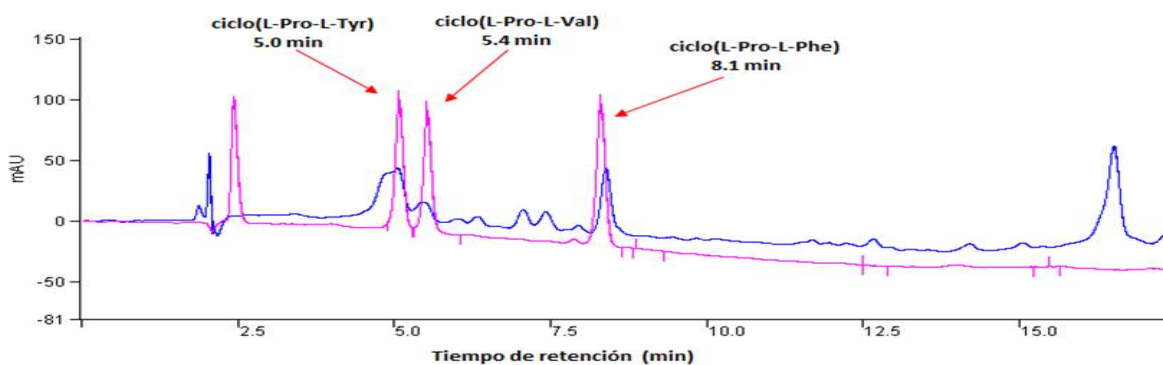
Con los resultados obtenidos mediante los experimentos de MTT se hizo una última selección de las mutantes; eligiendo cepas que tuvieran un fenotipo en el que sus sobrenadantes no disminuyeran la viabilidad celular como el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1; es decir, para un tipo de combinación de genes mutados se trabajó con dos o cuatro clonas elegidas previamente en los ensayos de confrontación bacteriana y cuando se observó el efecto de sus sobrenadantes sobre las células HeLa. Hubo situaciones en las que las clonas elegidas a pesar de tener el mismo tipo de combinación de genes mutados, tuvieron diferente efecto; por lo que se eligió la clona cuyo sobrenadante tuvo un efecto menor sobre la viabilidad celular, eliminando de esta forma cepas parecidas y de efecto diferente al deseado. De esta forma se eligieron a 37 cepas finales (Tabla 11) a las que se les realizó el análisis fenotípico posterior correspondiente a la producción de CDPs.

**Tabla 2.** Mutantes dobles seleccionadas.

<i>ambB/pvdt-7</i>	<i>pchE/pchF-4</i>	<i>pchF/pvdt-1</i>
<i>ambE/pvdt-4</i>	<i>pchE/pchF-8</i>	<i>pvdt/pvdt-1</i>
<i>pchF/pvdt-8</i>	<i>pvdt/pchF-5</i>	<i>pvdt/pvdt-1</i>
<i>pchE/pvdt-7</i>	<i>pvdt/pchF-1</i>	PA3327/ <i>pvdt-2</i>
<i>pvdt/pvdt-4</i>	<i>pvdt/pchF-7</i>	PA4078/ <i>pvdt-1</i>
PA3327/ <i>pvdt-4</i>	PA3327/ <i>pchF-4</i>	<i>ambB/pvdt-1</i>
PA3327/ <i>pvdt-7</i>	PA3327/ <i>pchF-5</i>	<i>ambE/pvdt-2</i>
PA4078/ <i>pvdt-7</i>	PA4078/ <i>pchF-3</i>	<i>pchE/pvdt-2</i>
<i>ambB/pchF-4</i>	PA4078/ <i>pchF-7</i>	<i>pchF/pvdt-1</i>
<i>ambB/pchF-6</i>	<i>ambB/pvdt-2</i>	<i>pvdt/pvdt-1</i>
<i>ambE/pchF-1</i>	<i>ambE/pvdt-1</i>	<i>pvdt/pvdt-1</i>
<i>ambE/pchF-8</i>	<i>pchE/pvdt-2</i>	PA3327/ <i>pvdt-1</i>
		PA4078/ <i>pvdt-2</i>

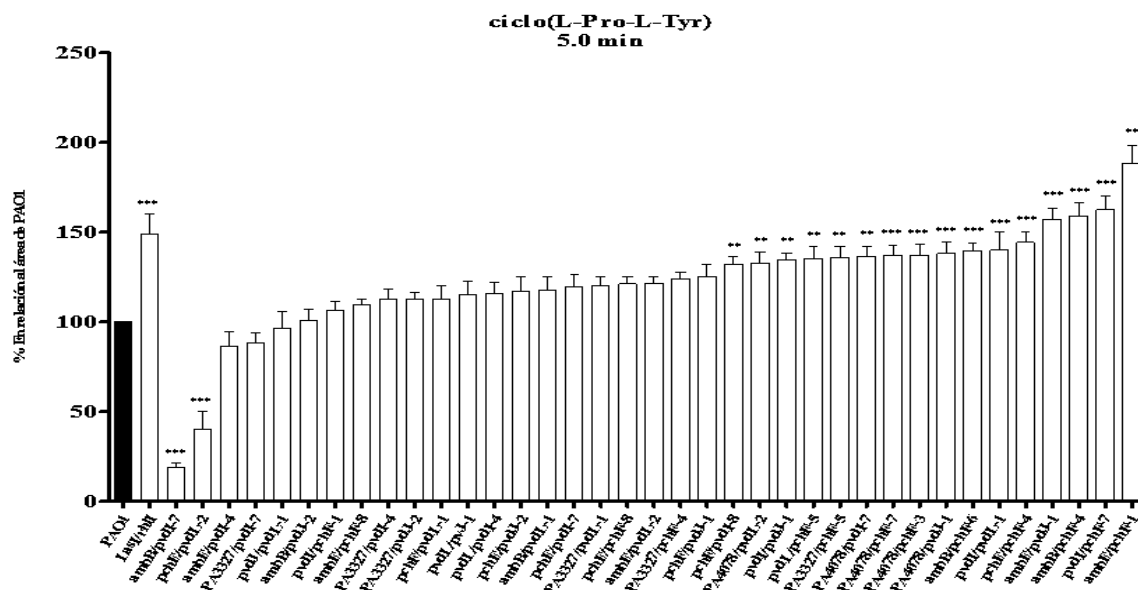
## VI.6 Extracción de ciclodipéptidos en las mutantes obtenidas de *P. aeruginosa* PAO1.

La extracción de los ciclodipéptidos se realizó a las 37 mutantes dobles seleccionadas previamente (Tabla 11), a *P. aeruginosa* PAO1, así como a las mutantes simples por trasposición de *P. aeruginosa* PAO1 y a la mutante *LasI/RhlI*. La extracción se realizó de volúmenes de 10 ml del sobrenadante obtenido de cada medio de crecimiento (ver técnica en el punto del presente documento). Aunque con estas extracciones aparentemente no se obtuvo una cantidad significativa de CDPs, se pudo observar la presencia de estos y la diferencia cuantitativa unas respecto de otras. Los picos detectados corresponden de la siguiente manera: ciclo(L-Pro-L-Tyr) identificado en el minuto 5.0, ciclo(L-Pro-L-Val) en el minuto 5.4 y ciclo(L-Pro-L-Phe) en el minuto 8.1 como se muestra en la figura 35.

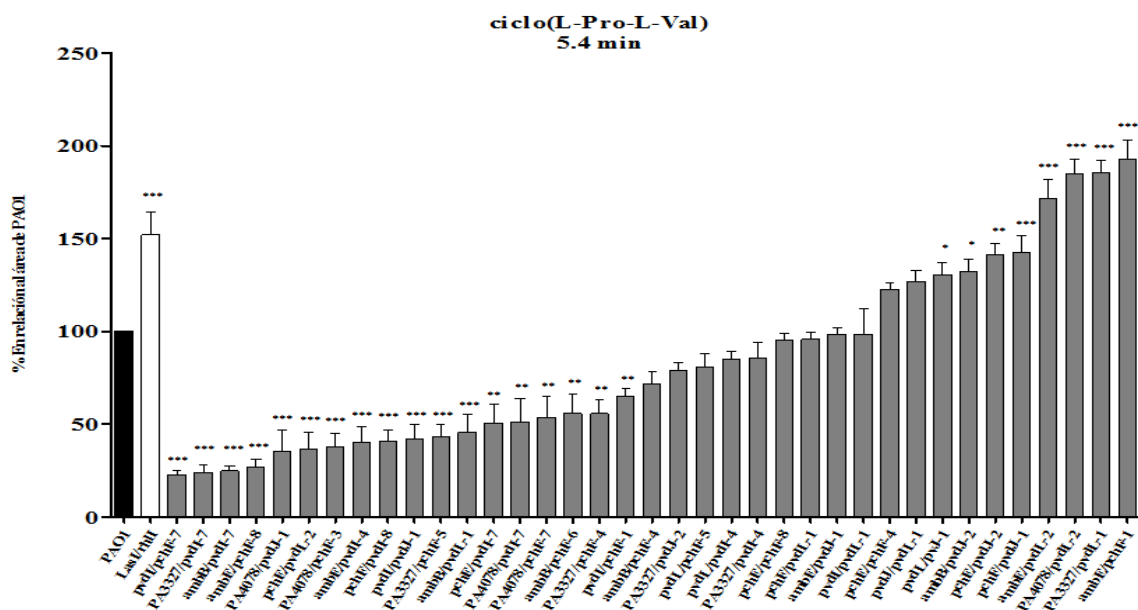


**Figura 19.** Cromatograma obtenido mediante el análisis en HPLC, donde la línea azul representa la extracción de CDPs en acetato de etilo del sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 y la línea rosa representa el control de los tres ciclodipéptidos sintéticos, probados para identificación del tiempo de retención de estos.

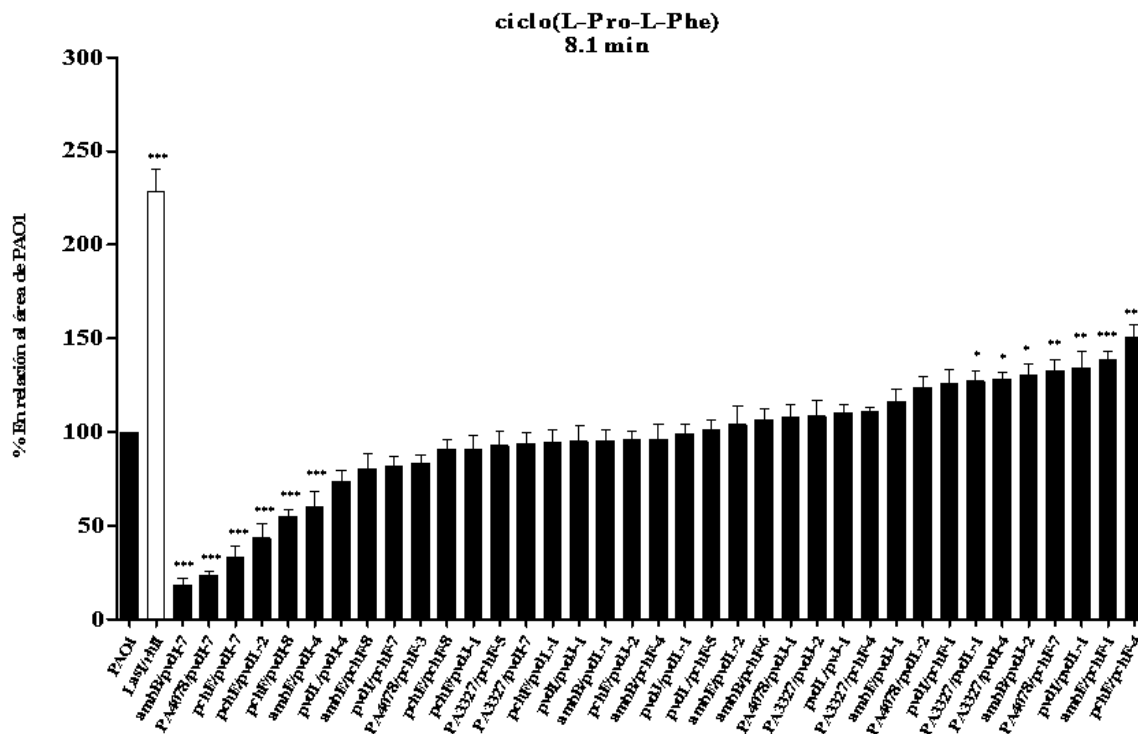
Una vez que se obtuvieron los resultados de los análisis en HPLC de los extractos en acetato de etilo de todas las cepas a analizar, se realizaron los análisis estadísticos para cada pico correspondiente a cada uno de los ciclodipéptidos; los datos de los diferentes picos analizados de las mutantes dobles mostraron una variabilidad fenotípica al compararse contra los picos de la producción de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1.



**Grafica 7.** Cuantificación del CDP ciclo(L-Pro-L-Tyr) en sobrenadantes de mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1, cultivos de 48 horas de crecimiento. ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y las líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*(p <0.05).



**Grafica 8.** Cuantificación del CDP ciclo(L-Pro-L-Val) en sobrenadantes de mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1, cultivos de 48 horas de crecimiento. ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y las líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*(p <0.05).



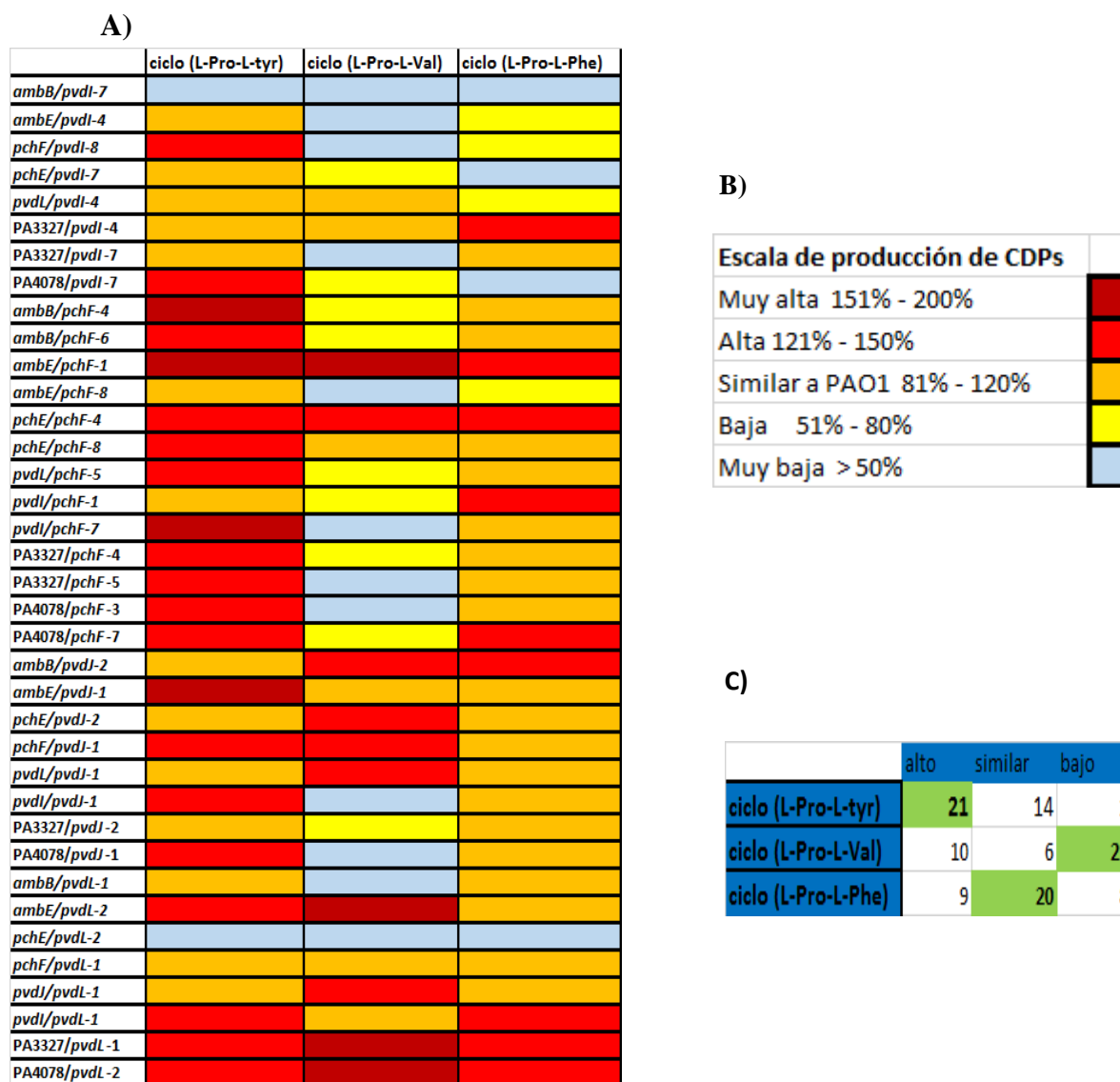
**Grafica 9.** Cuantificación del CDP ciclo(L-Pro-L-Phe) en sobrenadantes de mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1, cultivos de 48 horas de crecimiento. ANOVA una vía, Dunnett, las barras indican la media y las líneas el error estándar (n=3 por duplicado), \*( $p < 0.05$ ).

En la producción de ciclo(L-Pro-L-Tyr) catorce de las mutantes mostraron una producción similar a la producción de PAO1, mientras que catorce mutantes mostraron un aumento significativo llegando a valores de más de 150% y hasta 189% en la producción de este ciclodipéptido con respecto a la producción de PAO1 y solo dos mutantes mostraron una disminución significativa con menos del 50% con respecto de la producción de PAO1 para este ciclodipéptido (Grafica 7).

En la producción de ciclo(L-Pro-L-Val) mostro que la mayoría de las mutantes dobles tuvieron una disminución en general con valores de menos del 50% con respecto de la producción de PAO1 para este ciclodipéptido, sin embargo ocho cepas mostraron un aumento significativamente mayor con respecto a la producción de PAO1, donde las últimas cuatro mutantes mostraron valores arriba de 150% e inclusive 192% con respecto de la producción de PAO1 (Grafica 8).

Finalmente el análisis estadístico para la producción de ciclo(L-Pro-L-Phe); diferentes mutantes dobles mostraron disminución significativa en comparación de la producción de PAO1 con porcentajes cercanos al 50% o menos, sin embargo seis cepas mostraron tener una significativamente producción mayor a PAO1 donde la cepa *pchE/pchF-4* mostro una producción cercana al 150% respecto de la producción de PAO1 (Grafica 9).

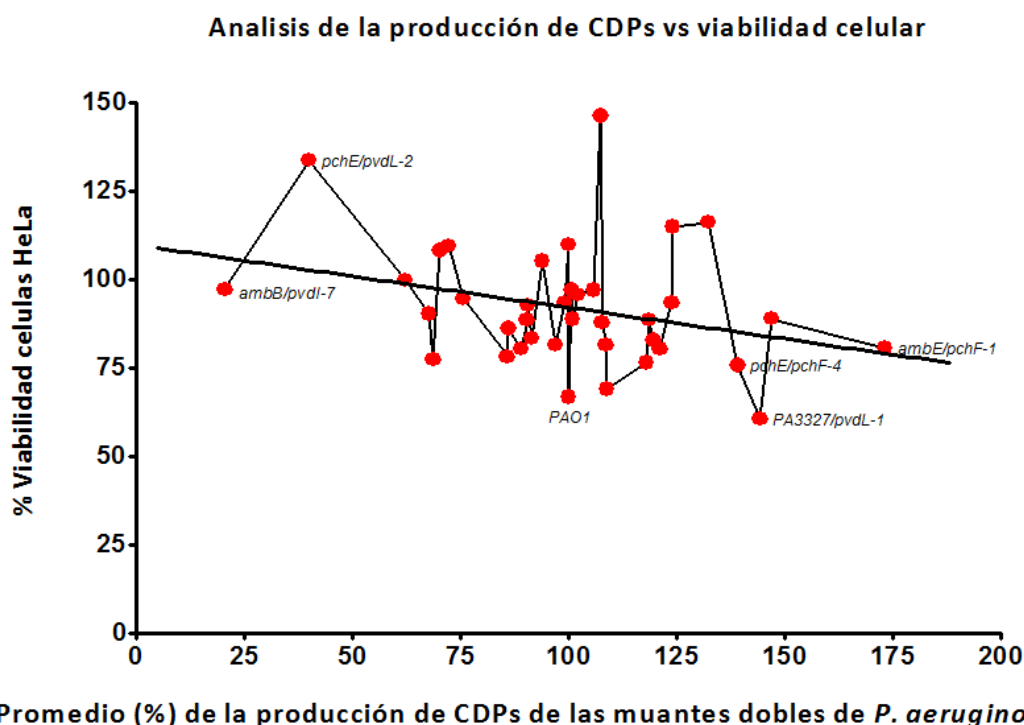
Haciendo una comparación de las tres graficas; se identificaron varias cepas que disminuyeron la producción de los tres ciclodipeptidos analizados, y otras que mostraron aumento significativo en los tres ciclodipeptidos tal es el caso de *ambB/pvdI-7* y *ambE/pchF-1* respectivamente, entre otras cepas. Para revisar el comportamiento de las mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 en cuanto a la producción de ciclodipeptidos se utilizó una escala de colores con valores arbitrarios que pudieran ayudarnos para realizar el análisis en conjunto (Figura 36 A-C).



**Figura 20.** Análisis de la producción de CDPs en las mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 A) Análisis comparativo entre producción de CDPs y el efecto del sobrenadante de las mutantes sobre la viabilidad en células HeLa, B) escala de colores y C) análisis del efecto general de las mutaciones sobre la producción de CDPs, los números representan el número de mutantes que presentaron cierto nivel de producción; producción alta, media o baja.

## VI.7 Relación de la producción de CDPs vs viabilidad celular (HeLa).

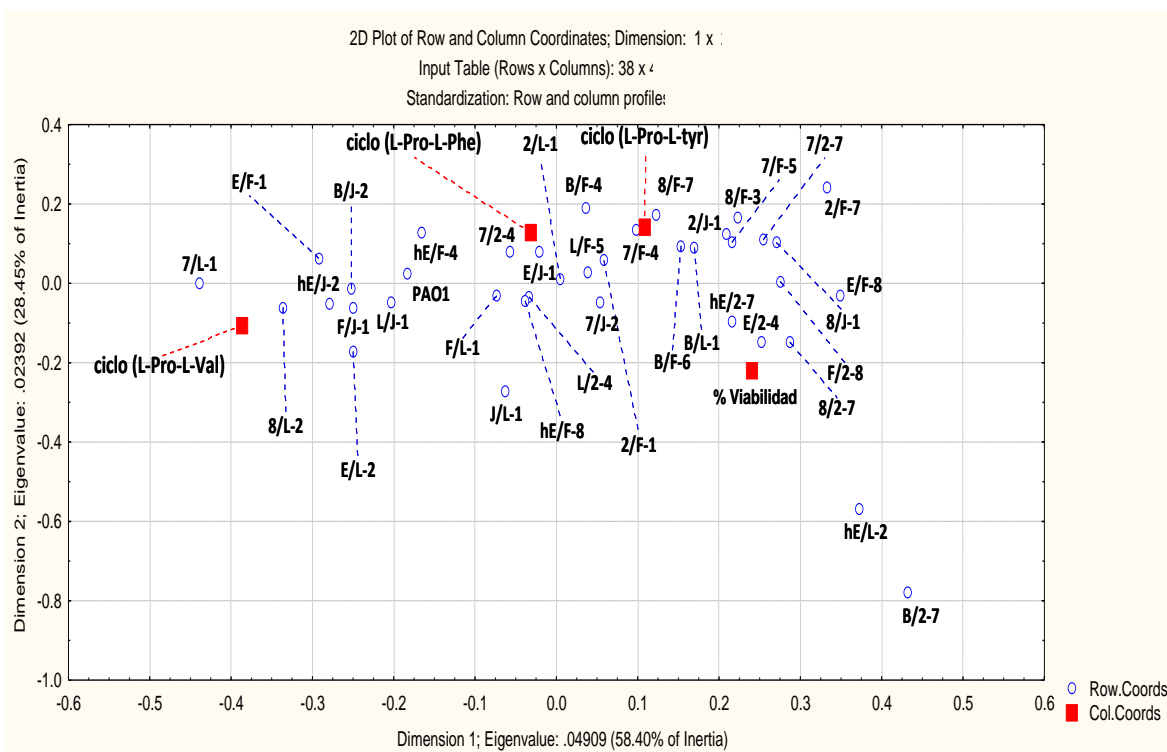
Relacionando los resultados de la producción de ciclodipeptidos de las mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1, con el efecto que produjeron los sobrenadantes de las mutantes dobles sobre la viabilidad de células HeLa; se observó que a mayor concentración de CDPs, el porcentaje de viabilidad celular era menor, (Gráfica 10) donde se obtuvo intervalos de confianza de 95% y P. value de 0.0669. En la gráfica 10, los puntos en color rojo representan la confrontación de resultados; en el eje de X se grafica el porcentaje de producción de ciclodipeptidos y en el eje Y el porcentaje de viabilidad observado en células HeLa por efecto de los sobrenadantes de cada una de las mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1. Se señalan algunos puntos con nombre, los cuales representan mutantes de importancia; cepas con baja producción de ciclodipeptidos (*ambB/pvdI-7* y *pchE/pvdL-2*) y alta producción de ciclodipeptidos *pchE/pchF-4*, PA3327/*pvdL-1* y *ambB/pchF-1*, en extremos izquierda y derecha de la gráfica respectivamente, al centro de la gráfica se identifica la confrontación de los resultados de la cepa PAO1.



**Gráfica 10.** Confrontación de resultados, producción de ciclodipeptidos de cada una de las mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1 vs % de viabilidad de células HeLa por efecto de los sobrenadantes de las mutantes dobles. Regresión lineal, P. value 0.0669, intervalos de confianza 95%.

## VI.8 Correlación de datos.

En un análisis de correlación de los resultados, se observa el comportamiento de cada una de las 38 combinaciones de mutaciones realizadas en genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1 en cuanto a la producción de ciclodipeptidos y el influencia de cada combinación de mutaciones sobre la viabilidad de células HeLa; adicionalmente se detalla cual de los ciclodipeptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 afecta más a la viabilidad de células HeLa (Gráfica 11). Cada cuadro de color rojo representa una variable; producción de los ciclodipeptidos ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y porcentaje de viabilidad en células HeLa. Cada uno de los círculos azules representa a cada una de las mutantes dobles de *P. aeruginosa* PAO1, las letras en color negro indican el nombre de cada punto, donde el nombre de cada una de los puntos azules está abreviado colocando los números o letras finales del nombre de cada gen y están divididos por una diagonal acompañados de un guion y un número adicional para identificar la clona de esa combinación de genes mutados.



**Gráfica 11.** Correlación de los datos obtenidos del efecto de la combinación de mutaciones en genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1(círculos azules) sobre la producción de ciclo(L-Pro-L-Val) ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr); (primeros tres cuadros rojos de izquierda a derecha) y la correlación entre la producción de ciclodipeptidos de las mutantes dobles con el efecto sobre la viabilidad de células HeLa (cuadro rojo de la derecha).

Para entender la grafica anterior es necesario tener en cuenta que depende de la distancia entre los puntos y los cuadros para indicar su correlación. En el caso de los circulos azules para con los cuadros rojos que representan a la produccion de cada uno de los ciclodipéptidos, mientras más alejado este un circulo azul de cierto cuadro, quiere decir que esta mutación afecto la producción de tal ciclodipeptido, disminuyendo la producción de este, mientras que si el circulo azul esta más cercano a un cuadro rojo correspondiente a cierto ciclodipeptido quiere decir que esa mutación presenta producción normal a sobreproduccion para tal ciclodipeptido.

En el caso de la correlacion de los cuadros rojos que representan a cada uno de los ciclodipeptidos, asi como de los circulos azules que representan a las mutantes y su produccion de los tres ciclodipeptidos para con el cuadro rojo etiquetado para la variable de viabilidad celular en HeLa, entiendase que mientras mas alejado este un circulo azul o un cuadro rojo de algun ciclodipeptido respecto del cuadro rojo de viabilidad celular, quiere decir que este ciclodipeptido o la producción de ciclodipeptidos de tal mutante afectó menormente la viabilidad celular, disminuyendo poco o nada el porcentaje de viabilidad de las células HeLa; mientras que un cuadro rojo correspondiente a alguno de los ciclodipeptidos o un circulo azul mas cercano indicara que este ciclodipeptido o la producción de ciclodipeptidos de tal mutante, afectó de forma negativa el porcentaje de viabilidad de células HeLa, disminuyendo la viabilidad a porcentajes menores que la viabilidad que se observaria en células HeLa sin tratamiento (viabilidad cercana al 100%).

## VII. DISCUSIÓN

Se ha reportado que los ciclodipéptidos tienen una gran potencial bioactivo, pues tienen actividad antimicrobiana, antimicótica, inhibidora de quorum sensing, antifouling, citotóxica, promotora del crecimiento vegetal, entre otras (tabla 4). De ahí la importancia de estudiar la actividad de los CDPs, así como la síntesis de estos y su papel dentro de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.

En un trabajo reciente se identificaron nueve genes péptido sintetasa no-ribosomal (NRPS) en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, con lo que se indicó que las NRPS eran las involucradas en la síntesis de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 (González -López et al., 2016). Sin embargo la mutación por trasposición en estos nueve genes no arrojó datos contundentes acerca de cuáles de estos estaban mayormente implicados en la síntesis de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1, pues la cuantificación de ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) en las mutantes de los genes NRPS, dio como resultado el incremento de la producción de estos, con respecto a la producción de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1, por lo que se supuso que no solo uno de los nueve genes NRPS identificados estaba involucrado en la síntesis de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1. Por lo que en el actual proyecto se propuso la obtención de mutantes dobles con los genes NRPS identificados.

Se obtuvieron un total de 32 mutantes dobles (tabla 10), realizando 32 de 72 combinaciones posibles de los genes NRPS identificados en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (González-López y Col. 2016). Las mutantes fueron obtenidas por técnicas de restricciones y ligaciones de ADN, para interrumpir los genes NRPS con un cassette de resistencia a Gentamicina (figuras 20-30); logrando interrumpir cuatro genes (*pchF*, *pvdJ*, *pvdL* y *pvdI*), los cuales se combinaron con ocho de las nueve mutantes por trasposición en genes NRPS, sin combinarse consigo mismos, mediante un sistema de conjugación bacteriana (figura 31), integrando los fragmentos interrumpidos de genes NRPS en el genoma de las mutantes por trasposición de *P. aeruginosa* PAO1 mediante recombinación de ADN.

Para cada una de las 32 combinaciones de mutaciones en genes NRPS realizadas, se obtuvieron clonas múltiples, de las cuales se seleccionaron un promedio de 15 clonas. Las clonas seleccionadas al azar, se sometieron a ensayos de confrontación bacteriana, con el objetivo de preseleccionar clonas que mostraran fenotipos diferentes al fenotipo de la cepa silvestre PAO1. Los CDPs tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias (Martínez Carranza, tesis de Maestría, 2015), por lo que se realizaron ensayos de confrontación bacteriana para la preselección de clonas, utilizando dos variantes de la técnica de Spot on lawn (Martínez Carranza, tesis de Maestría 2015).

En el primer Spot on Lawn se utilizaron picaduras de las clonas seleccionadas y se observó la formación de halos de diversos tamaños (figura 32), con lo que se clasificaron en halos de inhibición baja, media y alta con respecto al tamaño del halo PAO1, donde la clasificación de inhibición media es similar al tamaño del halo formado por PAO1. El 86% de las clonas de cada una de las mutantes mostraron tener halos de inhibición alta, aunque también se observaron clonas con formación de inhibición media con 12% y solo un 2% de las clonas mostraron formación de halos de inhibición baja (Grafica 1). Con este ensayo se eligieron un total de ocho clonas representativas de los tres fenotipos; inhibición baja, media y alta, para cada tipo de combinación de genes NRPS mutados de *P. aeruginosa* PAO1.

Siguiendo con la selección de mutantes, mediante al análisis de sus fenotipos, se realizó un segundo Spot on Lawn por gota, en el que se controló la cantidad de inóculo de cada una de las clonas de las mutantes preseleccionadas con el Spot on Lawn por picadura. En este ensayo todas las cepas fueron crecidas hasta que alcanzaran una D.O. 600 de entre 0.4 y 0.7 de absorbancia y se llevaron a cabo diluciones para controlar la cantidad de inóculo (figura 33). De igual forma se midieron los halos formados por cada una de las clonas y se clasificaron en halos de inhibición baja, media y alta, donde la inhibición media es similar a la inhibición de PAO1. En este ensayo, el 47% las clonas probadas, mostraron un halo de inhibición alta, el 42% de las clonas mostraron halos de inhibición media y un 11% de las clonas mostraron un halo de inhibición baja (Grafica 2). De igual forma se redujo el número de clonas de cada combinación de genes mutados, seleccionando entre 2 y 4 clonas que representaran a los fenotipos identificados en este segundo ensayo de confrontación bacteriana; inhibición baja, media y alta.

Se ha reportado que dosis en escala de  $\mu\text{g/ml}$  de la mezcla los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 tienen actividad citotóxica en líneas celulares HeLa (Vázquez Rivera et al., 2014), provocando un cambio en la morfología celular y la formación de cuerpos apoptóticos indicativos de la vía de muerte celular. Por lo que fue de nuestro interés montar experimentos de viabilidad celular en HeLa, utilizando los sobrenadantes de las clonas seleccionadas de cada mutante que hasta esta etapa se seleccionaron mediante los ensayos de confrontación bacteriana.

Los sobrenadantes de las mutantes dobles empleados como tratamientos para los ensayos de viabilidad celular en HeLa, fueron obtenidos de cultivos de 40 horas de crecimiento y fueron filtrados para que estuvieran libres de células. Los tratamientos fueron aplicados durante un periodo de 12 horas, posteriormente se revisó el efecto en microscopio (Figura 34); donde se observó que los sobrenadantes de las mutantes dobles destruían la matriz celular al igual que lo hacen la mezcla de CDPs de PAO1 (figura 34b) modificando la morfología alargada que presenta HeLa normalmente (Figura 34a), mostrando morfologías redondas (Figura 34b y c), lo cual sugirió un posible efecto sobre la viabilidad.

Los ensayos de MTT arrojaron datos cuantitativos del efecto de los sobrenadantes de las mutantes dobles sobre la viabilidad celular de HeLa. Los sobrenadantes de las mutantes dobles, en general tuvieron un efecto menor sobre la viabilidad celular con porcentajes arriba del 80%, es decir que no se disminuyó la viabilidad celular al mismo nivel que con el sobrenadante de la cepa silvestre PAO1 donde la viabilidad celular disminuyo hasta un valor de 65% (Graficas 3-6).

De los sobrenadantes de las mutantes combinadas con *pchF::Gm* (Grafica 3), los sobrenadantes de las clonas 1, 2 y 4 de la combinación *ambB/pchF* mostraron tener efectos similares al efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 con la caída de la viabilidad celular hasta un 70%. En su mayoría los sobrenadantes de las clonas de las mutantes combinadas con *pchF::Gm* mostraron efectos menores sobre la viabilidad celular, mostrando valores mayores al 80% que es significativamente mayor al 65% de viabilidad que se observa con el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1.

Los sobrenadantes de las clonas seleccionadas de las mutantes combinadas con *pvdJ::Gm*, mostraron tener efectos menores al efecto del sobrenadante de PAO1 que disminuye la viabilidad de HeLa a un valor de 65% mostrando porcentajes mayores a 76%. En especial las clonas PA4078/*pvdJ*-1 y PA3327/*pvdJ*- 2 mostraron no afectar la viabilidad celular pues esta se mantuvo cercana al 100% (Grafica 4).

En los resultados de viabilidad celular de HeLa con los sobrenadantes de las clonas de mutantes combinadas con *pvdL::Gm*, de igual forma se observó que la mayoría de los tratamientos afectan menormente la viabilidad celular en comparación del efecto del sobrenadante de PAO1 que muestra un valor de 65%, mostrando valores mayores a 75%, donde los sobrenadantes de clonas *ambE/pvdL*-2, *pchE/pvdL*-2, *pvdJ/pvdL*-1 mostraron no afectar la viabilidad celular. Aunque el sobrenadante de PA3327/*pvdL*-1 disminuyo la viabilidad celular a un porcentaje similar al sobrenadante de PAO1 (Grafica 5).

En cuanto a los resultados de viabilidad celular de HeLa con los sobrenadantes de las clonas de mutantes combinadas con *pvdI::Gm*, se obtuvieron resultados en los que en general los sobrenadantes no afectaban la viabilidad celular al igual que el sobrenadante de PAO1 que disminuye la viabilidad de HeLa a 65%, observando valores mayores a 75%, donde 4078/*pvdI*-8 y 3327/*pvdI*-7 mostraron valores cercanos al 100% (Grafica 6).

Los resultados de viabilidad celular fueron útiles para realizar una selección final de las mutantes, con las que se trabajó en los experimentos posteriores. Como se puede apreciar se obtuvieron clonas con una misma combinación de genes mutados pero que sus sobrenadantes mostraron efectos diferentes sobre la viabilidad celular de HeLa, lo cual se puede explicar debido a la variación fenotípica que se obtiene cuando se usa la técnica de recombinación para realizar mutaciones.

Se seleccionaron las clonas que tuvieran efectos menores sobre la viabilidad celular, por mínimas que parecieran al compararse entre clonas de las mismas combinaciones de genes mutados, aunque también se seleccionaron algunas clonas como PA3327/*pvdL-1*, de las que su sobrenadante mostro efectos similares a *P. aeruginosa* PAO1; en el caso de que hubiese clonas con el mismo fenotipo se eligió una al azar y que fuera representativa de ese fenotipo, todo lo anterior permitió disminuir el número de mutantes a 37 (Tabla 11) y además con dichos resultados hasta el momento concluíamos que depende de las combinaciones de genes NRPS mutados de *P. aeruginosa* PAO1 para afectar el fenotipo de la cepa silvestre, alterando la producción de CDPs, pero para obtener los resultados contundentes sobre la producción de CDPs fue necesario realizar la extracción de los CDPs a cada una de las mutantes seleccionadas y comparar su producción contra la producción de *P. aeruginosa* PAO1.

La extracción de los CDPs de cada una de las mutantes, dio los resultados contundente en cuanto a las afectaciones de las mutaciones de genes NRPS sobre la producción de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1. Cada uno de los extractos fue analizado mediante HPLC, donde se identificaron picos en diferentes tiempos de retención correspondientes a cada uno de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1. Con el protocolo del presente trabajo (V.3.15 y V.3.16) se observaron picos en los tiempos 5.0 min, 5.4 min, y 8.1 min correspondientes a ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val), y ciclo(L-Pro-L-Phe) respectivamente (Figura 35), aunque actualmente se ha reportado que *P. aeruginosa* PAO1 produce un cuarto ciclodipéptido el cual es ciclo(L-Pro-L-Leu); (González- López et al., 2016), en el presente proyecto se analizaron los tres ciclodipéptidos que inicialmente se habían reportado para *P. aeruginosa* PAO1.

Para la cuantificación de cada ciclodipéptido, cada una de las mutantes se comparó contra la producción de *P. aeruginosa* PAO1, cuantificándose en base al área bajo la curva de cada pico y comparándose con respecto al área de *P. aeruginosa* PAO1. Los resultados mostraron fenotipos muy variados; para ciclo(L-Pro-L-Tyr) en el tiempo de retención 5.0 min. La mayoría de las mutantes presento producción similar a la de *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo se obtuvieron resultados en los que algunas mutantes disminuyeron drásticamente la producción a menos del 50% e incluso por debajo del 20% con respecto a la producción de *P. aeruginosa* PAO1, tales como: *ambB/pvdI-7* y *pchE/pvdL-2*; aunque también se obtuvieron resultados en los que hubo sobreproducción de ciclo(L-Pro-L-Tyr), donde la producción se incrementó hasta un 88% más que la producción de *P. aeruginosa* PAO1, dieciséis de las mutantes mostraron incremento significativo y de estas solo cuatro mutantes presentaron porcentajes arriba de 150% las cuales son: *ambE/pvdJ-1*, *ambB/pchF-4*, *pvdI/pchF-7* y *ambE/pchF-1* (Grafica 7).

La cuantificación de ciclo(L-Pro-L-Val) en el tiempo de retención 5.4 min de las diferentes mutantes dobles en genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1 mostro también fenotipos variados. Para este ciclodipéptido se observó que la mayoría de las mutantes disminuyo la producción con respecto a la producción de *P. aeruginosa* PAO1, se observaron porcentajes menores a 65% o menos de la producción normal para este ciclodipéptido de *P. aeruginosa* PAO1; tal es el caso de las mutantes: *pvdI/pchF-1*, PA3327/*pchF-4*, *ambB/pchF-6*, *pvdI/pchF-7*, PA4078/*pvdI-7*, *pchE/pvdI-7*, algunas con porcentajes menores de 50% como; *ambB/pvdL-1*, PA3327/*pchF-5*, *pvdI/pvdJ-1* y *pchE/pvdL-2* e incluso algunas mutantes mostraron porcentajes por debajo de 25% como las mutantes: *ambB/pvdI-7*, PA3327/*pvdI-7* y *pvdI/pchF-7*. Aunque también se obtuvieron resultados en los que se presentó sobreproducción de ciclo(L-Pro-L-Val), donde se observaron aumentos hasta en un 92% respecto de la producción de *P. aeruginosa* PAO1, ocho de las mutantes mostraron aumentos significativos y de estas, cuatro sobrepasaron valores de 150% de producción, tal es el caso de las mutantes *ambE/pchF-1*, PA3327/*pvdL-1*, PA4078/*pvdL-2* y *ambE/pvdL-2* (Grafica 8).

Finalmente en la cuantificación de ciclo(L-Pro-L-Phe) presente en el tiempo de retención 8.1 min de las diferentes mutantes dobles en genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1 se obtuvieron resultados en los que se observan fenotipos variados. La mayoría de las mutantes mantuvieron la producción de este ciclodipéptido con valores arriba del 80% o porcentajes un poco mayores del porcentaje normal de *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo se obtuvieron resultados en los que seis mutantes disminuyeron la producción mostrando porcentajes menores a 60% de las cuales *ambE/pvdI-4*, *pchF/pvdI-8*, dos mutantes mostraron porcentajes menores a 50%; *pchE/pvdL-2* y *pchE/pvdI-7* e inclusive dos mutantes mostraron porcentajes mejores a 20%; PA4078/*pvdI-7*, *ambB/pvdI-7*. Aunque también se obtuvieron resultados en los que siete mutantes mostraron aumento significativo en la producción de ciclo(L-Pro-L-Phe) con respecto de la producción normal reportada para *P. aeruginosa* PAO1; donde las mutantes PA4078/*pchF-7*, *pvdI/pvdL-1*, *ambB/pchF-1* y *pchE/pchF-4* mostraron porcentajes arriba de 130% teniendo un incremento de hasta 49% respecto de la producción normal de PAO1 (Grafica 9).

Dados los resultados obtenidos se observó que depende de la combinación de genes mutados para que se modifique el fenotipo original de *P. aeruginosa* PAO1. Un análisis en conjunto de los datos obtenidos, utilizando escala arbitraria de colores para clasificar los porcentajes de producción de CDPs, permitió detectar dos mutantes que disminuyeron la producción de los tres ciclodipéptidos de manera significativa con valores menores del 50%; *ambB/pvdI-7* y *pchE/pvdL-2* respecto de la producción normal de PAO1. Y además se detectaron tres mutantes que aumentaron la producción de los tres ciclodipéptidos de manera significativa a porcentajes cercanos o mayores a 150%, las cuales son *ambE/pchF-1*, PA3327/*pvdL-1* y PA4078/*pvdL-2* (Figura 36 a y b).

Adicionalmente se pudo observar que en general con la combinación de mutaciones de genes NRPS, la producción de ciclo(L-Pro-L-Val) disminuyó en la mayoría de los casos, pero la producción de ciclo(L-Pro-L-Tyr) en general aumento, mientras que la producción de ciclo(L-Pro-L-Phe) se mantuvo similar a PAO1 en la mayoría de las mutantes (Figura 36 c).

Graficando los datos de producción de ciclodipéptidos de cada una de las mutantes de la figura 36a, versus el efecto del sobrenadante de cada una de esas mutantes sobre la viabilidad de HeLa, se observó que existe una tendencia en la que a mayor concentración o producción de ciclodipéptidos, menor será la viabilidad celular, refrendando que el efecto de los CDPs sobre células HeLa es dependiente de la dosis (Grafica 10).

Finalmente un análisis de correlación mostro que las combinaciones de mutaciones en los genes NRPS de *P. aeruginosa* PAO1 produjeron una gran variación fenotípica en la que la presencia de los ciclodipéptidos reportados para *P. aeruginosa* PAO1, dependia de la combinación de genes mutados. En general se obtuvieron mutantes con producción similar o mayor a la producción de PAO1 para ciertos ciclodipéptidos pero menor para otro u otros, mientras que sólo dos mutantes identificadas con los nombres abreviados hE/L-2 y B/2-7 correspondientes a *pchE/pvdL-2* y *ambB/pvdI-7*, respectivamente, mostraron una disminución de los tres CDPs de *P. aeruginosa* PAO1, pues los círculos azules que las representan se encuentran alejados de los cuadros rojos que representan a cada uno de los ciclodipéptidos; es decir que en este análisis, mientras más alejado este un círculo (color azul) de alguno de los cuadros etiquetados con el nombre de alguno de los ciclodipéptidos (color rojo), menos producción presentará esta mutantes para ese ciclodipéptido (Grafica 11).

Ademas análisis de correlación, permitió identificar cual de los ciclodipéptidos analizados afecta más a la viabilidad de celulas HeLa, donde de igual forma mientras más cercano este un cuadro rojo correspondiente a alguno de los ciclodipéptidos al cuadro rojo correspondiente a viabilidad celular, mayor será la participación de este ciclodipéptido en el efecto de disminución de la viabilidad celular y viceversa; lo mismo sucedería al relacionar el cuadro de viabilidad celular con los círculos azules correspondientes a cada una de las mutantes dobles. Dados los resultados del análisis de correlación, se observa que los ciclodipéptidos más relacionados sobre la disminución de la viabilidad celular son ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Phe), mientras que el menos relacionado con la viabilidad celular es ciclo(L-Pro-L-Val) y en cuanto a la relación de la producción de CDPs de las mutantes para con la viabilidad celular de HeLa, las que muestran que su producción de ciclodipeptidos no afecto la viabilidad de HeLa son las mutantes *ambB/pvdI-7* (B/2-7) y *pchE/pvdL-2* (hE/L-2); (Grafica 11), lo cual se entiende que estas dos mutantes tienen una baja producción de CDPs, cumpliendo la tendencia que indica que a mayor concentración de CDPs, menor viabilidad celular y viceversa (Grafica 10).

## VIII. CONCLUSIÓN

Las combinaciones de genes NRPS *ambB/pvdI* y *pchE/pvdL* afectaron principalmente la síntesis de ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, demostrando la existencia de redundancia génica.

## IX. REFERENCIAS.

1. Atkinson, S., & Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090203.
2. Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular microbiology*, 59(4), 1114-1128.
3. Kirisits, M. J., & Parsek, M. R. (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cellular microbiology*, 8(12), 1841-1849.
4. Ankenbauer R., Hanne L. F. y Cox C. D. 1986. Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdinin production. *J Bacteriol.* 167(1): 7-11.
5. Balasubramanian D., Schneper L., Kumari H. y Mathee K. 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41(1): 1-20.
6. Belin, P., Moutiez, M., Lautru, S., Seguin, J., Pernodet, J. L., & Gondry, M. (2012). The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Natural product reports*, 29(9), 961-979.
7. BRAUNS, S. C., MILNE, P., NAUDÉ, R., & VAN DE VENTER, M. A. R. Y. N. A. (2004). Selected cyclic dipeptides inhibit cancer cell growth and induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Anticancer research*, 24(3A), 1713-1720.
8. Bovey, F. A., Brewster, A. I., Patel, D. J., Tonelli, A. E., & Torchia, D. A. (1972). Determination of the solution conformations of cyclic polypeptides. *Accounts of Chemical Research*, 5(6), 193-200.
9. Cornelis P. y Dingemans J. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 75.
10. Castro, R. O., García, J. C., & Bucio, J. L. (2012). Comunicación planta-bacteria basada en ciclodipéptidos de origen microbiano con actividad auxínica. *Ciencia Nicolaita*, (56), 59-74.
11. Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C., & Greenberg, E. P. (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(5), 2752-2757.
12. De Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and immunity*, 68(9), 4839-4849.
13. Feinbaum, R. L., Urbach, J. M., Liberati, N. T., Djonovic, S., Adonizio, A., Carvunis, A. R., & Ausubel, F. M. (2012). Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS Pathog*, 8(7), e1002813.

14. Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular microbiology*, 26(2), 251-259.
15. Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C. & Masson, C. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nature chemical biology*, 5(6), 414-420.
16. Gu, B., He, S., Yan, X., & Zhang, L. (2013). Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(19), 8439-8453.
17. González, J. E., & Keshavan, N. D. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 859-875.
18. González, O., Ortíz-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.
19. Gould, T. A., Schweizer, H. P., & Churchill, M. E. (2004). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Molecular microbiology*, 53(4), 1135-1146.
20. Grünewald, J., & Marahiel, M. A. (2006). Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 121-146.
21. Hashimoto, S. I. (2006). Occurrence, biosynthesis, and biotechnological production of dipeptides. In *Amino Acid Biosynthesis~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering* (pp. 327-348). Springer Berlin Heidelberg.
22. Huang J. J., Han J. I., Zhang L. H. y Leadbetter, J. R. 2003. Utilization of acylhomoserine lactone quorum signals for growth by a soil *pseudomonad* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 69(10): 5941-5949.
23. Hunter, R. C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B. L., Samad, T., Malfroot, A., ... & Newman, D. K. (2013). Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *MBio*, 4(4), e00557-13.
24. Hur, G. H., Vickery, C. R., & Burkart, M. D. (2012). Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Natural product reports*, 29(10), 1074-1098.
25. Jayaseelan S., Ramaswamy D. y Dharmaraj S. 2013. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol.*
26. Juhas M., Eberl L. y Tummel B. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol.* 7(4): 459-471.
27. Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during

- normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of bacteriology*, 177(14), 3998-4008.
28. Karatuna, O., & Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(12), 1770-1775.
  29. Khokhlov, A. S., & Lokshin, G. B. (1963). The structure of albonoursin. *Tetrahedron Letters*, 4(27), 1881-1885.
  30. Lautru, S., Gondry, M., Genet, R., & Pernodet, J. L. (2002). The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology*, 9(12), 1355-1364.
  31. Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26-41.
  32. Lintz, M. J., Oinuma, K. I., Wysoczynski, C. L., Greenberg, E. P., & Churchill, M. E. (2011). Crystal structure of QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 15763-15768.
  33. Meyer J. M., Neely A., Stintzi A., Georges C. y Holder, I. A. 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 64(2): 518-523.
  34. Merino, L. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: una bacteria con personalidades múltiples. *Revista argentina de microbiología*, 39(3), 143-143.
  35. Moutiez, M., Seguin, J., Fonvielle, M., Belin, P., Jacques, I. B., Favry, E., & Gondry, M. (2014). Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from *Streptomyces noursei*. *Nucleic acids research*, 42(11), 7247-7258.
  36. Munekata, M., & Tamura, G. (1981). Selective inhibition of SV40-transformed cell growth by diketopiperazines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2613-2618.
  37. Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), 496.
  38. Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43, 197-222.
  39. Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., Rosa, 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.
  40. Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11229-11234.

41. Pesci E. C., Pearson J. P., Seed P. C. e Iglewski B. H. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 179(10): 3127-3132.
42. Prasad, C. (1995). Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 16(1), 151-164.
43. Schuster M. y Greenberg E. P. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol.* 296(2-3): 73-81.
44. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J. & Garber, R. L. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964.
45. Thajudeen, H., Park, K., Moon, S. S., & Hong, I. S. (2010). An efficient green synthesis of proline-based cyclic dipeptides under water-mediated catalyst-free conditions. *Tetrahedron Letters*, 51(9), 1303-1305.
46. Vázquez-Rivera, D., González, O., Guzmán-Rodríguez, J., Díaz-Pérez, A. L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2015). Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. *BioMed research international*, 2015.
47. Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., ... & Fang, R. X. (2004). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular microbiology*, 51(3), 903-912.
48. Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 319-346.
49. Wyatt, M. A., Wang, W., Roux, C. M., Beasley, F. C., Heinrichs, D. E., Dunman, P. M., & Magarvey, N. A. (2010). *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. *Science*, 329(5989), 294-296.