

**MEJORAMIENTO GENÉTICO POR “ERROR PRONE PCR” DEL GEN *aiiA* QUE
CODIFICA PARA N- ACÍL HOMOSERINA LACTONASA DE *Bacillus*
*thuringiensis***

NOHORA JULIANA RUEDA FORERO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2016

**MEJORAMIENTO GENÉTICO POR “ERROR PRONE PCR” DEL GEN *aiiA* QUE
CODIFICA PARA N- ACÍL HOMOSERINA LACTONASA DE *Bacillus*
*thuringiensis***

NOHORA JULIANA RUEDA FORERO

Trabajo de grado para optar al título de
MAGÍSTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Director

ÁLVARO MAURICIO FLÓREZ ESCOBAR

PhD. Ciencias Básicas Biomédicas

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2016

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han apoyado el desarrollo de esta etapa. Gracias por sus consejos, por su apoyo y acompañamiento durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Santander, UDES, Por darme las herramientas y conocimientos que me hacen la Microbióloga Industrial que soy.

A la Universidad Industrial de Santander, por acompañarme a profundizar en el camino de la investigación.

A Álvaro Mauricio Flórez Escobar, PhD., por guiarme durante tantos años y por compartir su experiencia y conocimiento conmigo; gracias por traerme hasta este punto.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS por financiar la ejecución este proyecto (Código 134440520338)

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN.....	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MARCO TEÓRICO	22
4.1. <i>QUORUM SENSING</i>	22
4.2. SISTEMAS DE INHIBICIÓN DE QS	27
4.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA	37
5. MATERIALES Y METODOS.....	44
5.1. RESUMEN DE CEPAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS	44
5.2. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	45
5.3. <i>ERROR PRONE PCR</i>	46
5.4. ENSAYOS DE ATENUACIÓN DE LA INFECCIÓN EN PAPA.	49
5.5.ANÁLISIS CUALITATIVO DE AHL-LACTONASA DE LA VARIANTE 852 ..	51
5.5.2 Determinación del efecto de la temperatura de la variante 852.	52
5.6. CUANTIFICACIÓN BIOLÓGICA DE 852 POR (HPLC-MS)	53
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	56

5.8. IMPLICACIONES ÉTICAS	56
6. RESULTADOS	57
6.1. MUTAGÉNESIS POR <i>EP-PCR</i>	57
6.2. TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD LACTONASA PARA LAS VARIANTES.....	67
6.3. ENSAYOS DE ATENUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>PC</i> EN PAPA.	68
6.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA VARIANTE 852.	70
6.5. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE 852 POR HPLC-MS.	73
6.5.5 Cinética y especificidad de la variante 852	81
7. DISCUSIÓN.....	83
8. CONCLUSIONES	88
9. RECOMENDACIONES.....	89
10. DIVULGACIONES	90
BIBLIOGRAFIA.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidad de las señales de QS ejemplificada en diferentes clados bacterianos.....	23
Figura 2. Esquema general de las señales de comunicación N- acil Homoserina Lactona (AHLs).....	24
Figura 3. Esquema general del sistema QS para Bacterias Gram negativas.	27
Figura 4. Posibles modos de degradación enzimática de AHLs. L.....	29
Figura 5: Hidrólisis del anillo lactona producida por acción de lactonasa.	31
Figura 6. Modelo de la lactonasa AiiA de <i>Bt subs kurstaki</i>	33
Figura 7. Diagrama de Boston de las diferentes estrategias para la obtención de librerías de variantes por ED	38
Figura 8. Visualización del inserto <i>aiiA</i> del constructo pColdIV- <i>aiiA</i> de <i>Bt</i>	57
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa productos de amplificación por Error Prone PCR de <i>aiiA</i> de <i>Bt</i> ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	58
Figura 10: Constructos obtenidos por clonación a partir de los amplificados obtenidos por <i>Error Prone PCR</i>	59
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para las restricciones <i>XbaI/NdeI</i> de las variantes tamizadas.....	60
Figura 12: Alineamiento entre las secuencias del gen <i>aiiA</i> <i>Bt</i> y cada una de las variantes seleccionadas.....	64
Figura 13. Alineamiento entre las secuencias de la lactonasa AiiA de <i>Bt</i> ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ y cada una de las variantes seleccionadas.....	66
Figura 14: Ensayos de atenuación de la infección producida por <i>Pc</i> en rodajas de papa.	68
Figura 15. Ensayos de atenuación de la pudrición blanda producida por <i>Pc</i> en papa, por las variantes 851,852, 944, 947 y Nativa como control.	68
Figura 16. Atenuación de la variante Epp852 sobre los tumores generados por <i>A. tumefaciens</i> C58 y 15955	69
Figura 17: Curva estándar para la determinación de la concentración de la enzima lactonasa Epp852 por Bradfordy SDS PAGE teñido con azul de Comassie.	70

Figura 18. Actividad catalítica indirecta de la lactonasa 852 purificada.	71
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la lactonasa 852	72
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad de la lactonasa 852	73
Figura 21: Cromatograma para C8-HSL con el tiempo de retención en minutos..	75
Figura 22. Cromatograma para C6-Oxo-HSL, con su tiempo de retención en minutos.....	76
Figura 23. Cromatograma para C12-Oxo-HSL y tiempo de retención en minutos.	77
Figura 24. Espectro de Masas HPLC-MS de C8-HSL..	78
Figura 25. Espectro de Masas HPLC-MS de C6-Oxo-HSL. Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 4.36 minutos..	78
Figura 26. Espectro de Masas HPLC-MS de C12- Oxo- HSL. Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 6.1 minutos.....	79
Figura 27. Determinación de la estabilidad térmica de lactonasa 852..	80
Figura 28. Efecto del pH en la actividad de la lactonasa 852..	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Algunos sistemas de comunicación QS utilizados por algunas bacterias Gram negativas y sus fenotipos asociados.	25
Tabla 2: Algunas enzimas QQ identificadas.	30
Tabla 3. Algunas Lactonasas descritas en la literatura y sus propiedades catalíticas.....	35
Tabla 4: Mejoramiento genético de diversas enzimas obtenido por Error prone PCR.....	40
Tabla 5. Resumen de cepas, plásmidos y constructos utilizados en este estudio.	44
Tabla 6: Protocolos de <i>Error PronePCR</i> utilizados para amplificar el gen <i>aiiA</i> de <i>Bt₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆</i>	47
Tabla 7: Condiciones HPLC-MS para cuantificación de AHLs.....	54
Tabla 8: Porcentajes de identidad obtenidos en el NCBI, utilizando la herramienta BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para cada una de las variantes secuenciadas.....	61
Tabla 9: Descripción detallada del tipo de mutaciones encontradas en cada uno de las variantes analizadas.....	62
Tabla 10: Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de cada uno de las variantes tamizadas.	65
Tabla 11: Determinación cualitativa de la actividad catalítica de las variantes frente a señales AHLs en presencia de biosensores	67
Tabla 12: Espectro de Iones detectado para cada una de las AHLs analizadas....	74
Tabla 13. Parámetros cinéticos de la lactonasa 852 para C8-HSL y C6-Oxo-HSL	82

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACP	Proteína transportadora acilo acetilada
AHL	N- acíl Homoserina Lactona
BOC-HSL	Butiloxi carbonil-HSL
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C12-Oxo-HSL	3-Oxo-Dodecanoil-L- Homoserina Lactona
C4-HSL	N-butiril-L- Homoserina Lactona
C6-HSL	N-hexanoil-L- Homoserina Lactona
C6-Oxo-HSL	Oxo-Hexanoil-L-Homoserina Lactona
C8-HSL	N-octanoil-L- Homoserina Lactona
C8-Oxo-HSL	N-3-oxo-octanoil-L-Homoserina lactona
CBZ-HSL	Benziloxycarbonil-HSL
CV026	<i>Chromobacterium violaceum</i> Cepa 026
ED	Evolución dirigida
EDTA	Ácido Etilendiamintotetraacético
Ep-PCR	RCP propensa a error- " <i>Error Prone PCR</i> "
GBL	Butirolactona
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas
HSL	Homoserina lactona
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
MOD-PCR	Amplificación mutagénica oligonucleotídica dirigida
NTL4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4
OE-PCR	Extensión de PCR por superposición
PBS	Búfer fosfato salino
<i>Pc</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
QQ	<i>Quorum Quenching</i>

QS	<i>Quorum Sensing</i>
SAM	S-adenosina metionina
SDM	Mutagénesis por saturación de secuencias Electroforesis en gel de poliacrilamida con
SDS-PAGE	dodecilsulfato sódico
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

TITULO: MEJORAMIENTO GENÉTICO POR “ERROR PRONE PCR” DEL GEN *aiiA* QUE CODIFICA PARA N- ACÍL HOMOSERINA LACTONASA DE *Bacillus thuringiensis*.*

AUTOR: NOHORA JULIANA RUEDA FORERO**

PALABRAS CLAVE: Lactonasa, *Bacillus thuringiensis*, Error Prone PCR, Quórum Quenching,

DESCRIPCIÓN:

Las enzimas lactonasas degradan señales *Quorum Sensing* por medio de la hidrólisis mediante un fenómeno conocido como *Quorum Quenching*. Este trabajo se propuso mejorar la propiedades catalíticas de la enzima lactonasa AiiA de *Bacillus thuringiensis*¹⁴⁷⁻¹¹⁵⁻¹⁶, introduciendo mutaciones aleatorias en el gen *aiiA* mediante *Error Prone PCR*. Producto de la mutagénesis se seleccionaron 10 variantes con actividad frente los biosensores CV026 y NTL4. Las variantes mostraron homología con respecto al gen parental. Las mutaciones ocurrieron en su mayoría en el extremo carboxi terminal y la tasa de mutaciones fue de 0,020. De las 10 variantes, se seleccionaron 4 de las cuales, la 852 mostró la mejor actividad para C6-HSL, C8-HSL, C6-Oxo-HSL y una actividad reducida pero detectable frente a C12-Oxo-HSL. Los ensayos de HPLC-MS con la proteína purificada mostraron una actividad catalítica de 0.9 mmol/min⁻¹/mg⁻¹ para C8-HSL, seguida por C6-oxo-HSL (0,8 mmol/min⁻¹/mg⁻¹). Así mismo, presentó actividad catalítica entre 20°C y 70°C y entre pH 4 y 8. El *K_m* para C8-HSL fue de 12,6 mM y para C6-Oxo-HSL de 4,83 mM. La variante exhibió 3,3 veces menor afinidad con C8-HSL que la nativa (*K_m*= 3,81) pero el índice de especificidad aumentó 4,2 x 10⁶ veces. Esta variante mostró una región mutada 240-KRVVECSRNIY-250 y una adición S²⁵¹. Además, mostró la capacidad de atenuar la infección producida por *Pectobacterium carotovorum* en papa y por *A. tumefaciens* en zanahoria. Los resultados obtenidos demuestran que por las características que presentó la variante 852 con respecto a la nativa, es una enzima promisoría para aplicaciones en nanobiotecnología para el control de señales QS tipo C8-HSL y C6-Oxo-HSL.

*Trabajo de Grado

**Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Álvaro Mauricio Flórez Escobar PhD Ciencias Básicas Biomédicas

ABSTRACT

TITLE: GENETIC IMPROVEMENT BY “ERROR PRONE PCR” OF *aiiA* GENE ENCODING N-ACYL HOMOSERINE LACTONASE FROM *Bacillus thuringiensis**

AUTHOR: NOHORA JULIANA RUEDA FORERO**

KEY WORDS: Lactonase, *Bacillus thuringiensis*, Error Prone PCR, Quorum Quenching

DESCRIPTION:

Lactonases are capable of degrading *Quorum Sensing* signals through hydrolysis by a phenomenon called *Quorum Quenching*. This work aimed to improve the catalytic properties of the lactonase enzyme AiiA from *Bacillus thuringiensis*¹⁴⁷⁻¹¹⁵⁻¹⁶, by introducing random mutations into the gene *aiiA* by *Error Prone PCR*. Product of the mutagenesis, we selected 10 variants with activity by using CV026 and NTL4 as biosensors. These variants showed homology to the parental gene and the mutations occurred mostly at the C-terminal. The mutation rate was of 0,020. From the 10 variants, we selected four and from these, variant 852 exhibited the best activity for C6-HSL, C8-HSL, C6-Oxo-HSL and low but detectable activity against C12-Oxo-HSL. The HPLC-MS assays with the purified protein showed a catalytic activity of 0,9 mmol/min⁻¹/mg⁻¹ to C8-HSL, followed by C6-oxo-HSL (0,8 mmol/min⁻¹/mg⁻¹). In addition, the catalytic activity between 20°C and 70°C and pH between 4 and 8 were also measured. The *Km* for C8-HSL was 12,6 mM and for C6-Oxo-HSL was 4,83 mM. The variant exhibited 3,3-fold lower affinity with C8-HSL than the native did (*Km* = 3,81) but the specificity index increased 4,2 x 10⁶ fold. This variant showed a ²⁴⁰KRVVECSRNIY⁻²⁵⁰ mutated region and an insertion of S²⁵¹. It also showed the ability to attenuate infection produced by *Pectobacterium carotovorum* in potato and *Agrobacterium tumefaciens* in carrot. The results showed that due to the characteristics of variant 852 with respect to the native, it is a promising enzyme for further applications in nanobiotechnology to control QS signals such as C8-HSL and C6-Oxo-HSL.

*Master's Thesis

**Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Álvaro Mauricio Flórez Escobar PhD Ciencias Básicas Biomédicas

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son capaces de ajustar sus fenotipos a las condiciones del ambiente coordinados por un sistema de comunicación dependiente de la densidad poblacional conocido como *Quorum Sensing* (QS). Este sistema modula las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-huésped (Grandclement, Tannieres et al. 2015) y así mismo, regula la expresión génica de factores que promueven la invasión, defensa y diseminación en bacterias patógenas (LaSarre and Federle 2013). También está involucrado en la producción de metabolitos secundarios, transferencia de plásmidos, motilidad y formación de biopelículas (Chan, Atkinson et al. 2011, Kalia 2013). El sistema QS posee un mecanismo compuesto por producción, acumulación y detección de señales que en bacterias Gram negativas se conocen como Acil-Homoserina Lactonas (AHLs) y en bacterias Gram positivas, como autoinductores de QS (LaSarre and Federle 2013).

De igual modo, los microorganismos han desarrollado un mecanismo que elimina las señales de QS conocido como *Quorum Quenching* (QQ) y que promueve el reciclaje de señales y una relación competitiva con otros (Grandclement, Tannieres et al. 2015). Se han identificado diversos mecanismos de QQ. Uno de estos ocurre mediante la acción de enzimas microbianas que hidrolizan las moléculas de señal (Chan, Atkinson et al. 2011), impidiendo su acumulación y modificando la dinámica de la población microbiana, alterando la expresión génica asociada a QS (LaSarre and Federle 2013). Hasta el momento se han identificado tres enzimas con capacidad de degradar señales de QS, Las lactonasa que hidrolizan el anillo lactona, las acilasas que separan el anillo lactona de la cadena lateral y las oxido-reductasas que modifican la cadena lateral de la señal (Kalia 2013).

Dentro de las acilasas se han descrito: PvdQ (Bokhove, Nadal Jimenez et al. 2010), QuiP (Huang, Petersen et al. 2006), AiiD (Lin, Xu et al. 2003) y AaC (Chen, Chen et al. 2009). Estas enzimas presentan especificidad de sustrato basada en la longitud de la cadena lateral y las sustituciones en el carbono 3. Sin embargo, son diversas y solo comparten un 36% de identidad entre su secuencia de aminoácidos (Kalia 2013). Entre las lactonasas se han descrito: AiiB (Liu, Thomas et al. 2007), AttM (Haudecoeur, Tannieres et al. 2009), AhID (Park, Lee et al. 2003) y aiiA (Dong, Gusti et al. 2002). Esta última fue identificada en *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) y más adelante fue descrita en diferentes especies de *Bacillus* (Dong, Gusti et al. 2002, Lee, Park et al. 2002). Estas enzimas comparten un 90% de identidad a nivel peptídico y su especificidad es amplia considerando que el anillo lactona es altamente conservado entre las AHLs (Liu, Momb et al. 2008). Se ha demostrado que las lactonasas pueden atenuar infecciones producidas por microorganismos dependientes de QS como *Pseudomonas aeruginosa* en modelos murinos (Gupta, Chhibber et al. 2015) y en plantas, se ha demostrado su efectividad en el control de fitopatógenos dependientes de QS (Helman and Chernin 2015).

Estudios previos de una lactonasa de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ proveniente del filoplano colombiano mostró una mayor afinidad a lactonas de 6 y 8 carbonos: N-octanoil-L-Homoserina Lactona (C8-HSL) y N-hexanoil-L-Homoserina Lactona (C6-HSL), pero una baja eficacia y constante catalítica (Florez et al. 2014; Pedroza, Florez et al. 2014). Así mismo, esta enzima además de mostrar la capacidad de atenuar la infección producida por *Pcen* papa (*Solanum tuberosum*), presenta una actividad catalítica a pH alcalino (8.0) y a altas temperaturas (47% de hidrólisis del sustrato a 60°C). Su funcionalidad disminuye por la acción de iones metálicos en especial por Cu²⁺ y Al³⁺ más no por el efecto de agentes quelantes como EDTA (Pedroza, Florez et al. 2014). Por estas características se propuso esta proteína como una enzima promisorio para aplicación biotecnológica en sistemas adversos. Las lactonasas y en particular AiiA producida por *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ tiene actividad a pHs iguales o superiores a 6. La especificidad de sustrato está orientada por lo general a AHLs de cadenas cortas y sin modificaciones tipo oxo (Wang, Weng et al. 2004,

Florez, Gonzalez et al. 2014, Pedroza, Florez et al. 2014) y si bien su afinidad al sustrato (C6-HSL y C8-HSL) es alta, el índice de especificidad es bajo lo cual hace que sea difícil su reutilización en sistemas aplicados.

Estudios recientes han empleado técnicas de evolución dirigida para el mejoramiento genético de las lactonasas con la finalidad de aumentar la actividad catalítica en condiciones de pH y temperatura específicos, así como ampliar la especificidad del sustrato (Chow, Xue et al. 2010, Yang, Xie et al. 2014). Entre estas técnicas se ha descrito *Error Prone PCR (Ep-PCR)* que permite introducir mutaciones de manera aleatoria y por medio de un tamizaje, seleccionar variantes con las características deseadas (McCullum, Williams et al. 2010). Mediante este método se ha comprobado la obtención de proteínas con propiedades bioquímicas y actividad catalítica mejorada (Balci, Ozturk et al. 2014, Copp, Hanson-Manful et al. 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, con el fin de aumentar su potencial biotecnológico, este trabajo se propuso obtener variantes mejoradas de la enzima AiiA de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆, por medio de *Ep-PCR*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos han demostrado que el aislamiento *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ proveniente del filoplano colombiano tiene la capacidad de atenuar la infección producida por *Pc* y que tiene actividad lactonasa contra lactonas tipo C8-HSL y C6-HSL (Florez, Gonzalez et al. 2014). Así mismo, al expresar el gen *aiiA* de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ en un modelo recombinante, también mostró actividad frente a otros tipos de lactonas como: Oxo-Hexanoil-L-Homoserina Lactona (C6-Oxo-HSL) y 3-Oxo-Dodecanoil-L- Homoserina Lactona (C12-Oxo-HSL) (Pedroza, Florez et al. 2014).

La enzima recombinante *AiiA*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ tiene actividad catalítica para N-butil-L-Homoserina Lactona (C4-HSL) (190.3%), C6-HSL (100%), Heptanoil-L- Homoserina Lactona (C7-HSL) (73.7%) y C8-HSL (457.6%). Así mismo, es termoestable a 60°C, posee actividad entre pH 6.0 y 9.0. Su actividad se ve inhibida por la presencia de dos iones metálicos, Al³⁺ y Cu²⁺ (Pedroza, Florez et al. 2014). No obstante lo anterior, la enzima *AiiA*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ presenta limitaciones de especificidad de sustrato, favoreciendo la hidrólisis de lactonas con cadenas laterales cortas (6 y 8 carbonos) y sin modificaciones oxo. A su vez, la actividad se reduce a medida que disminuye el pH, siendo el mínimo detectable de pH 5 y presentando una baja eficiencia catalítica (Pedroza, Florez et al. 2014). Estas limitantes pueden afectar las aplicaciones biotecnológicas de esta enzima y en especial para procesos de (nano) encapsulados. Debido a lo anterior, este trabajo se propone responder si es posible la obtención de variantes de *AiiA*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ mediante *Ep-PCR* que puedan tener propiedades para catalizar reacciones más eficientes aún en condiciones adversas que pudiesen tener aplicación en la nanobiotecnología.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la comunicación bacteriana QS juega un papel importante en la regulación de funciones fisiológicas relacionadas con la patogenicidad en especies que afectan a plantas, animales y humanos (Helman and Chernin 2015, Wu, Moser et al. 2015), existe el interés científico en el desarrollo de estrategias dirigidas a la inactivación de los sistemas de QS. La importancia radica en hallar formas de interferencia contra estas señales en bacterias patógenas y en consecuencia, utilizarlas para combatir infecciones no solo en la salud humana sino en la agricultura, en cuyo caso tendrían un impacto importante no solo para combatir la resistencia antibiótica sino como complemento a las terapias que se emplean actualmente. Es por esto, que este estudio adquiere una relevancia importante pues pretende generar conocimiento sobre mejoramiento genético de lactonasas que pueda impactar en la demanda de mercados agrícolas debido al crecimiento de la población mundial, así mismo, en los servicios de salud que deben proveer tratamientos efectivos contra infecciones donde hay evidencia de resistencia y multiresistencia antibiótica. Esto último constituye una amenaza para la salud y para las cadenas de producción agropecuaria (LaSarre and Federle 2013). Esta alternativa de interrumpir señales QS no afectan directamente a la supervivencia del patógeno, sino la expresión de los factores de virulencia, no ejerce presión selectiva por tanto, evita la aparición de resistencia. En consecuencia, este trabajo es una aproximación a la necesidad por descubrir nuevas formas de combatir las infecciones basados en sistemas QQ.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener variantes mejoradas a partir del gen *aiiA* que codifica para AHL- lactonasa de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inducir mutaciones al gen *aiiA* mediante “*Error Prone PCR*.”
- Determinar cualitativamente la actividad lactonasa de las variantes obtenidas.
- Identificar las mutaciones producidas en las variantes seleccionadas con mejor actividad.
- Caracterizar al menos una variante con la mayor actividad catalítica.

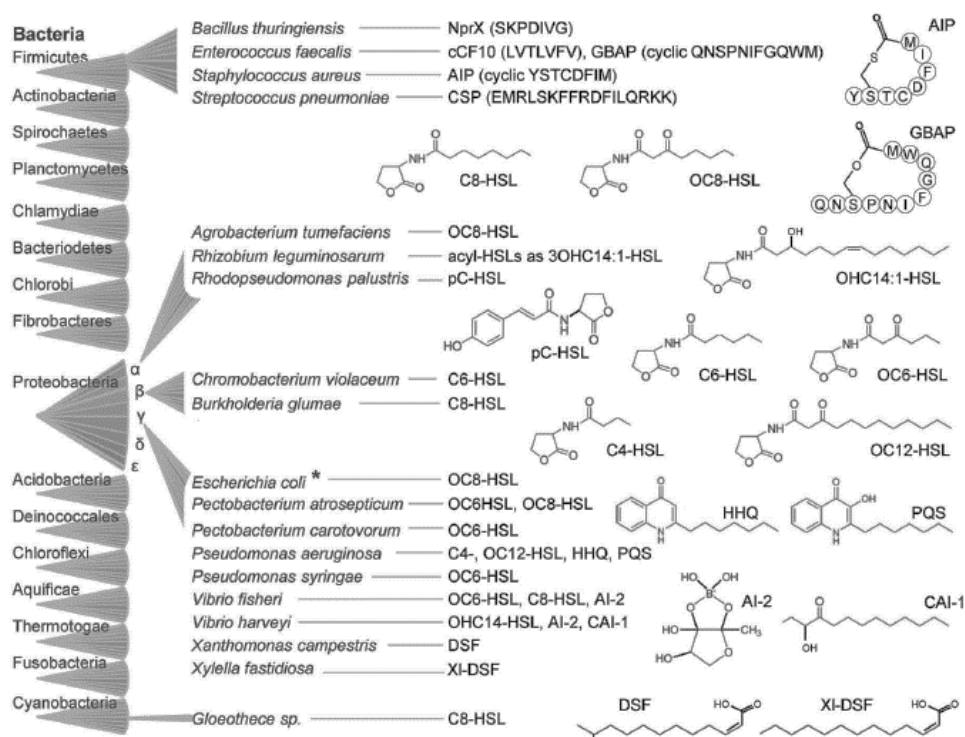
4. MARCO TEÓRICO

4.1 QUORUM SENSING

Las bacterias en bajas densidades poblacionales muestran un comportamiento unicelular que al aumentar en número y alcanzar el umbral, su comportamiento se convierte en multicelular. Durante este proceso, las bacterias producen moléculas de señalización que promueven la expresión sincronizada de genes. Este mecanismo conocido como QS se relaciona con la capacidad de producir factores de virulencia, como toxinas y proteasas (Kalia 2013, LaSarre and Federle 2013, Helman and Chernin 2015) así mismo, su activación depende de autoinductores, entre los cuales se han descrito: oligopéptidos, AHLs, furanosil borato (autoinductor 2- AI2), ácido hidroxipalmitico metil ester y ácido metil dodecanoico (Kalia 2013, LaSarre and Federle 2013).

Las AHLs son producidas por más de 70 especies bacterianas Gram negativas las cuales se difunden durante su paso por la membrana celular para unirse a proteínas regulatorias intracelulares (Figura 1).

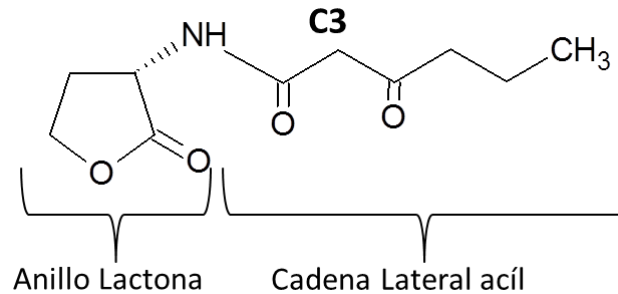
Figura 1. Diversidad de las señales de QS ejemplificada en diferentes clados bacterianos.



Adaptado de (Grandclement, Tannieres et al. 2015)

4.1.1 Quorum sensing en bacterias Gram Negativas. Las AHLs son un grupo de metabolitos biológicamente activos descritos en bacterias Gram negativas que actúan en su mayor parte como moléculas de señalización de QS y están involucradas en la disposición de residuos (detoxificación) (LaSarre and Federle 2013) y en la captación de hierro (Manefield and Whiteley 2007). La producción de estas moléculas están relacionadas al metabolismo asociado con S-adenosina metionina (SAM) y su estructura química está compuesta de un anillo homoserina lactona conservado (HSL) con una cadena acilo de longitud variable (Figura 2). De acuerdo a la longitud, las AHLs se pueden clasificar como de cadena corta (4-8 carbonos) y de cadena larga (10-18 carbonos) (Gonzalez and Keshavan 2006).

Figura 2. Esquema general de las señales de comunicación N- acil Homoserina Lactona (AHLs).



La longitud y el nivel de saturación de las cadenas laterales, conjugados con la presencia o ausencia de sustituciones oxo o hidroxilo en el carbono 3 (C₃) de la cadena lateral, proveen variación y especificidad para la comunicación en poblaciones microbianas mixtas (Bassler 1999, Gonzalez and Keshavan 2006, Kalia 2013). Estas variaciones son las que determinan “el lenguaje” que cada población microbiana utiliza produciendo un fenotipo asociado (Figura 1, Tabla 1).

Tabla 1: Algunos sistemas de comunicación QS utilizados por algunas bacterias Gram negativas y sus fenotipos asociados.

Microorganismo	Señal	Sintasa (S)	Receptor	Fenotipo Seleccionado	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>	C4HSL 3OC12HSL L HHQ, PQS	RhlI LasI	RhlR LasR, QscR	Exoenzimas, Virulencia, formación de biopelículas, movilidad, piocianina	(Dubern and Diggle 2008, Jimenez, Koch et al. 2012)
<i>P. syringae</i>	3OC6HSL	AhII	AhIR	Colonización planta	(Von Bodman, Bauer et al. 2003)
<i>P. stewartii</i>	3OC6-HSL	EsaI	EsaR	Adhesión, Exo polisacáridos y colonización de la planta	
<i>B. glumae</i>	C8-HSL	TofI	TofR	Motilidad, toxo flavina, Lipasas y virulencia	(Goo, Kang et al. 2010)
<i>E. carotovora</i>	3OC6HSL	CarI	CarR, ExpR, VirR	Exoenzimas, Virulencia	(Barnard and Salmond 2007)

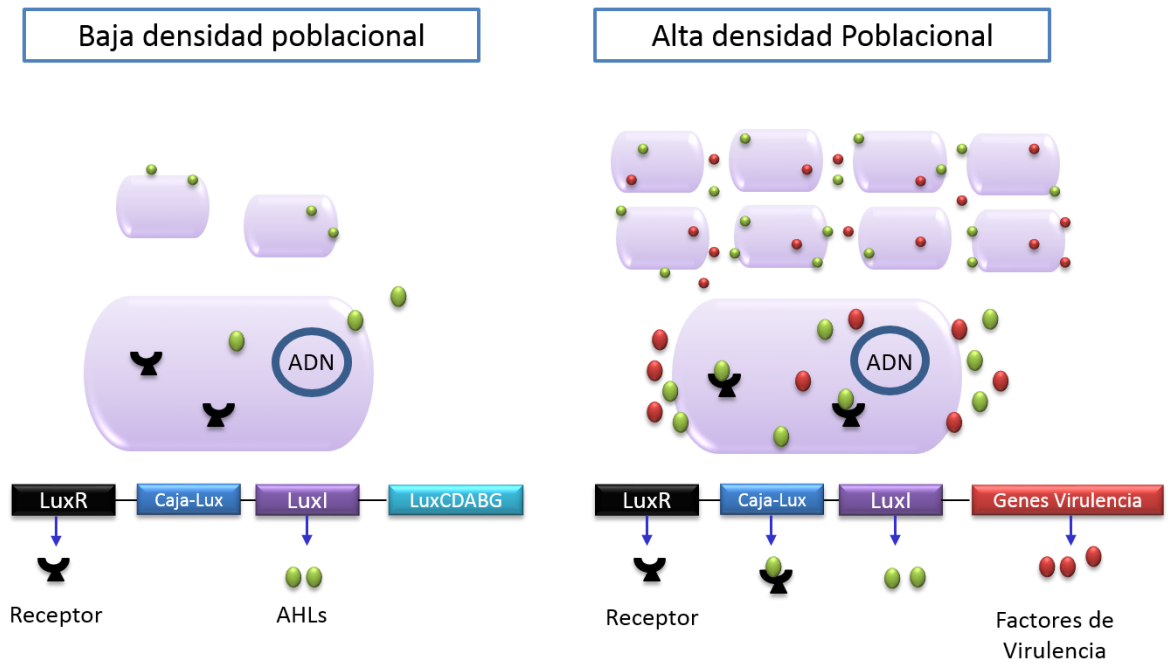
Adaptada por la autora (Kalia 2013, LaSarre and Federle 2013).

Las AHLs son sintetizadas por miembros de la familia LuxI de AHLs sintetas usando como precursor SAM y una proteína transportadora acilo acetilada (ACP) (LaSarre and Federle 2013). Existen excepciones como es el caso de LuxM de *Vibrio harveyi* y AinS de *Alivibrio fisheri*, que catalizan la misma reacción pero no comparten homología con las proteínas del tipo LuxI (Hansen, Purohit et al. 2015). En general, las AHLs sintetas elaboran un tipo específico de señal AHL y algunas producen AHLs a niveles basales (Gonzalez and Keshavan 2006). Posterior a la síntesis de las señales, las AHLs se difunden en la membrana y se acumulan

extracelularmente o pueden ser transportadas a través de la membrana de forma activa (LaSarre and Federle 2013).

Una vez se ha alcanzado el umbral de acumulación de señales AHLs en el ambiente extracelular, se produce la interacción entre la señal AHLs y la proteína receptora LuxR ubicada en el citoplasma de la célula. En respuesta a la acumulación de las AHLs, las proteínas LuxR actúan como reguladores transcripcionales que cambian de acuerdo a la interacción con el ligando resultando en la modulación de la expresión de genes específicos (Gonzalez and Keshavan 2006). De forma alternativa, algunas AHLs son detectadas por cinasas unidas a la membrana que funcionan como sensores, como es el caso de LuxN de *V. harveyi* (Ke, Miller et al. 2015). Cada receptor presenta cierto grado de especificidad por AHLs que depende de la longitud, saturación y oxidación de la cadena lateral (LaSarre and Federle 2013). Así mismo, cada especie bacteriana tiene un par sintasa/receptor que produce y responde a señales AHLs específicas. Sin embargo, también existen especies que utilizan múltiples pares sintasa/receptor que generan y responden a diversas AHLs como es el caso de *P. aeruginosa* (Wang, Schaefer et al. 2015), así como especies que tienen únicamente receptores del tipo LuxR y no tienen el par sintasa del tipo LuxI, como QscR de *P. aeruginosa* y SdiA de *E. coli* (Zan, Choi et al. 2015). La Figura 3 presenta el esquema general de la señalización de AHLs según el sistema LuxI/LuxR.

Figura 3. Esquema general del sistema QS para Bacterias Gram negativas.



4.2 SISTEMAS DE INHIBICIÓN DE QS

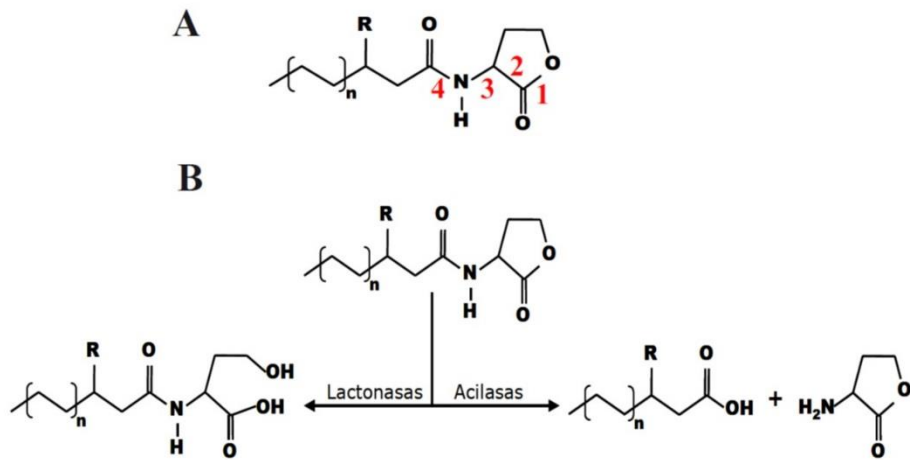
Considerando el papel que tiene el sistema QS en la expresión de genes de virulencia en las poblaciones microbianas, interferirlo representa una estrategia contra la infección producida por un patógeno, en consecuencia, su adaptabilidad al medio se interrumpe y se convierte en un blanco sensible a las defensas del huésped (Romero, Martín-Cuadrado et al. 2012). QQ se ha identificado como un sistema antagónico al QS que se activa cuando los microorganismos en su ambiente natural, tienen contacto con microorganismos que desarrollan sistemas de QS (García-Contreras, Maeda et al. 2013). Esto tiene un significado evolutivo importante dado que se considera como una estrategia de supervivencia (Kalia 2013).

QQ puede intervenir QS de varias formas: a) la inhibición de la generación de señal AHL, b) el bloqueo de la diseminación de la señal y c) antagonizar la recepción de

la AHL. De estas, la disminución de la concentración de AHLs por medio del bloqueo de la difusión de la señal puede ocurrir de forma espontánea por hidrólisis alcalina a pH elevados, fenómeno identificado como lactonólisis (Wang, Weng et al. 2004, Yates, Philipp et al. 2002) o también por mecanismos enzimáticos. En este último se han identificado microorganismos con capacidad para hidrolizar señales del tipo AHLs (Dong, Gusti et al. 2002, Huang, Petersen et al. 2006, Sio, Otten et al. 2006) (Tabla 2).

Se han descrito diferentes formas de intervenir la señal AHLs por vía enzimática, La figura 4, literal A, muestra cómo podría ocurrir la hidrólisis enzimática; 1 y 2 corresponde al rompimiento del anillo lactona mediado por enzimas lactonasas o descarboxilasas; 3 y 4 hace referencia a la actividad deaminasa o acilasa (Romero Manuel 2010). La figura 3 literal B muestra el modo de acción en particular de las enzimas lactonasas y acilasas. Los productos de esta hidrólisis quedan disponible como fuente de carbono y nitrógeno, perdiendo por completo su función como molécula de señalización (Romero Manuel 2010). La tabla 2 lista algunas enzimas lactonasas y acilasas descritas.

Figura 4. A) Posibles modos de degradación enzimática de AHLs. Los números en rojo indican la posición de corte de las enzimas: 1) Lactonasa; 2) Descarboxilasa; 3) Deaminasa y 4) Acilasa. B) Modo de acción de los dos tipos principales de enzimas de QQ conocidos. Las lactonasas hidrolizan el anillo lactona



Fuente, (Romero Manuel 2010).

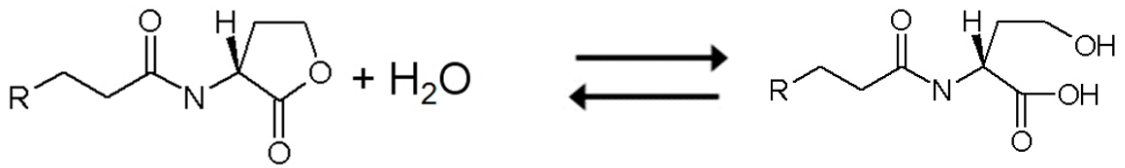
Tabla 2: Algunas enzimas QQ identificadas.

Grupo	Proteína	Fuente	Especificidad	Localización, cofactor o señal diana
Acilasas	PvdQ	<i>P. aeruginosa</i>	>7 carbonos	Asociado a la célula
	QuiP	<i>P. aeruginosa</i>	>7 carbonos	Asociado a la célula
	AiiD	<i>Ralstonia sp. XJ12B</i>	3Oc8,C4,3Oc12-HSL	Asociado a la célula
	Aac	<i>Ralstonia solanacearum gm11000</i>	>7 carbonos	Asociado a la célula
	HacA		>8 Carbonos, sin sustituciones	Secretado
	HacB	<i>P. syringae B728a</i>	>6 carbonos	Asociado a la célula
Lactonas	AiiA	<i>Bacillus sp.</i>	Superfamilia Metalo β lactamasa	Zn ²⁺
	AiiB	<i>Agrobacterium tumefaciens C58</i>		
	AttM			
	AhID	<i>Artrobacter sp cepa IBN110</i>		
	AiiA ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	<i>Bacillus thuringiensis</i> 147-11516		

Tomado de LaSarre y Federle (LaSarre and Federle 2013), modificado por la autora.

4.2.1 AHL-Lactonasa. Las lactonasas son enzimas con capacidad de hidrolizar el enlace éster del anillo lactona inactivando el auto inductor e interrumpiendo el sistema de QS (Fetzner 2015) (Figura 5).

Figura 5: Hidrólisis del anillo lactona producida por acción de lactonasas.



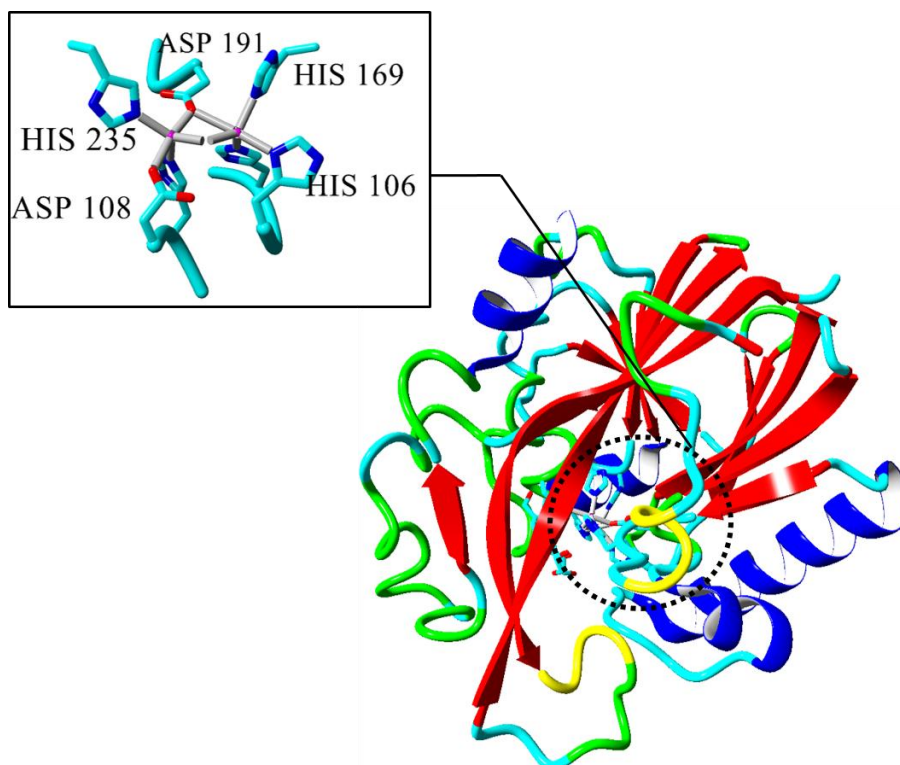
El *aiiA* (*auto inducerin activation gene*, por sus siglas en inglés) fue el primer gen descrito en *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína efectiva de QQ en *Erwinia carotovora* (Dong, Xu et al. 2000). La enzima codificada por este gen se describió como una lactonasa (Dong, Wang et al. 2001) y a partir de allí, se sabe que este gen está ampliamente distribuido en especies del género *Bacillus* (Dong, Gusti et al. 2002), incluyendo *Bt*, (Lee, Park et al. 2002) y *Bacillus cereus* (Huma, Shankar et al. 2011) (Tablas 2 y 3). Una revisión desarrollada por Huma y colaboradores, 2011 establecieron la existencia de alrededor 100 secuencias de genes descritos que codifican para lactonasas. De estos, 88 pertenecen a 7 diferentes tipos de *Bacillus* (firmicutes), 10 pertenecen a *Acinetobacter sp.*, 1 a *Acidobacteria* (Acidobacteria), *Arthrobacter* y *Streptomyces sp.*, (Actinobacteria) y *Agrobacterium*, *Klebsiella* y *Pseudomonas sp.*, (Proteobacteria) (Huma, Shankar et al. 2011). Además se han descrito lactonasas en células eucariotas identificadas como paraoxonasas (PON), categorizadas como lactonasas detoxificantes de mamíferos, halladas principalmente en el hígado (Bar-Rogovsky, Hugenmatter et al. 2013).

Al analizar las secuencias de aminoácidos de cada una de las lactonasas descritas, estas se pueden clasificar en dos grupos. El primero es BlcC que incluye las lactonasas de *A. tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Arthrobacter sp.*, y que comparten entre un 30 y un 58% de similitud y el segundo grupo representado por AiiA que contiene las secuencias de las especies de *Bacillus*, que comparten un 90% de identidad en sus secuencias peptídicas (Dong, Gusti et al. 2002, Lee, Park et al. 2002, Ulrich 2004, Romero Manuel 2010). La mayoría comparten un dominio altamente conservado HXDH~H~D asociado a la unión del cinc; característico de

las metalo- β -lactamasas y del cual se ha comprobado ser esencial para la actividad de algunas lactonasas (Dong, Gusti et al. 2002, Wang, Weng et al. 2004) mientras que para otras no (Pedroza, Florez et al. 2014). Para el caso de la lactonasa QsdA de *Rhodococcus erythropolis* (Uroz, Oger et al. 2008) no presenta homología con la familia de metalo- β -lactamasas y presenta el dominio fosfotriesterasa (PTE) de unión al cinc (Fetzner 2015).

La arquitectura y secuencia de aminoácidos es diversa dentro de este grupo de enzimas. No todas las lactonasas son dependientes de metales dado que algunos de los aminoácidos involucrados en su actividad catalítica como His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹-59X-His¹⁶⁹-21X-Asp¹⁹¹ (Figura 6) (Momb, Wang et al. 2008) pueden sufrir polimorfismos, así como residuos en las posiciones 117, 126, 138, 145 y 177 pueden afectar los sitios de unión al sustrato alterando las propiedades cinéticas como estabilidad aumentada y diferencia en la especificidad de sustratos (Huma, Shankar et al. 2011) o en otros casos, las variaciones en las posiciones 73, 138 y 170 como la AiiA₁₄₇₋₁₁₅₁₆, al estar cerca al núcleo de cinc tienen relación con la formación de canales iónicos asociados a la interacción con el sustrato, afectando la eficiencia catalítica (Pedroza, Florez et al. 2014). Así mismo, las sustituciones en la secuencia conservada (¹⁰⁴HXHXDH¹⁰⁹) como H¹⁰⁴S no afecta la actividad catalítica de AiiA, mientras H¹⁰⁹ reduce significativamente la actividad catalítica (Kim, Choi et al. 2005). Por tanto, estos residuos se han descrito como esenciales para la actividad lactonasa (Kim, Choi et al. 2005, Huma, Shankar et al. 2011).

Figura 6. Modelo de la lactonasa AiiA de *Bt subs kurstaki*, se señala el sitio catalítico caracterizado por la presencia de los dos núcleos de cinc. Acceso archivo PDB: P0CJ63 (AHLA_BACTK).



La enzima AiiA de *Bt* subsp. *kurstaki* HD263 (*Btk*) es capaz de hidrolizar N-butil-L-Homoserina Lactona (C4-HSL), C6-Oxo-HSL, N-3-oxo-octanoil-L-Homoserina lactona (C8-Oxo-HSL) y C12-Oxo-HSL (Thomas and Fast 2011) y al utilizar cobalto como cofactor, se encontró que tiene afinidad por un amplio rango de sustratos, incluidos γ -butirolactona (GBL), butiloxi carbonil-HSL (BOC-HSL), C5-HSL, benziloxycarbonil-HSL (CBZ-HSL) y C10-HSL (Momb, Wang et al. 2008). La especificidad de las lactonasas no se ve afectada por variaciones en las sustituciones o en la longitud de la cadena lateral, sino en la presencia de un anillo lactona (Wang, Weng et al. 2004, Momb, Wang et al. 2008) (Tabla 3). La cinética enzimática también se ve influenciada por las variaciones de pH y temperatura. AiiA pierde actividad por debajo de pH 6 y por arriba de pH 8 se produce lactonólisis, así

mismo la estabilidad térmica se mantiene hasta 37°C (Wang, Weng et al. 2004) (Tabla 3). También la eficiencia en la actividad QQ de AiiA está asociada con el nivel de expresión pues diversas sub especies de *Bt* presentan expresión diferenciada de *aiiA* y por lo tanto, diversos niveles de degradación de AHLs (LaSarre and Federle 2013).

Tabla 3. Algunas Lactonasas descritas en la literatura y sus propiedades catalíticas.

Gen	Microorganismo	Características				Ref
		pH	Temperatura	Sustrato	Ion	
aiiA	<i>Bacillus sp</i>	6-8 (8)* (-) 5	Estable hasta 37°C, disminuye a 45°C	Sin sustituciones 3-Oxo	Dependiente de iones metálicos	(Dong, Gusti et al. 2002, Wang, Weng et al. 2004)
aiiA	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kusrtaki</i>	ND	ND	Cadenas cortas y Largas con o sin sustituciones C3		(Dong, Gusti et al. 2002, Lee, Park et al. 2002, Kim, Choi et al. 2005, Liu, Lepore et al. 2005)
aiiA	<i>Bacillus thuringiensis</i> 147-115-16	Sin actividad bajo pH6	0-15°C Sin actividad 30-70°C Óptima. 60°C	C4-C10 sin sustituciones.	No depende de metales	(Florez, Gonzalez et al. 2014, Pedroza, Florez et al. 2014)

En estudios realizados con el aislamiento *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ se ha demostrado que posee actividad catalítica para: C8-HSL>C4-HSL>C6-HSL>C7-HSL (Florez, Gonzalez et al. 2014, Pedroza, Florez et al. 2014). Los ensayos realizados al expresar la proteína AiiA₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ en un modelo recombinante mostraron además actividad catalítica reducida pero detectable para C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL (Florez, Gonzalez et al. 2014). Así mismo, se encontró que es termoestable a 70°C y su actividad se ve inhibida en pH ácido (pH<5) (Tabla 3). Al analizar la secuencia deducida de aminoácidos la enzima posee el dominio conservado de la metaloproteína hidrolasa similar a la familia de las metalo β -lactamasas. Al evaluar su actividad catalítica en presencia de EDTA esta no se vio afectada, por lo tanto, no es dependiente de metales aunque posee los residuos característicos (Pedroza, Florez et al. 2014).

El efecto QQ de AiiA₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ ha sido demostrado tanto en la forma nativa como la recombinante al hidrolizar AHLs que median el sistema de QS de *Pc*. Esto se detectó por el uso de biosensores (CV026 y NTL4), así como en la atenuación de los síntomas de pudrición blanda producidos por este patógeno en papa (Florez, Gonzalez et al. 2014, Pedroza, Florez et al. 2014). La expresión del gen *aiiA* de *Bt* en *Pc* disminuye la producción de AHLs afectando las actividades controladas por QS en consecuencia, reduce los síntomas de pudrición de blanda en papa, berenjena, lechuga, zanahoria y perejil (Dong, Xu et al. 2000, LaSarre and Federle 2013). Además plantas transgénicas de papa y tabaco con el gen *aiiA* presentaron una resistencia elevada a la infección causada por *Pc* (Dong, Wang et al. 2001). La expresión heteróloga de este gen en diversos patógenos, incluidos *P. aeruginosa* (Reimann, Ginet et al. 2002) y *Burkholderia thailandensis* (Ulrich 2004) reduce la acumulación de señales AHLs y altera los fenotipos dependientes de este sistema (LaSarre and Federle 2013). Además ha demostrado su efectividad en el tratamiento de Carpas infectadas con *Aeromonas hydrophila*, pues al co inocular el patógeno con la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp B546 expresada en *Pichia pastoris*, se incrementa la supervivencia de los peces infectados (Chen, Zhou et al. 2010) y además, ha probado ser efectiva en el tratamiento de *P. aeruginosa* en modelos

murinos con quemaduras de piel que al aplicar la proteína purificada en conjugación con ciprofloxacina, la mortalidad es nula (Gupta, Chhibber et al. 2015).

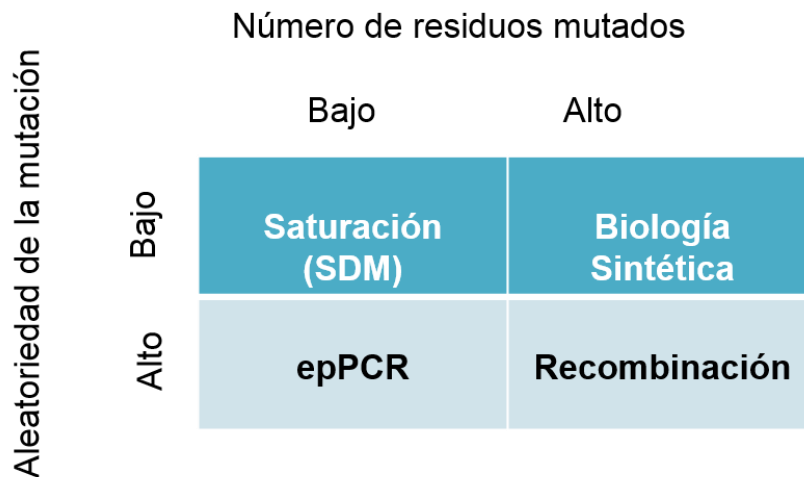
4.3 MEJORAMIENTO GENÉTICO POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

La evolución dirigida (ED) imita el proceso de selección natural en el mejoramiento de genes o proteínas orientadas a un fin específico. Se caracteriza por que en el laboratorio, se tiene cierto control respecto a las variaciones en tanto que pueden ser tamizadas y seleccionadas con las características deseadas, luego de varios ciclos iterativos (generaciones) (Currin, Swainston et al. 2015).

La ED comienza con una población que se espera contenga algún tipo de actividad de interés y progresa a través de múltiples rondas de mutación, selección y análisis. Un escenario típico de evolución dirigida sugiere que se tenga una clase de sustrato en particular y un tipo de reacción química que se desee catalizar. Sin embargo, pensar en el diseño de una evolución dirigida no garantiza la obtención de enzimas activas incluso cuando la química y los sitios activos sean apropiados (Currin, Swainston et al. 2015). Si se quiere mejorar la unión, y especificidad de sustrato, el modelamiento y diseño de la estrategia de ED es recomendable; pero para mejoramiento de K_{cat} se requieren de métodos empíricos de ED especialmente de residuos distantes del sitio catalítico (Currin, Swainston et al. 2015).

Algo característico de la ED es la obtención de librerías altamente diversas creadas a partir de diferentes enfoques que incluyen métodos de mutagénesis aleatoria como *Ep-PCR*, mutagénesis sitio dirigida orientada a residuos específicos, recombinación y otras variaciones que se han implementado para mejorar el flujo de trabajo y optimizar la eficiencia como: amplificación mutagénica oligonucleotídica dirigida (MOD-PCR), extensión de PCR por superposición (OE-PCR), mutagénesis por saturación de secuencias (SDM), mutagénesis por saturación repetitiva y métodos basados en transposones. Es importante señalar que estas técnicas se soportan en la tasa de mutaciones obtenidas, así como la aleatoriedad (Currin, Swainston et al. 2015) (Figura 7).

Figura 7. Diagrama de Boston de las diferentes estrategias para la obtención de librerías de variantes por ED



Traducido por la autora y tomado de (Currin, Swainston et al. 2015)

La ED tiene aplicaciones en diferentes áreas, se soporta en la ingeniería de proteínas y además es una alternativa para el diseño racional de proteínas modificadas (Lutz 2010, Currin, Swainston et al. 2015). Aunque es una herramienta poderosa, la ED se ve limitada por el tamaño de las librerías que se pueden preparar, la tasa a la cual el tamizaje o selección se puede llevar a cabo y el requerimiento para una intervención significativa por el investigador en cada ciclo de la librería y el tamizaje/selección. Sin embargo, un número de avances recientes han ayudado a mitigar estas limitaciones a través de diseño de librerías inteligentes y evolución *in vivo* (Cobb, Si et al. 2012).

4.3.1 Error Prone PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) Error o *Ep-PCR* (en inglés) es quizás el método más común empleado para introducir mutaciones aleatorias. Consiste en inducir mutaciones al azar a un gen en

particular durante una RCP. Para esto, se reduce la fidelidad de la *Taq* polimerasa mediante alteraciones en las condiciones de reacción, es decir, modificando las concentraciones de $MgCl_2$ usando diferentes proporciones entre purinas y pirimidinas y la adición de iones de manganeso (Copp, Hanson-Manful et al. 2014, Currin, Swainston et al. 2015)

Esta técnica se considera el método de ED más simple y más comúnmente utilizado para la obtención de librerías pues genera un número ilimitado de variantes (Currin, Swainston et al. 2015). Además las fortalezas de esta técnica radican en su simplicidad y aplicabilidad (Copp, Hanson-Manful et al. 2014). Sus limitaciones son la predisposición por las transiciones (cambios de AT por GC) y una aversión a mutaciones consecutivas (Currin, Swainston et al. 2015). También debido a la aleatoriedad implícita en la técnica, es probable encontrar mutaciones tanto en los sitios activos como lejos de estos y tiene baja probabilidad de generar sustituciones múltiples de bases dentro del mismo codón. Considerando la aleatoriedad de la técnica y con el fin de obtener clones que representen las mutaciones funcionales de la enzima deseada, se requiere un proceso afinado de tamizaje (Copp, Hanson-Manful et al. 2014). Esta técnica ha sido empleada en el mejoramiento genético de diversas enzimas, de diferentes géneros microbianos. En la tabla 4 se presentan algunos ejemplos.

Tabla 4: Mejoramiento genético de diversas enzimas obtenido por Error prone PCR.

Objetivo	Sujeto a ser mejorado	Tamizaje	Resultado	Referencia
Mejorar actividad fitasa	Gen <i>phyA</i> de <i>Aspergillus niger</i>	Expresión en <i>Pichia pastoris</i>	PP-NPep-6A 61% Mayor especificidad y 53% menos km , la eficiencia catalítica fue 84% superior	(Liao, Zeng et al. 2012)
Mejorar termo estabilidad	Amilasa maltogénica US149 de <i>Bacillus sp.</i>	Ensayos de hidrólisis de almidón en cultivo y placa de 96 pozos	Mutante: MA-A27 Mutaciones: D46V, P78L, V145A, y K548E	(Ben Mabrouk, Ayadi et al. 2013)
Aumentar la tolerancia a Isobutanol desde nivel transcripcional	Gen <i>crp</i> de <i>E. coli</i> que codifica para el receptor CRP de cAMP	Librería se sometió a estrés por Isobutanol	La variante IB2 (S179P, H199R) presentó mayor crecimiento (0.18 h ⁻¹) que el control (0.05 h ⁻¹) en 1.2% (v/v) de isobutanol (9.6 g/L).	(Chong, Geng et al. 2014)
Mejorar el desempeño de <i>E. coli</i> bajo estrés oxidativo	Gen <i>crp</i> de <i>E. coli</i> que regula SoxR y OxyR, y otros ≈400 genes	Librería se sometió a estrés oxidativo	Tres mutantes: (OM1-OM-3) tolerancia mejorada. OM3 creció en 12 mM H ₂ O ₂ mientras que el control fue inhibido.	(Basak and Jiang 2012)
Mejorar la	Gen <i>bla</i> de	Evaluación de halo	Se seleccionó la variante con	(Liu, Hu et al. 2012)

estabilidad de la alfa amilasa (BLA) a condiciones ácidas	<i>Bacilluslicheniformis</i>	de degradación de almidón de las colonias.	actividad amilasa a pH 4-5 se identificó sustituciones: T353I y H400R	
Mejorar la actividad enzimática de la peniciliacilasa de <i>E. coli</i>	Gen <i>pac</i> de <i>E.coli</i>	Medición actividad catalítica de los variantes obtenidos en cada ronda de ED por ep-PCR	Mejor mutante: M2234, 4 veces más activo que el parental y mayor estabilidad a pH 10 con 1 sustitución: K297I	(Balci, Ozturk et al. 2014)

Las enzimas lactonasas por su potencial biotecnológico en el control de QS en diferentes escenarios han sido objeto de mejoramiento genético por ED utilizando diferentes estrategias, incluida *Ep-PCR*.

Combinando una estrategia recombinante (barajado de ADN) y mutagénesis basada en filogenia, se logró expresar de forma activa y soluble en *E. coli* una paraoxonasa PON3 y se seleccionaron aquellas variantes que retuvieron su actividad catalítica y especificidad de sustrato permitiendo estudiar las características bioquímicas de estas enzimas sin los otros componentes del suero (Khersonsky, Rosenblat et al. 2009).

Por otro lado Chow y Colaboradores (2009) a partir de la lactonasa producida por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* K-10, fue seleccionada como molde para evolución dirigida mejorando la actividad catalítica entre 30 y 32 veces respecto de la parental y se aumentó la especificidad de sustrato únicamente añadiendo una mutación puntual (N266Y) en el carboxi terminal de la octava hoja β . Lo anterior permitió optimizar la actividad catalítica de las lactonasas de la familia amidohidrolasa para fines biotecnológicos (Chow, Wu et al. 2009).

Mediante el uso de *Ep-PCR* también se ha logrado mejorar la actividad catalítica de una lactonasa termoestable (GkaP) aislada de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 para la degradación eficiente de pesticidas órgano fosforados. De esta lactonasa se obtuvo una variante activa con ocho sustituciones en la proteína y una actividad 232 veces mayor que la nativa (Zhang, An et al. 2012). Posteriormente, utilizando como molde la variante lactonasa de *G. kaustophilus* HTA426 que se sometió a *Ep-PCR*, se logró aumentar el valor K_{cat}/K_m en 72 veces contra sustratos como C12-Oxo-HSL y C4-HSL. Esta actividad estuvo relacionada con sustituciones E101G/R230C y E101N/R230I en las horquillas de la tercera a séptima hoja beta en el carboxilo terminal (Chow, Xue et al. 2010).

La enzima SsoPox de *Sulfolobus solfataricus* es una fosfotriesterasa del tipo lactonasa que es termoestable e hidroliza lactonas y a su vez, compuestos

organofosforados neurotóxicos, pero en bajo nivel. Con el fin de potencializar esta característica, se obtuvo mediante evolución dirigida una mutante (W263F) con una especificidad 6 veces aumentada respecto de la parental contra Paraoxon, (Merone, Mandrich et al. 2010).

Estudios más recientes demuestran que la evolución dirigida es una herramienta potencial para el mejoramiento genético con aplicaciones biotecnológicas en áreas biomédica, agrícola y ambiental (Bar-Rogovsky, Hugenmatter et al. 2013, Fetzner 2015).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 RESUMEN DE CEPAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Tabla 5. Resumen de cepas, plásmidos y constructos utilizados en este estudio.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Mutante mini-Tn5; violaceína negativa. Regula la pigmentación por la detección exógena de AHLs	Donada: Profesor Vittorio Venturi-ICGEB (McClellan, Winson et al. 1997)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	fusión de <i>lacZ</i> con <i>tral</i> , que produce una coloración azul en presencia de X-Gal	Donada: profesor Stephen K. Farrand, Universidad de Illinois (Luo, Clemente et al. 2001)
<i>E. coli</i> DE3BL21	Competente para transformación y expresión de proteínas	Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología UDES
<i>Bacillus thuringiensis</i> 147-11516	Aislado de filoplano, codifica para una lactonasa AiiA	(Pedroza, Florez et al. 2014)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Aislado de <i>S. quitoense</i> , produce pudriciones blandas y acuosas mediado por QS	Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología UDES (Guerra; 2013)
<i>A. tumefaciens</i> C58	Cepa clásica Nopalina/Agrocinopina tipo Biovar 1	Donadas: profesor Stephen K. Farrand, Universidad de Illinois
<i>A. tumefaciens</i> 15955	Cepa clásica octopina/manitil opina tipo Biovar 1	
<i>E. coli</i> DE3BL21- <i>aiiA</i> 147-11516	Cepa recombinante con el constructo pColdIV- <i>aiiA</i> de <i>Bt</i> 147-11516 Codifica para lactonasa nativa AiiA147-11516	Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología UDES (Pedroza, Florez et al. 2014)
<i>E. coli</i> DE3BL21- <i>pColdIV-Epp</i>	La librería de variantes Epp se expresó en esta cepa, la notación difiere para cada una de las variantes.	Este estudio, Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología UDES

Plásmidos y Constructos	Descripción	Referencia
PCR2.1	Plásmido usado para insertar directamente los productos de <i>PCR</i>	Adquirido para este estudio: Life Technologies
PCR2.1-Epp	Constructo generado al insertar los productos de <i>PCR</i> obtenidos por <i>Ep-PCR</i> del gen <i>aiiA</i> de <i>Bt</i> 147-11516	Este estudio. Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología UDES
pColdIV	Vector para expresión eficiente de proteínas	Adquirido para este estudio: Takara®
pColdIV-Epp	Constructo generado al insertar los fragmentos obtenidos de PCR2.1 usando enzimas de restricción <i>NdeI/XbaI</i> obtenidos por <i>Ep-PCR</i> del gen <i>aiiA</i> de <i>Bt</i> 147-11516	Desarrollado para este estudio. Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología UDES

5.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se utilizaron como biosensores para la detección de señales AHLs las cepas *A. tumefaciens* NTL4 donada por el profesor Stephen K. Farrand, Universidad de Illinois, la cual lleva una fusión de *lacZ* con *trai*, que produce una coloración azul en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) en respuesta a AHLs y *Chromobacterium violaceum* CV026 donada por el profesor Vittorio Venturi, Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (ICGEB) que regula la producción de violaceína por la presencia o ausencia de lactonas exógenas (McClellan, Winson et al. 1997). Estos biosensores se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) (1% peptona, 0.5% extracto de levadura, 1% de NaCl), sólido o líquido de acuerdo a los requerimientos, suplementado con kanamicina (100 μ g/mL) para CV026 y gentamicina (30 μ g/mL) para NTL4. Los biosensores se incubaron a temperatura ambiente.

Las cepas de *E. coli* DE3BL21 transformadas se cultivaron en medio LB con ampicilina (50 μ g/mL) y se incubó a 37°C con 200 rpm durante la noche. Como

control positivo se utilizó la cepa *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ (Pedroza, Florez et al. 2014) la cual fue cultivada en medio LB sin antibiótico.

Para los ensayos preliminares de actividad catalítica de los variantes se utilizó *Pc* obtenida de un aislamiento de lulo (*Solanum quitoense*) (Guerra; 2013) y para la variante con mayor actividad, se realizaron ensayos de atenuación de infección producida por *A. tumefaciens* C58 y 15955 las cuales fueron donadas por el profesor Stephen K. Farrand, Universidad de Illinois. Estas cepas se cultivaron en medio LB, agar y caldo nutritivo y se incubaron a temperatura ambiente.

5.3 ERROR PRONE PCR

La cepa recombinante *E. coli* DE3BL21 que contiene el constructo pCOLDIV- *aiiA* de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆ (nativa) se cultivó en 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL) a 37°C con 200 rpm de agitación durante toda la noche. Una vez finalizado el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células se utilizó para realizar extracción de ADN plasmídico. Se utilizó el *Kit DNA Wizard Mini Preps* de Promega ® (Madrid), según instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en 25µL de agua libre de nucleasas y se conservó a 4°C.

Se realizó digestión utilizando las enzimas de restricción *XbaI* y *NdeI* (Biolabs ®, Inglaterra) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en incubación de 2 horas a 37°C. El producto de la digestión se verificó en gel de agarosa al 0,8%p/v teñido con SYBR safe (10X) de Life technologies (USA), y se secuenció en Genewiz (New Jersey, USA)

El inserto de ~750 pb liberado se cortó del gel y se purificó utilizando *QiaQuick Gel extraction Kit* de Qiagen® (Holanda) según instrucciones del fabricante. El producto se resuspendió en 25µL agua libre de nucleasas y se conservó a 4°C.

Se diseñaron 6 protocolos diferentes de *Ep-PCR*. Las condiciones se describen en la tabla 6. El volumen final de cada reacción fue de 50µL, se añadieron 2,5U de *Taq* polimerasa (Promega ®) y ADN añadido a una concentración de 1 ng/ µL.

Tabla 6: Protocolos de *Error Prone PCR* utilizados para amplificar el gen *aiiA* de *Bt₁₄₇₋₁₁₅₋₁₆*. La concentración de buffer, así como la adición de *Taq* polimerasa (Promega ®) correspondieron a las utilizadas normalmente en una PCR con un volumen final de 50 µl.

REACTIVOS	P1	P2	P3	P4	P5	P6
MgCl ₂	7mM	5mM	5mM	5mM	7mM	7mM
MnCl ₂		0.01mM	0.05mM			0.05mM
Purinas				0.2mM	0.2mM	
Pirimidinas	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM

Se utilizaron los cebadores pCOLDF (5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG-3') y pCOLDR (5'TGGCAGGGATCTTAGATTCTG- 3'). Las condiciones de amplificación fueron 95°C por 4 minutos, 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Se realizaron 30 ciclos de repetición y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los amplificadores se realizaron en el termociclador MyCycler (BioRad). Como control positivo de amplificación se utilizó pColdIV- *aiiA* recombinante y como control negativo, no se añadió ADN a la reacción y el volumen se completó con agua.

Para cada uno de los protocolos ensayados se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%p/v teñido con SYBR safe (10X) (Life technologies, USA). Todos los geles se corrieron a 80V durante 80 minutos. El marcador de peso utilizado fue 1Kb (Fermentas).

Los amplificadores se clonaron utilizando el *Kit Topo TA Cloning* (Life technologies), en el plásmido PCR2.1 según instrucciones del fabricante. Los constructos obtenidos se digirieron con enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI* (Biolabs®, Inglaterra) y se ligaron en el vector de expresión pColdIV (Takara®) utilizando

ligasa T4 (Promega®, Madrid) según instrucciones del fabricante y previamente digerido con las mismas enzimas. Por medio de electroporación se transformaron células competentes de *E. coli* (DE3) BL21. Las transformantes crecieron en agar LB con ampicilina (50 µg/ml) a 37°C durante toda la noche. Las colonias obtenidas por este protocolo se seleccionaron y se crio-preservaron en glicerol 20% v/v.

5.3.1 Análisis de secuencia y homología de las variantes obtenidas. De las 10 variantes evaluadas con biosensores CV026 y NTL4 obtenidos se seleccionaron al azar diferentes colonias para establecer la presencia del inserto por digestión con enzimas *NdeI* y *XbaI* como se describió previamente. Las colonias se cultivaron en caldo LB con ampicilina a 50 µg/mL a 37°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. Se realizó extracción de plásmidos utilizando *kit de Mini Preps* de Promega® (Madrid) según indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico obtenido se resuspendió en agua libre de nucleasas y se envió a secuenciación a Genewiz (New Jersey- USA), los cebadores utilizados para la secuencia fueron pColdF (5'-ACGCCATATCGCCGAAAGGC-3') Y pColdR (5'-ACCGTCCCTAGAATCTAAGAC-3'). Se verificó la homología los genes *aiiA* con la parental, así como con reportados en el NCBI utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para establecer la posición de las mutaciones en cada uno de las variantes secuenciadas se utilizaron los programas Bioedit (Hall A. Thomas 1999) y Gene Runner (Edgar 2004).

5.3.2 Tamizaje cualitativo de actividad lactonasa para las variantes obtenidas por *Ep-PCR* en presencia de biosensores CV026 y NTL4. Se realizaron pruebas a las diez variantes con biosensores CV026 y NTL4 en presencia de AHLs sintéticas: C6-HSL, C8-HSL, C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Este método se fundamentó en la prueba cualitativa de difusión de las AHLs en medio de cultivo sólido y su detección por los biosensores CV026 y NTL4 descrito por (McClean, Winson et al. 1997).

Brevemente, las 10 variantes seleccionadas se cultivaron en caldo LB con ampicilina a 50 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación constante. De este cultivo se tomó una alícuota de 20µl y se llevó a caldo LB con ampicilina a 50 µg/mL, se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm) durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionó IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración de 1mM y se dejó incubar toda la noche. Se tomaron 20µl de cultivo fresco y 20µl de cada AHL sintética a una concentración de 100 µM y se añadieron a 5ml de caldo LB. Se utilizaron los siguientes tratamientos: variante + C6-HSL, variante+ C8-HSL, variante + C6-Oxo-HSL, variante + C12-Oxo-HSL. Como control positivo para la detección de los biosensores, se añadió únicamente AHLs. Estos cultivos se incubaron a 37°C por 2 horas en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación y con el objeto de probar el sobrenadante, los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente (~18°C).

Simultáneamente, en caja de agar LB y con un bisturí estéril, se cortaron 6 líneas de 1 cm de ancho separadas por 2 o 3mm. Del sobrenadante de la reacción se tomaron 5 µl y con un bisturí estéril se cortaron 6 líneas de 1 cm de ancho que se dispensaron al inicio de cada línea sobre el agar. Una vez se secaron las muestras, se realizó una siembra en estría con ayuda de un asa de argolla partiendo de un cultivo fresco en presencia del biosensor CV026 o NTL4 según AHLs a utilizar. Las cajas de petri se incubaron a temperatura ambiente (~18°C) durante 48 horas. Se realizó medición de la longitud del pigmento producido por el biosensor siguiendo la escala descrita por (Florez, Gonzalez et al. 2014). Ausencia de pigmento en el biosensor (++); ligera pigmentación en el biosensor (+) y biosensor completamente pigmentado (-).

5.4 ENSAYOS DE ATENUACIÓN DE LA INFECCIÓN EN PAPA

Para establecer si las variantes seleccionadas producen atenuación de la infección producida por *Pc* en rodajas de papa. Se utilizó el protocolo descrito por (Lee, Park

et al. 2002). Brevemente, las variantes se cultivaron en caldo LB con ampicilina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante 5 horas. Posteriormente, se añadió IPTG para inducir la producción de la proteína y se reanudó la incubación durante toda la noche. Trascurrido este tiempo, se subcultivaron en las mismas condiciones mencionadas hasta que alcanzaron una $\text{DO}_{600} = 2 (\pm 0.1)$. Para los controles se cultivó *Pc* en 5 ml de caldo LB a temperatura ambiente (~18°C).

Una vez concluido el tiempo de incubación los cultivos de las variantes se centrifugaron a 7000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se conservaron en tubos de ensayo de 15 ml. Aparte un bulbo de papa se lavó 4 veces en solución de etanol al 70% (v/v) y agua destilada estéril. Se cortaron rodajas de aproximadamente 5 mm de grosor y se secaron en cabina de flujo de laminar por 30 minutos. A cada rodaja se realizó una pequeña incisión en el centro con un bisturí estéril y se consideró el punto de inoculación para el ensayo de atenuación. Con los sobrenadantes se remojaron las rodajas de papa. Cada rodaja se secó en cabina de flujo laminar por 30 minutos y se aplicó 2.5 μl de cultivo fresco de *Pc* en el centro de la rodaja. Se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente y se realizó seguimiento a lo largo de 48 horas para determinar la progresión de la pudrición. Los criterios para establecer si hubo o no atenuación de la infección consistieron en comparar el área macerada por la infección producida por *Pc* versus las áreas de maceración de las rodajas de papa con tratamiento. Se consideró atenuación cuando no hubo maceración del tejido o esta estuvo limitada a 15 mm^2 con respecto a la maceración del control. Una atenuación leve se consideró entre 15 mm^2 a 19 mm^2 con respecto a la maceración del control y sin atenuación aquellas que mostraron áreas de maceración mayores a 20 mm^2 .

5.5 ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA ACTIVIDAD AHL-LACTONASA DE LA VARIANTE 852 MEDIANTE EL USO DE BIOSENSORES

De las 10 variantes tamizadas, se realizó cuantificación y caracterización de la actividad AHL-lactonasa a la variante 852 esto con el fin de establecer las propiedades catalíticas generales de la enzima de forma cualitativa. Para este fin, a partir de un cultivo de 1 litro (caldo LB) se purificó la proteína por cromatografía empleando una columna de Ni. Se obtuvo 3 mg de proteína los cuales se diluyeron en buffer que contenía: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% Glicerol, y pH 8.0. Se verificó la proteína en SDS-PAGE teñido con azul de Comassie. La concentración de la proteína se realizó por medio del ensayo de Bradford (Laemmli 1970) con BSA como estándar.

5.5.1 Detección cualitativa de la actividad biológica de la proteína purificada de la variante 852. Para establecer la capacidad catalítica de la enzima purificada se realizó el protocolo descrito por (Pedroza, Florez et al. 2014). Brevemente se tomaron 50 μ M de AHL-lactonasa purificada, 20 μ M de C6-HSL y C8-HSL resuspendida en PBS 1X (pH 7.4). Terminados los periodos de incubación de 30, 60 y 120 minutos a 30°C con agitación suave, para detener la reacción esta se incubó a 100°C por 90 segundos, el producto de hidrólisis se analizó mediante el biosensor *C. violaceum* CV026. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.5.2 Determinación del efecto de la temperatura de la variante 852. Para evaluar el efecto de la temperatura, una solución de 287.2 μl de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) se mezcló con 12 μl de C8-HSL y C6-HSL a una concentración final de 20 μM y se incubó a diferentes temperaturas (0, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 $^{\circ}\text{C}$) por 30 minutos. Luego de este tiempo, la reacción se inició al agregar AHL-lactonasa a una concentración final de 50 μM , después de 120 minutos la reacción se paró con calor (100 $^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos). Los productos de hidrólisis se analizaron con el biosensor *C. violaceum* CV026. Los tratamientos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles.

5.5.3 Termoestabilidad de la variante 852. Para establecer la estabilidad de la proteína se realizó ensayos a diferentes temperaturas durante 7 horas y 30 minutos. Se tomaron 1.97 μl de enzima a una concentración final de 50 μM y resuspendieron en 670 μl de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) y se incubaron a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70 $^{\circ}\text{C}$) durante cinco horas en diferentes tiempos (2, 3, 4 y 5 horas) se adicionaron 20 μM del sustrato (C8-HSL) y se dejaron 120 minutos más en incubación en agitación suave para producir la hidrólisis. Los productos se analizaron con el biosensor CV026. Los tratamientos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

5.5.4 Efecto del pH sobre la actividad de la variante 852. Con el objetivo de determinar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, se preparó una solución de buffer Tris HCl 100 mM a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8 y 9) y 100 μM de lactonasa se mezclaron con 12 μl de C6-HSL a una concentración final de 20 μM . La mezcla de reacción se incubó durante 60 y 120 min en agitación suave a 32 $^{\circ}\text{C}$. Los productos de hidrólisis se analizaron con biosensor *C. violaceum* CV026. Los tratamientos se realizaron por duplicado con sus respectivos controles.

5.5.5 Ensayos de atenuación de la infección en zanahoria. Con el fin de confirmar la capacidad de la variante 852 para atenuar la infección producida por *A. tumefaciens* cepas C58 y 15955 en rodajas de zanahoria, se utilizó la técnica de

co-cultivo. Brevemente, la variante Epp852 y las cepas C58 y 15955 fueron cultivadas por separado hasta alcanzar una $OD_{600}=1$, una vez alcanzado este punto se co-inocularon los microorganismos, en 5 mL de caldo LB así: 852 + C58, 852 + 15955 y como controles 852, *A. tumefaciens* C58 y 15955. Se incubaron durante dos horas y luego se inocularon sobre las rodajas de zanahoria previamente desinfectadas con solución de alcohol (20% v/v). Las rodajas de zanahoria se colocaron en cámara húmeda en caja de petri sellada. La observación se realizó diariamente hasta por 27 días. Se realizaron los ensayos por triplicado. La atenuación se determinó por la formación de tumores en los ensayos comparados con los controles positivos de infección.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA LACTONASA PURIFICADA 852 POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPLC-MS)

Para el análisis se empleó un cromatógrafo Líquido Agilen Serie 1200. Dos microlitros de solución a evaluar se inyectaron dentro de una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6x100mm 3,5-Micron) Agilent®. El procedimiento de elución consistió en un perfil de metanol más una solución de acetato de amonio 1M (pH 6.74) y ácido fórmico (0.1%p/v), a un flujo en un rango entre 0.5-0.8 ml/min. Se analizaron tres sustratos C8-HSL, C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL. En la Tabla 7 se observan las condiciones de optimización de espectrometría para cada uno de los sustratos.

Tabla 7: Condiciones HPLC-MS para cuantificación de AHLs.

Parámetros en (ESI-MS)	N- acíl Homoserina Lactona		
	C8-HSL	C6-Oxo-HSL	C12-Oxo-HSL
Voltaje Capilar (V)	4500	2900	5000
Voltaje de Fragmentación (V)	100	90	130
Presión de Nebulización (p.s.i)	60	60	60
Temperatura de gas de secado (°C)	350	350	350
Rango de detección (<i>m/z</i>)	100-250	100-300	100-350

5.6.1 Determinación de la actividad hidrolítica de AHLs por la enzima lactonasa 852. A un buffer de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) se le adicionaron 3.37 μ l (120 μ M) de la enzima purificada AHL-lactonasa 852y se mezcló con 0.25 mM de C8-HSL. La mezcla de reacción con un volumen final de 1 ml se incubó a 32°C por 10 minutos a 250 rpm. Cumplido el tiempo de incubación y para terminar la reacción enzimática, la suspensión fue expuesta a 100 °C por 90 segundos. Posteriormente los remanentes de la hidrólisis fueron analizados y cuantificados por HPLC-MS. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles negativos: (sustrato y buffer sin enzima) y control de temperatura (buffer con sustrato sin calor y enzima). El control positivo tenía una concentración final de la enzima AHL-lactonasa de 1 mM. La actividad AHL-lactonasa se definió como la cantidad en micromoles de AHLs hidrolizados por minuto por miligramo de AHL- lactonasa.

5.6.2 Determinación de la estabilidad térmica de la enzima Lactonasa 852. Para analizar esta propiedad, la enzima AHL-lactonasa (120 μ M) se incubó a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C) en Tris HCl 100 mM (pH 7.4) durante dos horas y luego de transcurrido este periodo, la solución se incubó con

C8-HSL a una concentración final de 0.25 mM por 10 minutos a 37°C. Terminado el tiempo de incubación la suspensión se expuso a calor (100 °C) por 90 segundos para detener la reacción enzimática. Posteriormente los remanentes de la hidrólisis fueron analizados y cuantificados por HPLC-MS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

5.6.3 Evaluación de la actividad catalítica en diferentes pH de la lactonasa 852. Para determinar el efecto del pH en la actividad AHL-lactonasa se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto que la mezcla de hidrólisis se incubó a 32°C en buffer Tris HCl 100 mM a diferentes pH (4, 5, 6, 7, 8 y 9). Luego las soluciones de actividad residual fueron analizadas y cuantificadas por HPLC-MS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

5.6.4 Especificidad de la lactonasa 852. Para determinar la cinética enzimática a un buffer de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) se adicionó AHL-lactonasa a una concentración final de 120 µM y se mezcló con diferentes concentraciones de sustratos C6-HSL, C8-HSL, C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31 y 0.16 mM) con un volumen final de 500 µl. Las reacciones se incubaron a 30°C y se pararon con calor antes que se consumiera aproximadamente el 10% de cada sustrato. Las lactonas residuales de la hidrólisis enzimática se cuantificaron por HPLC-MS, todos los ensayos se corrieron por triplicado con sus respectivos controles.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el análisis de secuencias de la librería se calculó la tasa de mutaciones para cada uno de los mutantes analizados, así como el porcentaje de cambios identificados en la secuencia.

Para los resultados de cuantificación de la actividad para pH y temperatura se calculó la media y la desviación estándar para todos los datos tomados por triplicado.

La cinética de Michaelis Menten se realizó usando GraphPad Prism Version 6 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, (www.graphpad.com).

5.8 IMPLICACIONES ÉTICAS

Este trabajo de investigación se desarrolló según los lineamientos aplicables de la resolución 8430 de 1993. Las instalaciones donde se desarrolló la parte experimental corresponden a lo estipulado en el Artículo 64, puesto que el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander, UDES, se clasifica como Laboratorio Básico de Microbiología y los microorganismos que se manipularon durante el desarrollo de la propuesta, corresponden al Grupo de Riesgo I según la clasificación del Artículo 67. Su manejo se realizó de acuerdo a los lineamientos ambientales y de bioseguridad establecidos por la Universidad de Santander, UDES.

Según las disposiciones de los artículos 73 y 74 el material biológico permaneció contenido en las instalaciones del Laboratorio, no se liberó ningún microorganismo o proteína genéticamente modificada al medio ambiente.

6. RESULTADOS

6.1 MUTAGÉNESIS POR *EP-PCR*

A partir de la cepa recombinante se obtuvo el constructo pColdIV-*aiiA*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ el cual fue digerido liberando un inserto de aproximadamente 800 pb (Figura 8). El análisis de secuencia confirma que contiene 753 pb y corresponde de acuerdo al análisis de homología a N-acil Homoserina Lactona Hidrolasa (Lactonasa) (Genbank: ABN51242.1)

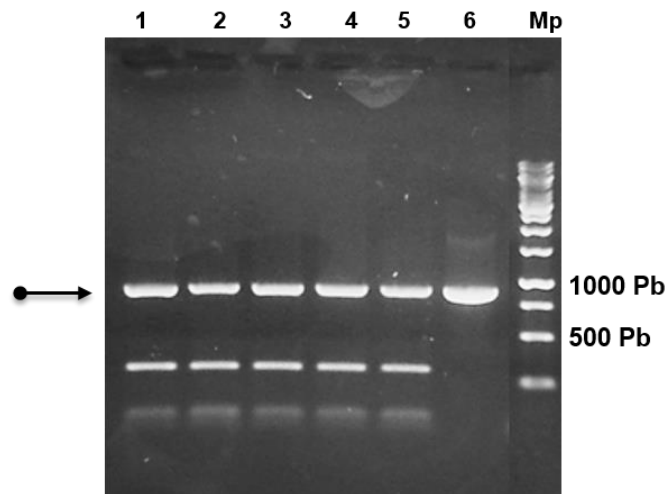
Figura 8. Visualización del inserto *aiiA* del constructo pColdIV-*aiiA* de *Bt*. MP: 1Kb (Fermentas), Línea 1: 40 μ l digestión *Xba*I/*Nde*I y secuencia del inserto *aiiA* de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₁₆



Con base en este inserto se realizó la *Ep-PCR*. De los protocolos de reacción realizados (Tabla 5) se encontró amplificados en todos. Sin embargo durante las réplicas, solo el protocolo 6 registró un amplificado alrededor del peso molecular

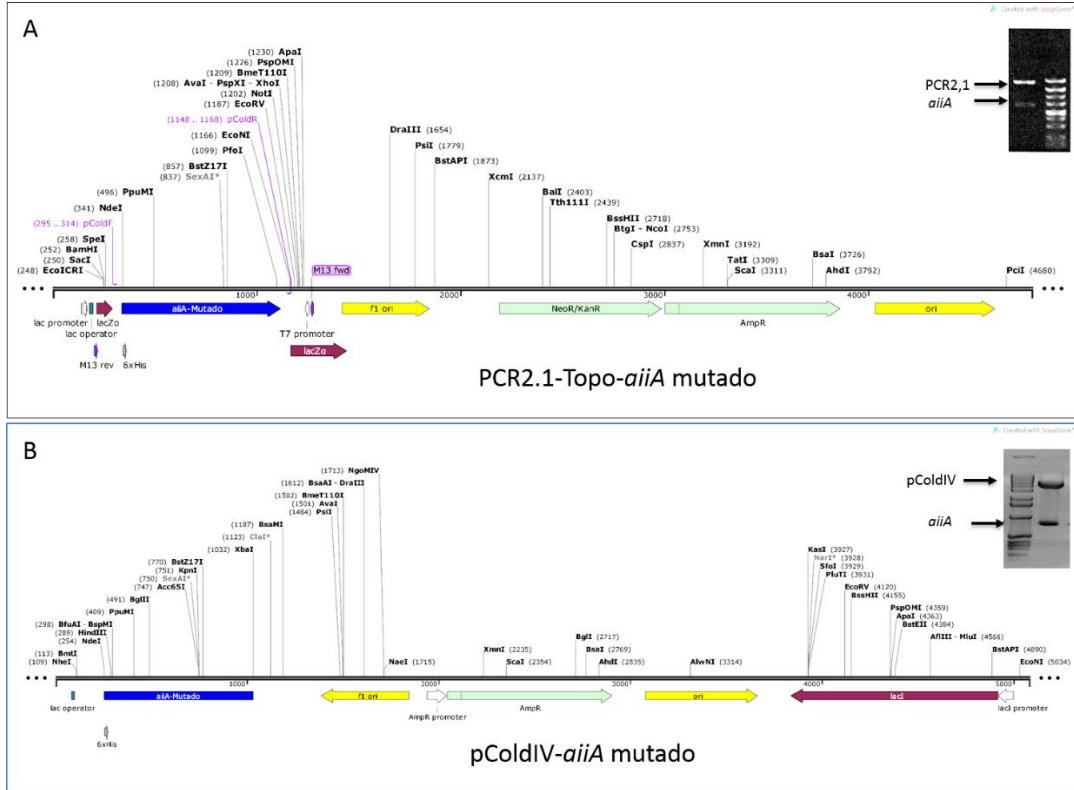
esperado, así como reproducibilidad en los resultados, siendo este seleccionado para la elaboración de la librería. La figura 9 muestra los amplificadores obtenidos en cada uno de los ensayos realizados con el protocolo 6.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%P/V. Línea 1-5: productos de amplificación por Error Prone PCR de *aiiA* de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ utilizando protocolo de reacción P6. Línea 6: Control positivo de amplificación, Constructo pColdIV-*aiiA* (PCR sin modificaciones) y Mp: Marcador de peso de 1Kb (Fermentas).



Los amplificadores alrededor de 750 pb se clonaron en el vector de clonación PCR 2.1. A partir de este constructo se sub clonaron los insertos en pColdIV, utilizando enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI* (Figura 10).

Figura 10: Constructos obtenidos por clonación a partir de los amplificadores obtenidos por *Error Prone PCR*.

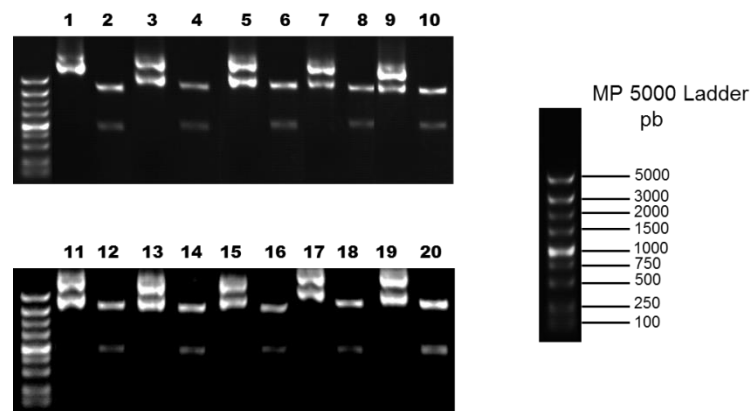


Los constructos se transformaron en células de expresión *E. coli* DE3BL21. Para verificar el estado de la librería obtenida se seleccionaron 10 clones.

De cada variante se confirmó la presencia del inserto. En los 10 clones se obtuvo un inserto de alrededor de 800 pb y un fragmento correspondiente al plásmido pColdIV de 5000 pb (Figura 11).

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para las restricciones *Xba*I/*Nde*I de las variantes tamizadas.

Variante 851: Línea 1: Plásmido sin digerir (PSD); Línea 2: Plásmido Digerido (PD); **Variante 852:** Línea 3: PSD, Línea 4: PD; **Variante 944:** Línea 5: PSD, Línea 6: PD; **Variante 945:** Línea 7: PSD, Línea 8: PD; **Variante 946:** Línea 9: PSD, Línea 10: PD; **Variante 947:** Línea 11: PSD, Línea 12: PD; **Variante 948:** Línea 13: PSD, Línea 14 PD; **Variante 949:** Línea 15: PSD, Línea 16 PD; **Variante 950:** Línea 17: PSD, Línea 18: PD; **Variante 951:** Línea 19: PSD, Línea 20: PD.



La presencia de insertos fueron similares en tamaño (~800pb) y los resultados de secuenciación y análisis Blast se describen en la (Tabla 8).

Tabla 8: Porcentajes de identidad obtenidos en el NCBI, utilizando la herramienta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para cada una de las variantes secuenciadas.

VARIANTE	% Identidad	Gen
851	97%	<i>Aiia. Bacillus thuringiensis serovar. aizawai</i>
852	97%	<i>Aiia Bacillus thuringiensis serovar. kurstaki</i>
944	97%	<i>Aiia Bacillus thuringiensis serovar. aizawai</i>
945	97%	<i>Aiia Bacillus thuringiensis serovar. kurstaki</i>
946	97%	<i>Aiia Bacillus thuringiensis serovar. indiana</i>
947	98%	<i>Aiia. Bacillus thuringiensis strain KCTC1507</i>
948	97%	<i>Aiia. Bacillus thuringiensis</i>
949	97%	<i>Aiia. Bacillus thuringiensis</i>
950	97%	<i>Aiia Bacillus thuringiensis serovar. kurstaki</i>
951	97%	<i>Aiia. Bacillus thuringiensis strain KCTC1507</i>

Para elucidar la ubicación de las mutaciones añadidas en cada uno de los mutantes obtenidos, se realizó un análisis múltiple de secuencias utilizando la secuencia *aiiA* nativa. Se observó que las variaciones se añadieron en su mayoría entre las posiciones 650 y 750 de los genes amplificados (Figura 12). Dentro de los cambios encontrados en cada una de las secuencias se identificaron transversiones y transiciones con una tasa de 0,020. Ninguno presentó deleciones en su secuencia (Tabla 9). Estas variaciones incorporadas presentaron una tendencia por los cambios A-T y T-A especialmente en la posición 744-753 de las variantes 851 y 852; además 8 de los 10 variantes analizados presentaron una inserción de TAA en el 3' del gen (Tabla 9, Figura 12).

Tabla 9: Descripción detallada del tipo de mutaciones encontradas en cada uno de las variantes analizadas.

Variante	Posición	Inserción	Mutación puntual	% Mutación
EPP851	754-755	AA	G273A T651C 654-656: ACG/CGT T659A 663-664: AG/GA 666-667: AG/GT 669-672: TGTG/GTGA 678-681: AGAG/GAGA A684C C686A A688T T690A A691T 695-696: TC/CT T699G 701-716: GTCATGATATAGAGCA/TCATGATATAGAGCAG G718A 722-725:AGAG/GAGT 727-735: TGTAGAGTG/GTAGAGTGT 737-738: TC/CT C740G G742A 744-753: ATATATATAG/TATATATAGT	9.6%
EPP852	754-755	AA	G718A 722-725:AGAG/GAGT 727-735:TGTAGAGTG/GTAGAGTGT T737C C740G G742A 744-753:ATATATATAG/TATATATAGT	3.85%
EPP944	754-756	TAA	T321C A323G A572G T577C	0.92%
EPP945	754-756	TAA	A315G	0.53%
EPP946	754-756	TAA	T318C	0.66%

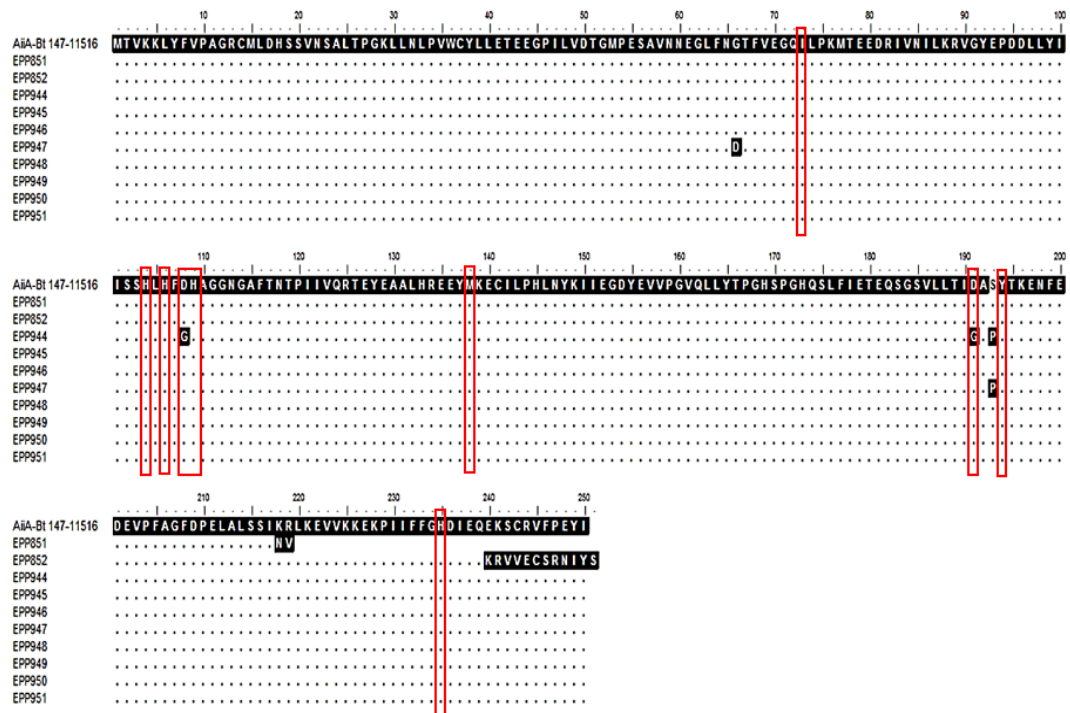
			A390G	
EPP947	754-756	TAA	G197A T577C	0.66%
EPP948	754-756	TAA		0.39%
EPP949	754-756	TAA		0.39%
EPP950	754-756	TAA		0.39%
EPP951	754-756	TAA	A33G	0.53%

Del análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de cada una de las variantes seleccionadas, se encontró que la variante 851 presentó un cambio en el marco de lectura generando un codón de parada en la posición 220 que se tradujo en una proteína más corta (24.4 kDa=219 aminoácidos), con ausencia de 31 aminoácidos en el extremo carboxi terminal. La variante 852 contiene una proteína de 251 aminoácidos (28.3 kDa), con inserción de una Serina y bloque de 10 aminoácidos consecutivos diferentes de la nativa (240-KRVVECSRNIY-250) en el extremo carboxi terminal. La variante 944 presentó sustituciones en las posiciones D¹⁰⁸G, D¹⁹¹G y S¹⁹³P y la variante 947 a su vez presentó sustituciones G⁶⁶⁰D y S¹⁹³P. Las variantes 945, 946, 948, 949, 950 y 951 no presentaron cambios respecto de la proteína nativa (Tabla 10 y Figura 13).

Tabla 10: Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de cada uno de las variantes tamizadas.

Variante	Aminoácidos	Peso		Mutación puntual	Delección
		Molecular	Inserción		
851	219	24.4 kDa	-----	K218N--R219N	220-250 (30 aa)
852	251	28.3 kDa	S251	240-250: EKSCRVFPEYI/KRVVECSRNIY	-----
944	250	28.1 kDa		D108G--D191G--S193P	
945	250	28.2 kDa	----	-----	-----
946	250	28.2 kDa	-----	-----	-----
947	250	28.3 kDa	-----	G66D--S193P	-----
948	250	28.2 kDa	-----	-----	-----
949	250	28.2 kDa	-----	-----	-----
950	250	28.2 kDa	-----	-----	-----
951	250	28.2 kDa	-----	-----	-----

Figura 13. Alineamiento entre las secuencias de la lactonasa AiiA de *Bt*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ y cada una de las variantes seleccionadas. Los puntos corresponden a las similitudes entre las secuencias. Los cuadros señalan los sitios conservados asociados con la actividad catalítica de la lactonasa.



6.2 TAMIZAJE CUALITATIVO DE LA ACTIVIDAD LACTONASA PARA LAS VARIANTES SELECCIONADAS EN PRESENCIA DE BIOSENSORES

Con el fin de determinar la actividad de las variantes seleccionadas, se analizó su capacidad de hidrolizar señales de comunicación celular con AHLs sintéticas (C6-HSL, C8-HSL, C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL) en presencia de biosensores. La Tabla 11 muestra el compendio de los ensayos realizados con ambos biosensores.

Tabla 11: Determinación cualitativa de la actividad catalítica de las variantes frente a señales AHLs en presencia de biosensores

Variante	CVO26		NTL4	
	C6-HSL	C8-HSL	C6-Oxo-HSL	C12-Oxo-HSL
851	++	++	-	-
852	++	++	+	+
944	++	++	-	-
945	++	++	-	-
946	++	++	-	-
947	++	++	-	-
948	++	++	-	-
949	++	++	-	-
950	++	++	-	-
951	++	++	-	-
Control Positivo (Nativa)	++	++	-	-
Control Negativo	-	-	-	-

Este ensayo mostró que de las variantes analizadas, la variante 852 tiene una actividad diferente a la nativa presentando una pigmentación reducida en los ensayos con NTL4 para las AHLs C6-Oxo y C12-Oxo. Para las otras variantes se evidenció un comportamiento similar al control (Tabla 11). Para las pruebas de

atenuación y considerando el análisis de secuencia y el tamizaje cualitativo, se seleccionaron las variantes 851, 852, 944 y 947.

6.3 ENSAYOS DE ATENUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *Pc* EN PAPA

Considerando la actividad catalítica exhibida por cada una de las variantes seleccionadas, se realizó la prueba de atenuación de la pudrición causada por *Pc* en papa. En este ensayo la variante 852 presentó el menor halo de inhibición respecto del control (0,25 mm²) seguido por la variante 947 (2,75 mm²) respecto del control de maceración (55 mm²) (Figuras 14 y 15). La variante 944 (12,5 mm²) presentó menor atenuación de la pudrición.

Figura 14. Ensayos de atenuación de la infección producida por *Pc* en rodajas de papa luego de 48 horas. Los ensayos se realizaron utilizando los sobrenadantes de los cultivos luego de ser inducida la producción de la enzima por IPTG. A. Control, sin inóculo. B. Control positivo de pudrición (*Pc*). C. Atenuación por AiiA nativa. D. variante 851, E. variante 852. Las fotografías son representativas de los ensayos y cada una de sus réplicas.

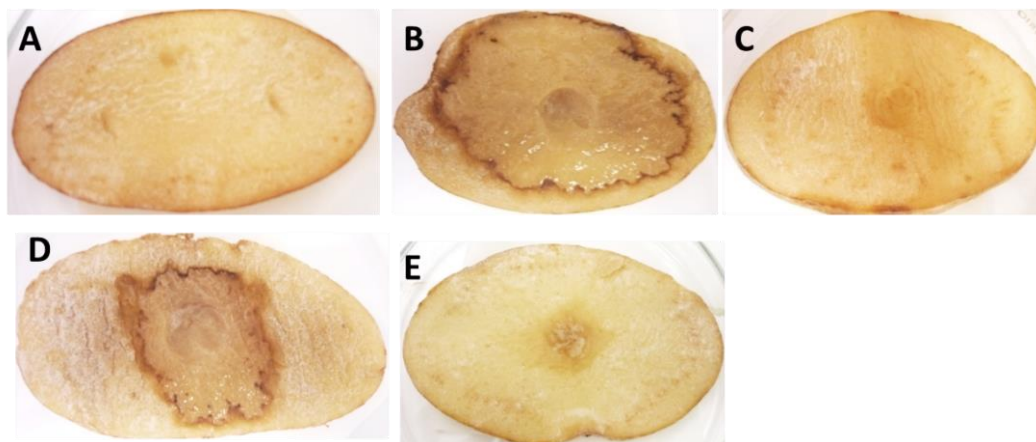
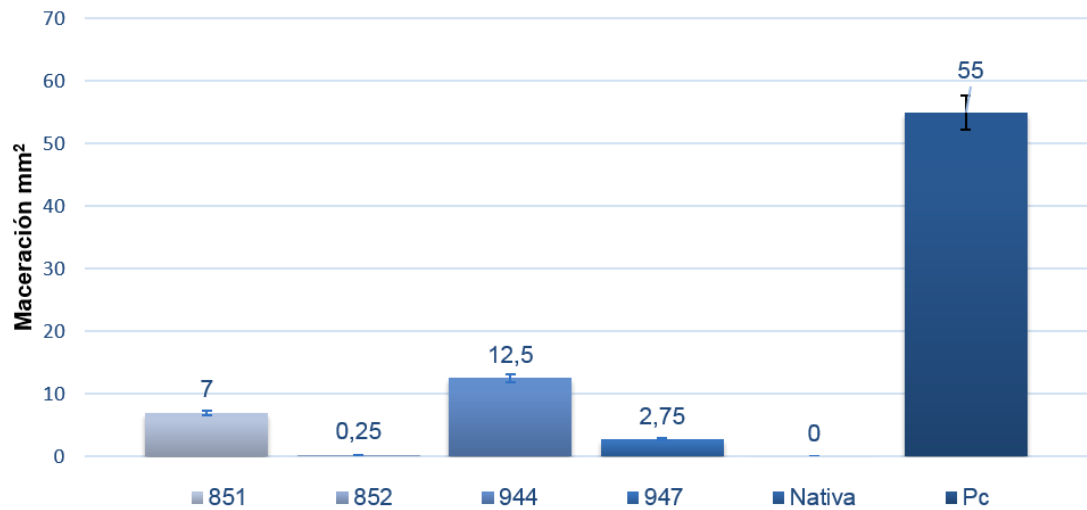


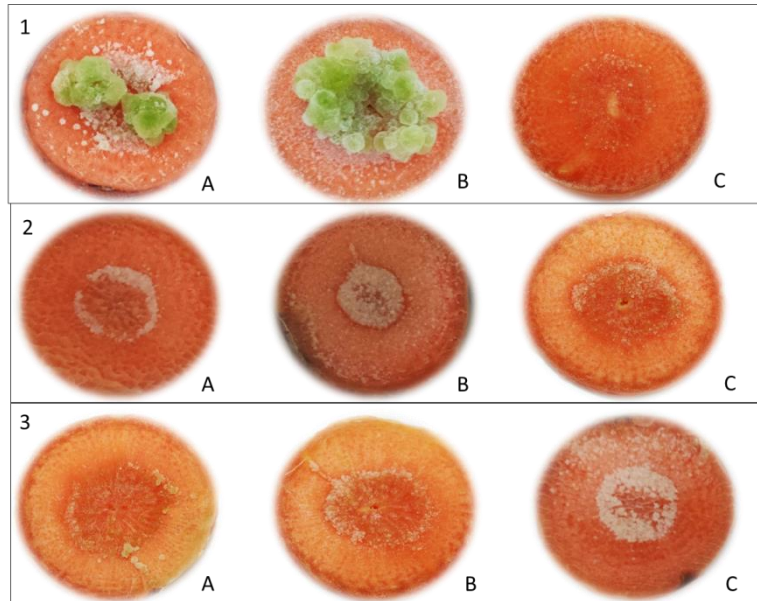
Figura 15. Ensayos de atenuación de la pudrición blanda producida por *Pc* en papa, por las variantes 851, 852, 944, 947 y Nativa como control.



6.3.1 Atenuación de la infección de *A. tumefaciens* C58 y 15955 en zanahoria por la variante 852. Luego de realizar observaciones diarias durante 27 días se estableció que la variante 852 tiene la capacidad de atenuar la formación de tumores generados por cada una de las cepas patógenas de *A. tumefaciens*. A lo largo del periodo de seguimiento se generaron tumores en los controles (Figura 16-Panel 1), luego de 7 días de incubación, mientras que las rodajas tratadas con el control de *Bt* (Figura 16-Panel 2) y la variante 852 (Figura 16-Panel 3) no desarrollaron tumores o alguna señal de infección durante todo el seguimiento.

Figura 16. Atenuación de la variante Epp852 sobre los tumores generados por *A. tumefaciens* C58 y 15955

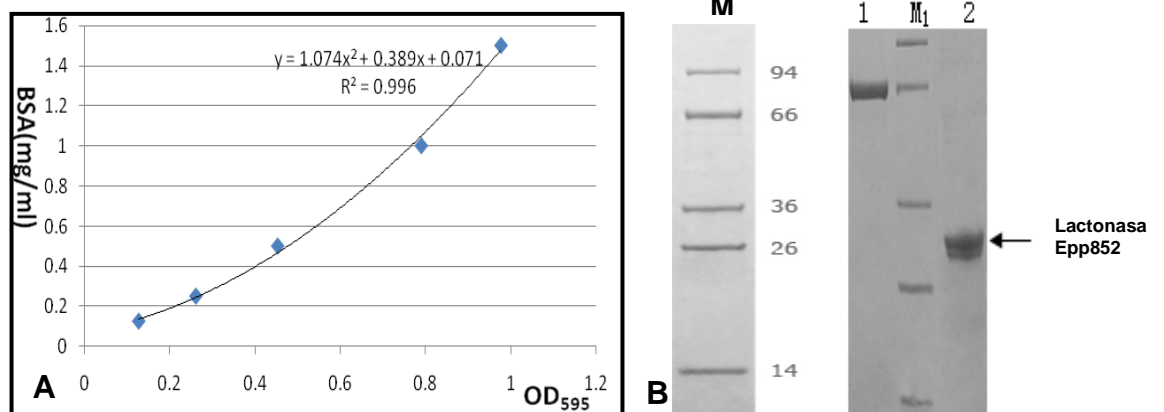
Panel 1: Control de Infección. A) Control de Infección *A. tumefaciens* C58. B) Control de Infección; *A. tumefaciens* 15955 C) Control negativo (Sin inoculo). Panel 2: Ensayos de atenuación, Co cultivo de *Bt*; A) con *A. tumefaciens* C58 B) con *A. tumefaciens* 15955, C) *Bt* 147-11516. Panel 3: Ensayos de atenuación, co cultivo de la variante 852; A) con *A. tumefaciens* C58 B) con *A. tumefaciens* 15955, C) variante 852



6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACTONASA DE LA VARIANTE 852.

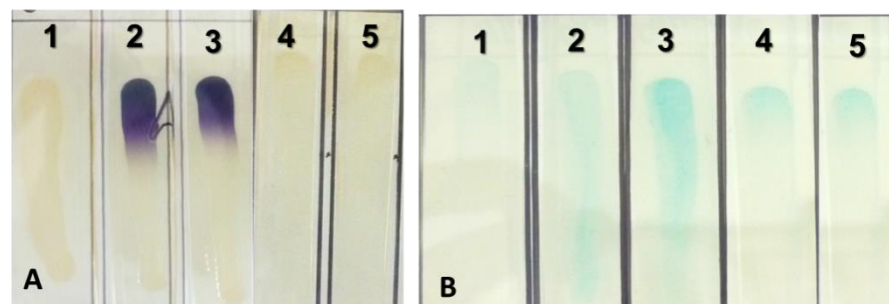
Producto de la purificación se obtuvo 3 mg de proteína con una concentración de 1.50 mg/mL (Figura 17-A) y un 75% de pureza estimada por el análisis densitométrico en gel SDS PAGE teñido con azul de Comassie. Se determinó el peso molecular aproximado de 28,3 kDa (Figura 17-B). La enzima se diluyó y almacenó en buffer (50mM Tris HCl, 150 mM de NaCl, 10% glicerol, pH 8) a -80°C.

Figura 17: A) Curva estándar para la determinación de la concentración de la enzima lactonasa Epp852 por Bradford. B) SDS PAGE teñido con azul de Comassie. (1) BSA 2µg, (M1) Marcador de peso, (2) lactonasa Epp852



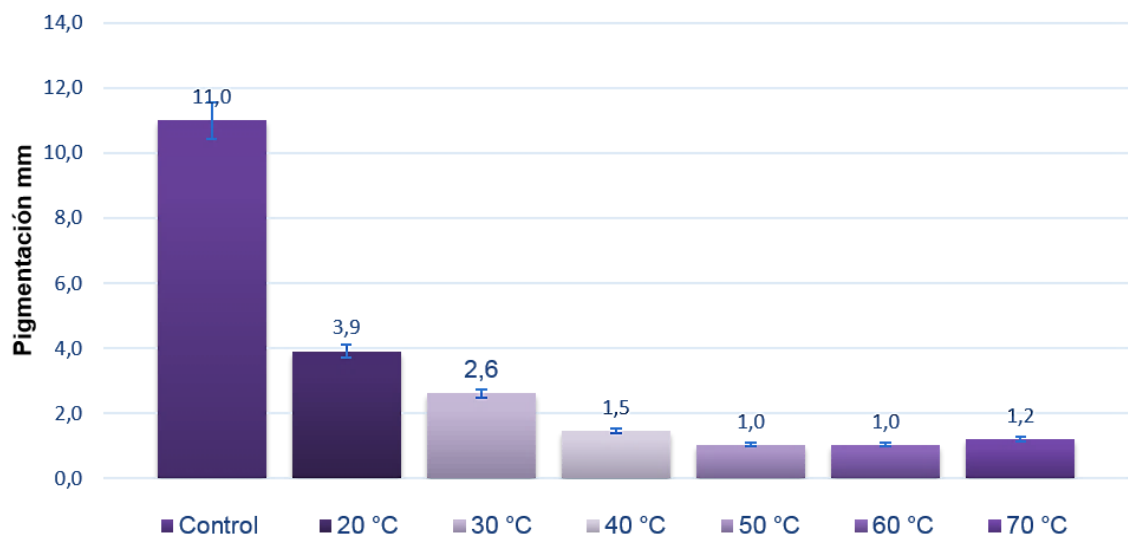
Con la lactonasa purificada se realizó un ensayo cualitativo de actividad catalítica con CV026 y NTL4 siendo esta activa y presentó reducción de la pigmentación en cada uno de los ensayos para C6-HSL, C8-HSL, C6-Oxo-HSL y C12 oxo-HSL, respecto de los controles (Figura 18).

Figura 18. Actividad catalítica indirecta de la lactonasa 852 purificada. A) Ensayo con C6-HSL y C8-HSL. Línea 1. Control CV026 sin AHLs, Línea 2. CV026 en presencia de C6-HSL, Línea 3. CV026 en presencia de C8-HSL. Línea 4. Lactonasa 852 en presencia de C6-HSL, Línea 5. Lactonasa 852 en presencia de C8-HSL. B) Ensayo con C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL. Línea 1. Control NTL4 sin AHLs. Línea 2. Control NTL4 en la detección de C12-Oxo-HSL. Línea 3. Control NTL4 en la detección de C6-Oxo-HSL. Línea 4. Lactonasa 852 en presencia de C6-Oxo-HSL. Línea 5. Lactonasa 852 en presencia de C12-Oxo-HSL.



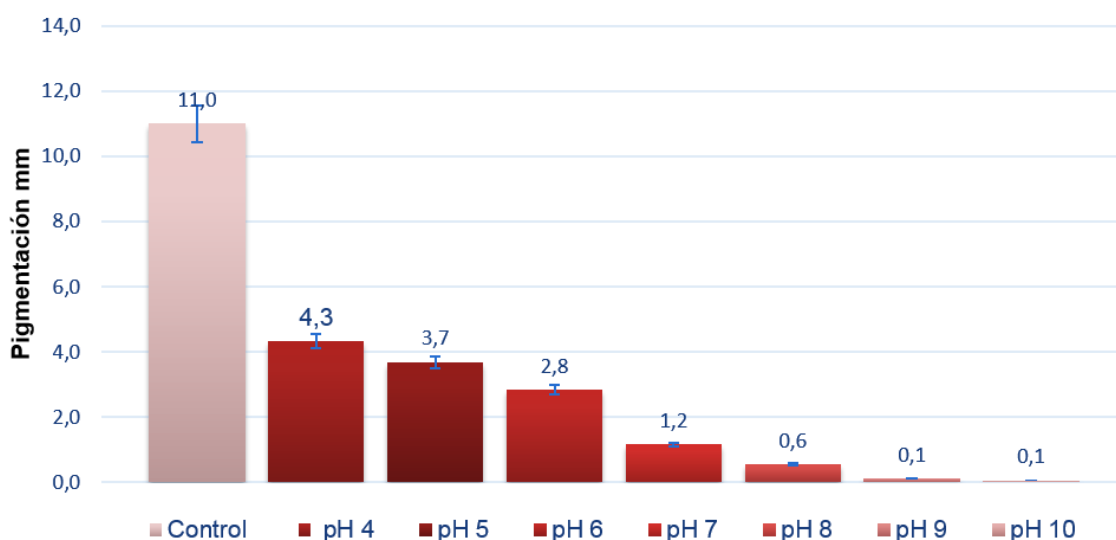
6.4.1 Determinación cualitativa de las condiciones de estabilidad térmica y pH en la actividad de la enzima lactonasa 852. La variante 852 presentó una actividad catalítica reducida a temperaturas menores de 20°C. Entre 40-70°C se observa una mayor hidrólisis del sustrato, representado por la reducción en los halos de pigmentación del biosensor al usarse C8-HSL como sustrato (Figura 19).

Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la lactonasa 852 medida por los diámetros de pigmentación del biosensor CV026 utilizando C8-HSL como sustrato.



La lactonasa 852 presentó una ligera pigmentación a pH 4 y 5 en presencia del biosensor CV026 frente a C8-HSL. A pH 6 su actividad aumentó en un 75%. Entre pH7-10 se presentó una baja producción de pigmentación cuando se empleó el biosensor CV026 (Figura 20).

Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad de la lactonasa 852 medida por los diámetros de pigmentación del biosensor CV026, utilizando C8-HSL como sustrato.



6.5 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD LACTONASA 852 POR HPLC-MS

6.5.1 Evaluación de la actividad de hidrólisis de la enzima lactonasa 852. Se estableció la reacción enzimática de 10 minutos, pues se determinó que transcurrido este tiempo se ha hidrolizado el 10% del sustrato. La lactonasa 852 tuvo una actividad de $0,9 \text{ mmol}/\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}$ para C8-HSL y $0,8 \text{ mmol}/\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}$ para C6-oxo-HSL, utilizando $0,25 \text{ mM}$ de cada sustrato. Para la C12-Oxo-HSL, se obtuvo una actividad de $21490,2 \text{ mmol}/\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}$. Para este sustrato fue necesario añadir 10 mM para observar hidrólisis.

6.5.2 Cuantificación de AHLs por HPLC-MS. La cuantificación de las AHLs no hidrolizadas por la enzima lactonasa 852 se realizó mediante HPLC-MS. Para la extracción de las AHLs se utilizó acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico $0,1\% \text{ p/v}$.

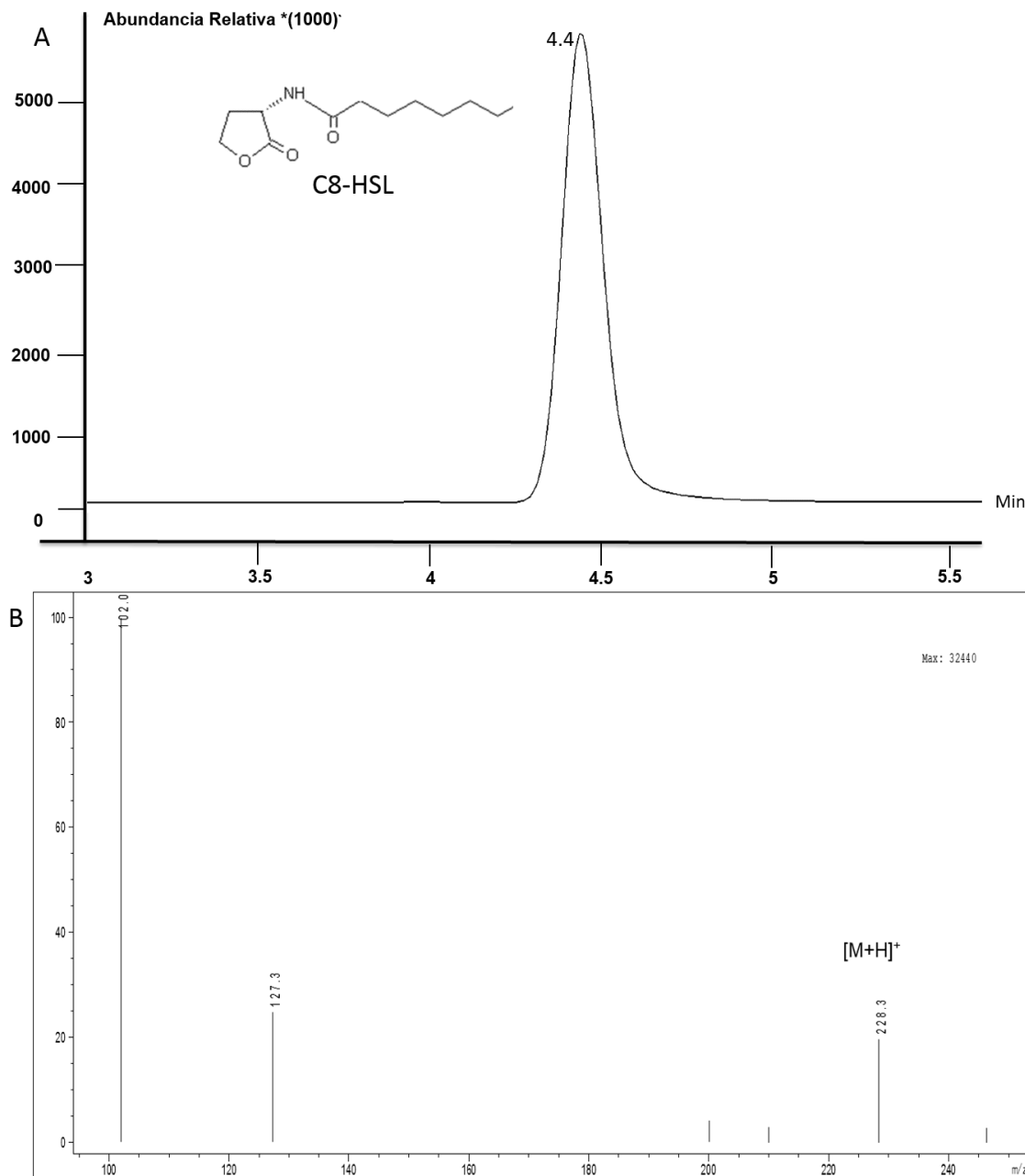
La solución de elución fue metanol: acetato de amonio-ácido fórmico y se trabajó en una proporción de 1:1 según los parámetros establecidos en la Tabla 6. Se seleccionaron los iones de cada sustrato C8-HSL, C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL que se encontraban en mayor abundancia (Tabla 12). El ion de interés fue $[M+H+H_2O]^+$ el cual corresponde a la ganancia de agua, la cual se incorpora al anillo lactona una vez ha ocurrido la hidrólisis enzimática.

Tabla 12: Espectro de Iones detectado para cada una de las AHLs analizadas.

IONES <i>m/z</i>	AHLs		
	C8-HSL	C6-Oxo-HSL	C12-Oxo-HSL
[M+H]	228	214	298
[M+H+H ₂ O]	246	232	316
[M+H-H ₂ O]	210	196	280

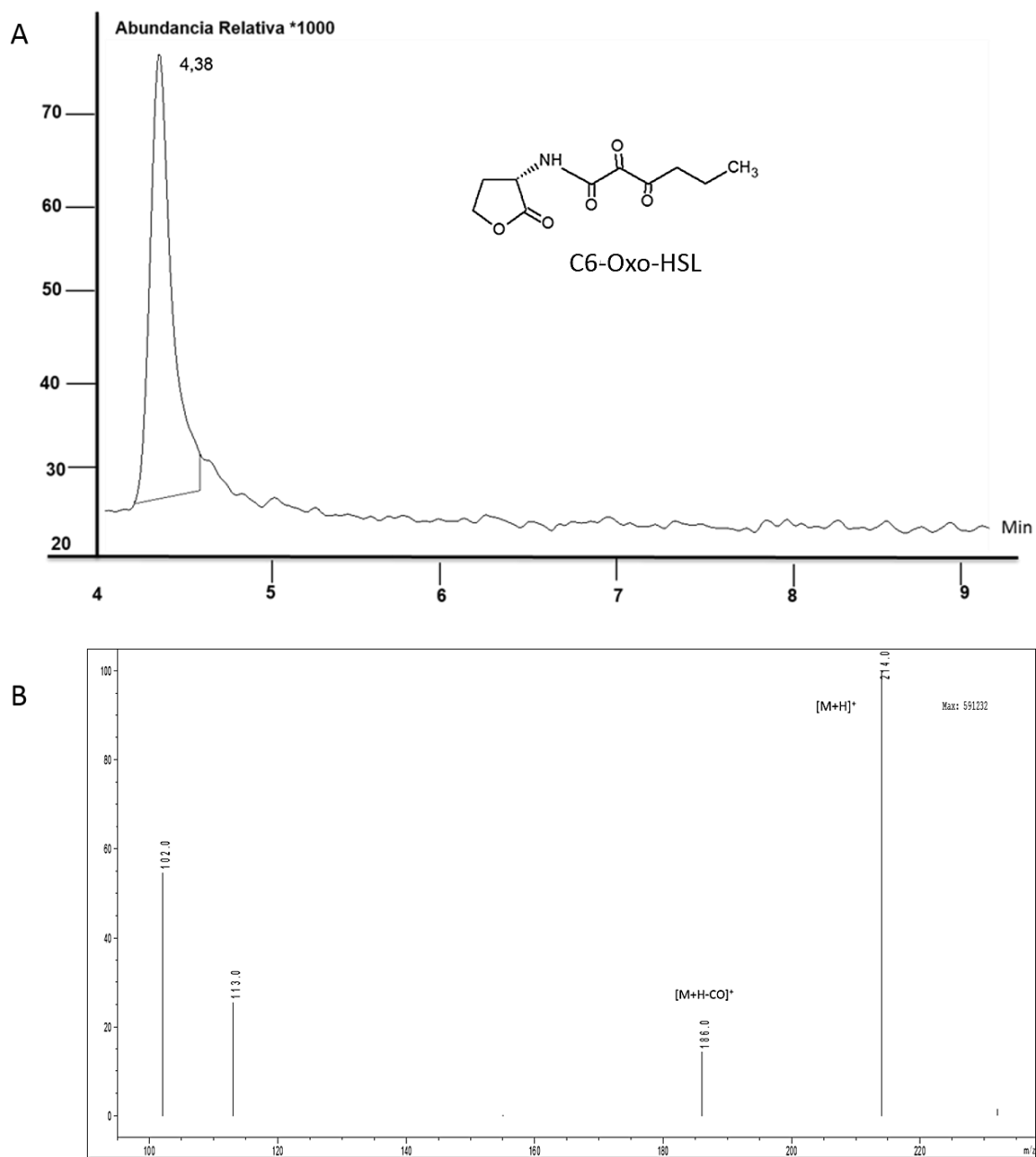
Para C8-HSL se encontró un tiempo de retención de 4,43 minutos (Figura 15). Los iones presentes en la fracción de HPLC a los 4,43 minutos corresponden a los iones detallados en la tabla 11 para este sustrato (Figura 21 Literal B). El ion con una *m/z* de 228,3 corresponde a C8-HSL+ H⁺.

Figura 21: Cromatograma para C8-HSL con el tiempo de retención en minutos. Las condiciones cromatográficas están descritas en la tabla 5 y los iones seleccionados en la tabla 11. A) Espectro de Masas ESI-MS de C8-HSL. B) Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 4,43 minutos



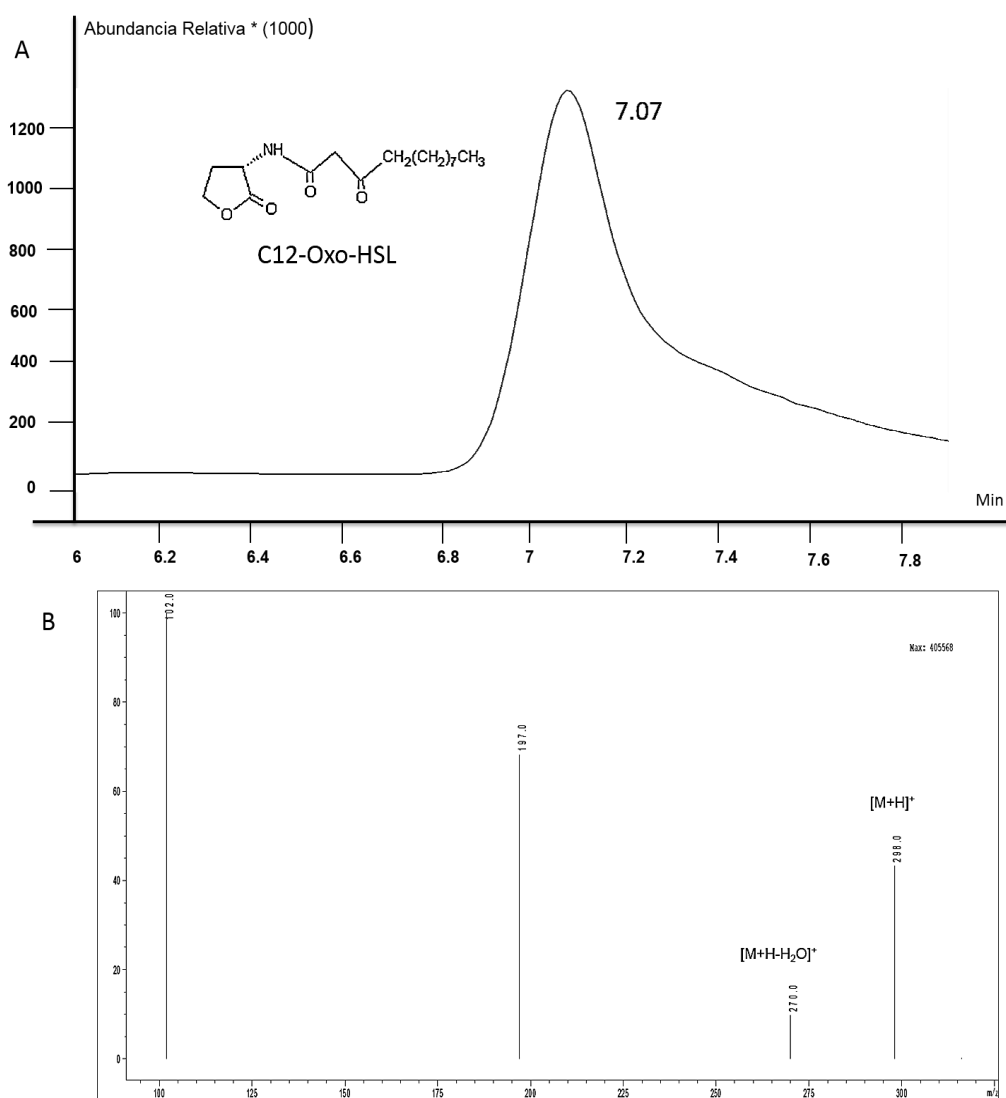
Para C6-Oxo-HSL el tiempo de retención fue de 4,38 minutos, los iones detectados en la fracción de HPLC para este sustrato muestran un m/z de 214 que corresponde a C6-Oxo-HSL+ H⁺ (Figura 22).

Figura 22. Cromatograma para C6-Oxo-HSL, con su tiempo de retención en minutos. A) Espectro de Masas HPLC-MS de C6-Oxo-HSL. B) Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 4,38 minutos.



Para C12-Oxo- HSL el tiempo de retención fue de 7.07 minutos. Los Iones detectados corresponden a los descritos en la tabla 11, resaltando el ion con un m/z 298 que corresponde al sustrato sin hidrolizar (Figura 23).

Figura 23. Cromatograma para C12-Oxo-HSL y tiempo de retención en minutos. A- Espectro de Masas HPLC-MS de C12- Oxo- HSL. B- Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 7.07 minutos



Una vez se estableció los tiempos de retención para cada uno de los sustratos a evaluar se procedió a evidenciar la hidrólisis de cada una de estas moléculas por la

lactonasa 852. Se determinó el ion m/z que incluyó un valor adicional de 18 y que corresponde a la adición de una molécula de agua a la estructura de la Lactona. Es así como se detectó para C8-HSL un ion m/z de 246 (Figura 24), para C6-Oxo un ion m/z de 232 (figura 25) y para C12-Oxo un ion m/z de 316 (Figura 26).

Figura 24. Espectro de Masas HPLC-MS de C8-HSL. Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 3.9 minutos. El ion con una m/z de 246.3 corresponde a la hidrólisis presentada por la acción de la Lactonasa 852 para C8-HSL. El ion con una m/z de 228.3 corresponde a C8-HSL + H⁺ remanente de la hidrólisis.

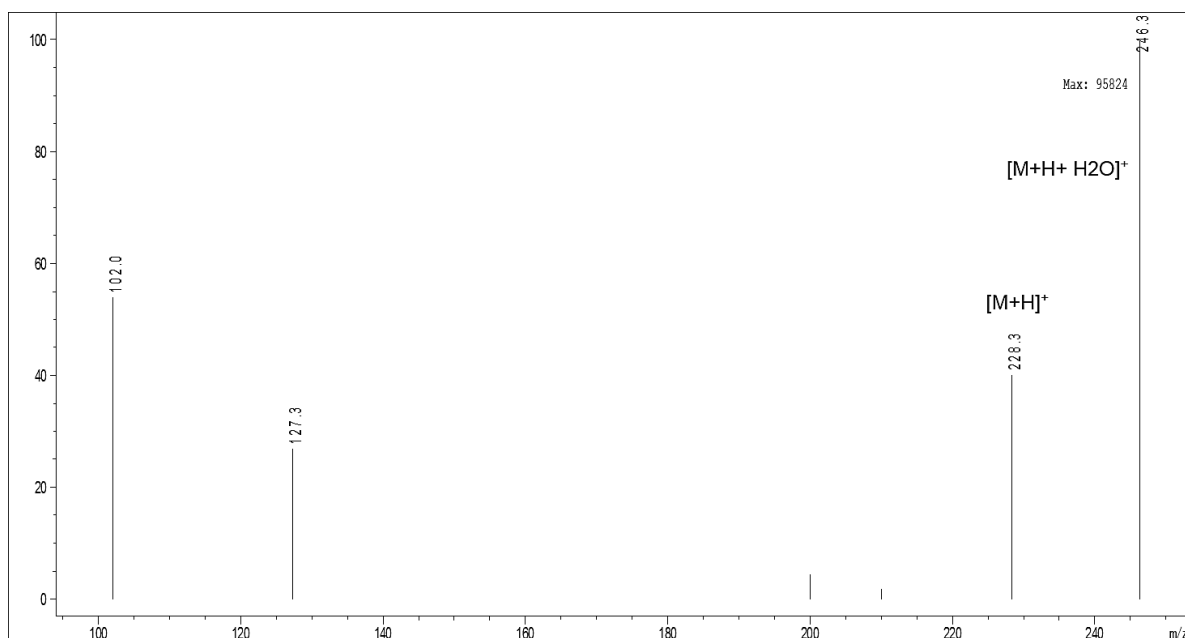


Figura 25. Espectro de Masas HPLC-MS de C6-Oxo-HSL. Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 4.36 minutos. El ion con una m/z de 232 corresponde a la hidrólisis presentada por la acción de la Lactonasa Epp852. El ion con una m/z de 214 corresponde a C6-Oxo-HSL + H⁺ remanente de la hidrólisis.

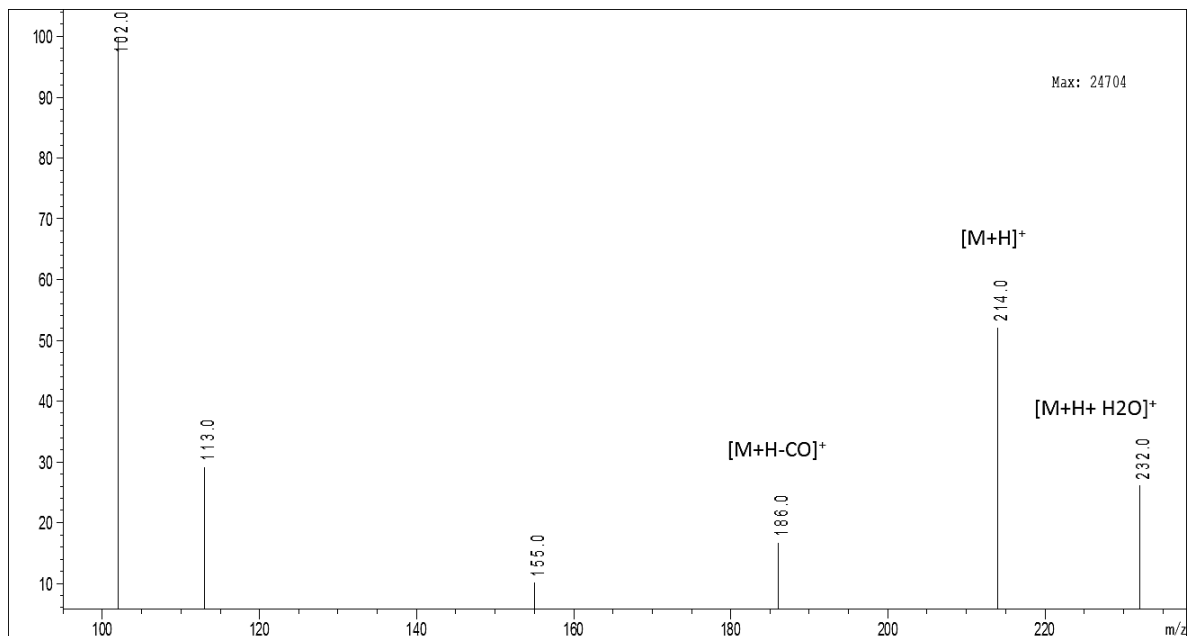
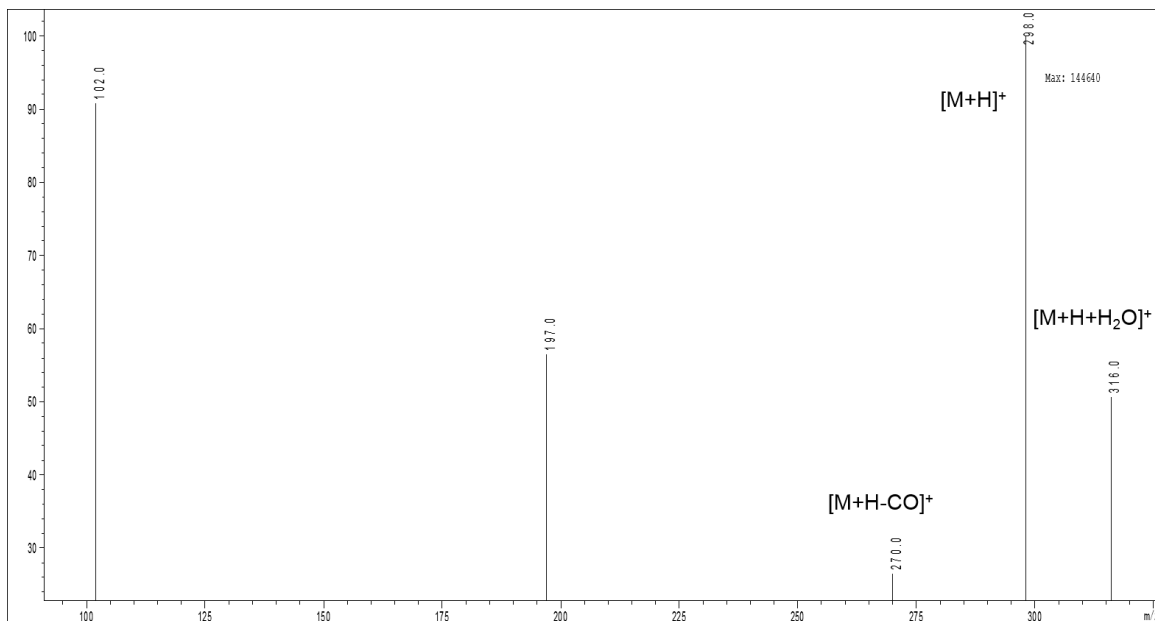
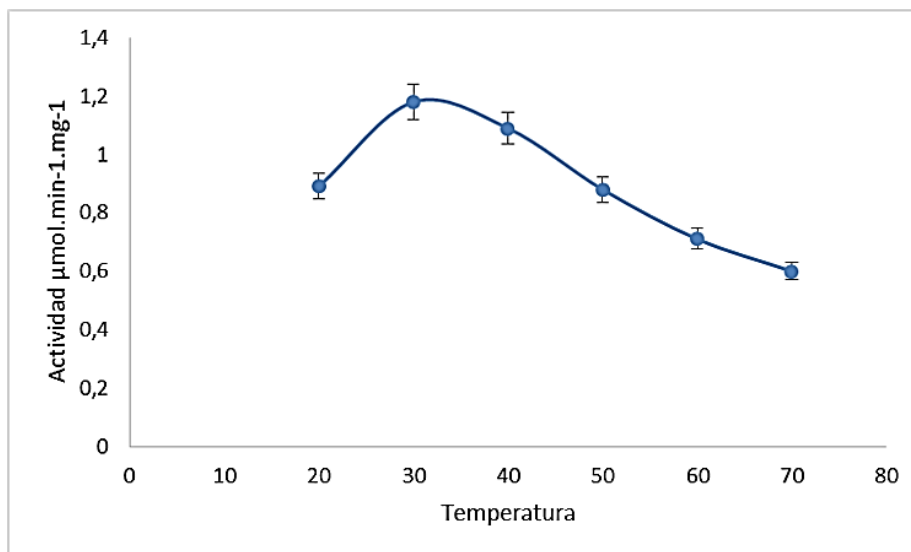


Figura 26. Espectro de Masas HPLC-MS de C12- Oxo- HSL. Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 6.1 minutos El ion con una m/z de 316.0 corresponde a la hidrólisis presentada por la acción de la Lactonasa Epp852 para C12-Oxo-HSL. El ion con una m/z de 298.0 corresponde a C12 Oxo-HSL+H⁺ remanente de la hidrólisis. El ion con una m/z de 270 corresponde a M+H-CO.



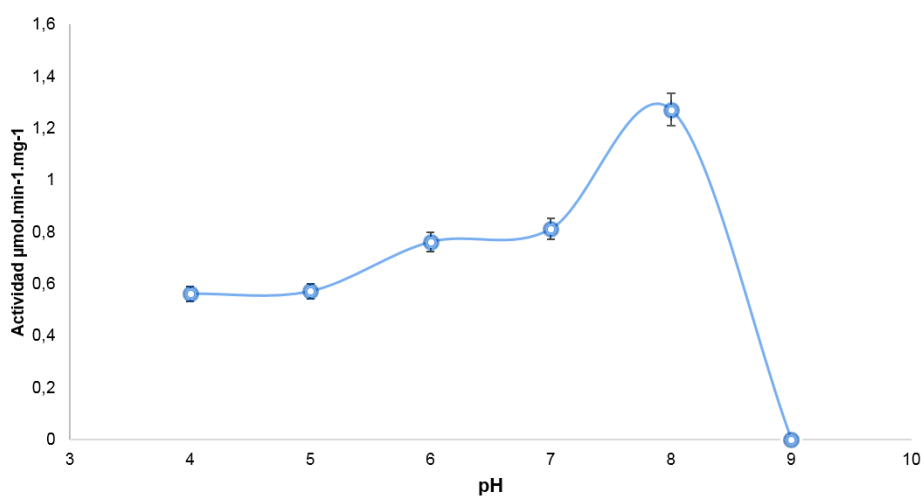
6.5.3 Evaluación de la estabilidad térmica de la variante 852. La variante 852 presentó actividad entre 20 a 70°C con mayor estabilidad a 30°C y a 70°C y un 2% de hidrólisis del sustrato según la señal C8-HSL y los remanentes cuantificados por HPLC (Figura 27). No se observó hidrólisis en los controles negativos.

Figura 27. Determinación de la estabilidad térmica de lactonasa 852. La enzima hidrolizó C8-HSL a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70°C) durante 10 minutos. El tiempo de incubación de la enzima fue de 2 horas en Tris HCl 100 mM (pH 7.4).



6.5.4 Evaluación de la estabilidad de la variante 852 a diferentes pH. Se determinó la actividad para un rango de pH de 4 a 8 siendo C8-HSL el sustrato en cada ensayo. Se registró actividad enzimática desde pH 4 ($0,56 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}$) la cual fue aumentando, alcanzando su óptimo a pH 8 ($1,27 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}$). A pH 9 se encontró lactonólisis en un 78% del sustrato. Al calcular la actividad de la enzima a este pH, la hidrólisis observada es producto del pH y no de la enzima, así mismo, los controles también presentaron este comportamiento (Figura 28).

Figura 28. Efecto del pH en la actividad de la lactonasa 852. La actividad fue evaluada con el buffer Tris HCl 100 mM a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) usando C8-HSL como sustrato.



6.5.5 Cinética y especificidad de la variante 852. La lactonasa mostró actividad catalítica para AHLs de cadena larga y corta con y sin modificaciones oxo en la cadena lateral. Los valores de K_m se calcularon para C8-HSL de 12,66 y 4,83 para C6-Oxo HSL (Tabla 13). Para C12-Oxo no se realizó la estimación de los parámetros cinéticos, pues aunque la enzima es capaz de hidrolizarla, requirió concentraciones altas de sustrato (10mM).

Tabla 13. Parámetros cinéticos de la lactonasa 852 para C8-HSL y C6-Oxo-HSL

AHLs	<i>K_m</i> (mM)	<i>K_{cat}</i>(S⁻¹)	<i>K_{cat}</i>/<i>K_m</i> (mM⁻¹S⁻¹)
C8-HSL	12,66	6,2*10 ⁵	4,9*10 ⁴
C6-Oxo-HSL	4,86	5,3*10 ⁴	1,1*10 ⁴

7. DISCUSIÓN

Las lactonasas AiiA reaccionan ante una amplia diversidad de señales QQ definidas por las características estructurales y catalíticas que poseen, así como de los residuos y motivos conservados asociados a la actividad (Dong, Gusti et al. 2002, Kim, Choi et al. 2005, Liu, Lepore et al. 2005, Liu, Momb et al. 2008, Momb, Wang et al. 2008, Huma, Shankar et al. 2011, Thomas and Fast 2011, Elias and Tawfik 2012, Mascarenhas, Thomas et al. 2015). Debido a ello, su aplicación depende de la capacidad de interferir señales específicas de QS reduciendo el grado de perturbación en las poblaciones microbianas. Una posibilidad de interferir señales es modificando las enzimas mediante ingeniería de proteínas y estudios en evolución dirigida que se enfocan en obtener proteínas con propiedades mejoradas (Chow, Wu et al. 2009, Khersonsky, Rosenblat et al. 2009, Chow, Xue et al. 2010, Draganov 2010, Merone, Mandrich et al. 2010, Zhang, An et al. 2012). En este trabajo se reporta la obtención de variantes de la lactonasa AiiA₁₄₇₋₁₁₅₁₆ de *Bt* por *Error Prone PCR* y la caracterización de la variante 852, la cual mostró mejores propiedades catalíticas con respecto a la enzima nativa.

La lactonasa 852 conserva la homología con las lactonasas descritas por (Pedroza, Florez et al. 2014) y (Wang, Weng et al. 2004) y así mismo, mantiene sin cambios el motivo His¹⁰⁴-His¹⁰⁶ – Asp¹⁰⁸ -His¹⁰⁹ - Asp¹⁹¹ -His²³⁵ el cual se sabe tiene un papel fundamental en la interacción entre el sitio activo y el sustrato (Liu, Momb et al. 2008). Además presenta el residuo Tyr¹⁹⁴ que es necesario en la unión con el oxígeno del enlace éster de las AHLs (Momb, Wang et al. 2008) y los residuos Ile⁷³ y Met¹³⁸ los cuales se han descrito hacen parte de los canales hidrofóbicos que interactúan con el sustrato en el proceso catalítico (Kim, Choi et al. 2005, Liu, Lepore et al. 2005) (Figura 13). Sin embargo, la variante 852 tiene a diferencia de la nativa, una Ser²⁵¹ y una variación de 10 residuos consecutivos 240-KRVVECSRNIYS-250 (Figura 13), que de acuerdo estudios previos en la lactonasa AiiA_{AI96} descrita por Cao y colaboradores (2012), las variaciones en los residuos corriente arriba y abajo del sitio catalítico puede llevar a cambios sutiles en el

plegamiento de la proteína afectando la estructura y función de la enzima (Cao, He et al. 2012). Para la variante 852, estas sustituciones pueden relacionarse con los cambios que se produjeron en el pH y la actividad catalítica con respecto a la nativa más no así con la temperatura que se mantuvo estable. En el caso del pH, la variante 852 conservó su actividad óptima a pH 8 siendo igual a la nativa. Sin embargo, a pH 5 la actividad fue 1,5 veces mayor que la nativa y además, se detectó una actividad de $0,56 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}$ a pH 4 (Figura 28). Estos resultados difieren incluso de la lactonasa 240B1 pues por debajo de pH 6 la actividad cae drásticamente debido al cambio conformacional en la estructura de la proteína (Wang, Weng et al. 2004). De acuerdo a estos resultados, la variante 852 es resistente a pH 4 y por tanto una proteína ideal para su aplicación en condiciones adversas.

La lactonólisis fue evidenciada a pH 9 en los controles negativos por lo que no fue posible detectar actividad catalítica de la variante 852. Este mismo comportamiento fue evidenciado con la lactonasa ¹⁴⁷⁻¹¹⁵¹⁶ nativa (Pedroza, Florez et al. 2014) pero difiere de los hallazgos de (Wang, Weng et al. 2004), pues si bien detectaron lactonólisis, fue posible determinar la actividad de la lactonasa 240B1 a pH 9. A excepción de lo evidenciado a pH 4 y 5, la variante 852 mantuvo en el mismo rango de pH descrito para la nativa (Pedroza, Florez et al. 2014) y para la 240B1 (Wang, Weng et al. 2004). Con base en los estudios de (Wang, Weng et al. 2004), el comportamiento a pH4 indica que la ionización de la cadena lateral de la histidina presente en el sitio activo es responsable en mantener la actividad catalítica en este tipo de lactonasas.

En cuanto a temperatura, la variante 852 también mostró actividad biológica entre 20 y 70°C siendo el óptimo a 30°C con C8-HSL como sustrato (Figura 27). A medida que aumentó la temperatura la actividad fue disminuyendo lo cual fue consistente con lo reportado para nativa. Los resultados obtenidos con la proteína purificada en los ensayos de HPLC-MS fueron consistentes con lo demostrado en

los ensayos cualitativos utilizando biosensores. Al comparar la actividad de la variante 852 y la nativa, frente a la lactonasa AiiA_{A196} (Cao, He et al. 2012), se mantiene la estabilidad térmica entre 20 a 70°C, no siendo así para la lactonasa 240B1 en donde la temperatura máxima reportada fue de 45°C (Wang, Weng et al. 2004). Estos resultados indican que la variante 852 conserva su termoestabilidad lo cual es un atributo importante para su aplicación biotecnológica.

Respecto de los parámetros cinéticos, la variante 852 exhibió 3,3 veces menor afinidad a C8-HSL ($K_m = 12,6$) que la nativa ($K_m = 3,81$) (Pedroza, Florez et al. 2014), pero el índice de especificidad aumentó $4,2 \times 10^6$ veces. Esto significa que el complejo enzimático convierte una mayor proporción del sustrato en producto, ya sea porque el sustrato se une más firmemente a la enzima por el K_m (12,6 mM) respecto del K_{cat} o que una mayor proporción del sustrato que se une, se transforma antes de disociarse por el K_{cat} alto ($6,2 \times 10^5 \text{S}^{-1}$) con respecto del K_m (Michaelis, Menten et al. 2011). Estos resultados coinciden con el reporte de Chow y colaboradores (2009) quienes lograron un aumento de la relación K_{cat}/K_m de 30 y 32 veces hacia C8-Oxo-HSL y C6-HSL respecto de la nativa, con la mutante N²⁶⁶Y obtenida por evolución dirigida a partir de una lactonasa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 (Chow, Wu et al. 2009). Además, a partir de una lactonasa de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 y por evolución dirigida, se obtuvo la variante E¹⁰¹N/R²³⁰I la cual registró una eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) 72 veces aumentada hacia C12-Oxo-HSL, respecto de la lactonasa GKL nativa (Chow, Xue et al. 2010). De acuerdo a estos resultados, la variante 852 es más eficiente en la generación de productos a partir de C8-HSL.

Para las otras variantes como la 851 que carece de 30 aminoácidos en el extremo carboxi terminal debido al cambio en el marco abierto de lectura (220 aminoácidos), conservó la actividad hidrolítica para C6-HSL y C8-HSL evidenciada por biosensores. Este comportamiento fue igual a lo reportado para la enzima nativa (Florez, Gonzalez et al. 2014, Pedroza, Florez et al. 2014), así mismo, es consistente con los reportes de las lactonasas descritas por (Park, Lee et al. 2003, Wang, Weng et al. 2004) frente a la hidrólisis de C6-HSL y C8-HSL. Por ser una

proteína más corta esta variante carece del residuo His²³⁵ (Figura 13) el cual está asociado a la interacción entre el sitio activo y el sustrato (Momb, Wang et al. 2008). De hecho, se ha demostrado que una mutación H²³⁵A de la lactonasa reportada por (Kim, Choi et al. 2005) genera una pérdida de actividad del 85%. Para esta variante aunque no se cuantificó su actividad, esta se mantuvo para C6-HSL y C8-HSL en presencia de los biosensores (Tabla 11).

La variante 944 es más larga que la anterior con 250 aminoácidos y un peso molecular deducido de 28,1 kDa. Esta variante presenta tres cambios: D¹⁰⁸G, D¹⁹¹G y S¹⁹³P (Tabla 10, Figura 13) y así mismo presentó actividad frente C6-HSL y C8-HSL en presencia de biosensores (Tabla 11), pero no registró actividad para AHLs de cadenas laterales con modificaciones oxo como C6-Oxo-HSL y C12-Oxo-HSL. Estudios realizados por (Kim, Choi et al. 2005, Momb, Wang et al. 2008) mostraron que las mutaciones D¹⁰⁸A y D¹⁹¹A de la lactonasa AiiA conducen a la pérdida de actividad catalítica pues están involucrados en la interacción enzima-sustrato y son relevantes en la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, las sustituciones en la variante 944, D¹⁰⁸G y D¹⁹¹G aun siendo modificadas con residuos hidrófobos, retienen la actividad enzimática (Tabla 10). Estos hallazgos sugieren que entre lactonasas del mismo género existen diferencias entre residuos conservados asociados a su actividad, que para la lactonasa AiiA descrita por (Kim, Choi et al. 2005, Momb, Wang et al. 2008), los residuos muestran una mayor dependencia a la captación de metales para su actividad catalítica que para el caso de la lactonasa AiiA₁₄₇₋₁₁₅₁₆ no los requiere.

La variante 947 presentó cambios, G⁶⁶D y S¹⁹³P (Tabla 10, Figura 13) y mantuvo actividad similar a la nativa (Tabla 11). Esto indica que las sustituciones no tienen efecto sobre la actividad catalítica en esta proteína. Para las otras variantes, 945, 946, 948, 949, 950 y 951 las mutaciones fueron silenciosas (Tabla 9, Figura 12) obteniendo una proteína idéntica a la parental (Figuras 8 y 13, Tabla 10) y con actividad enzimática en presencia de los biosensores (Tabla 11). Este resultado se atribuye a la técnica de *Ep-PCR*, dónde se pueden obtener secuencias sinónimas o neutrales debido al degeneramiento del código genético (White and Winans 2007,

Copp, Hanson-Manful et al. 2014) y que para el caso de este estudio, el 40% de las variantes presentaron cambios a nivel de proteína.

Todas las variantes evaluadas presentaron atenuación de la infección de la pudrición blanda (Figuras 14 y 15), siendo más activa la enzima nativa seguida por 852, 947, 851 y 944. Estos resultados son coherentes con lo demostrado por Dong y colaboradores donde diversas cepas de *Bacillus sp.*, presentaron capacidad de atenuar la pudrición causada por *Pc* en papa (Dong, Xu et al. 2000). No obstante, la variante 852 también demostró capacidad de atenuar la infección producida por *A. tumefaciens* cepas patógenas C58 y 15955 en rodajas de zanahoria (Figura 16). Estos resultados indican la propiedad que tiene esta variante incluso para reconocer señales AHLs con modificaciones oxo que produce *A. tumefaciens* (White and Winans 2007) (Tabla 11).

8. CONCLUSIONES

- 1) *Ep*-PCR como técnica de evolución dirigida es una herramienta útil en la obtención de variantes. Mediante *Ep*-PCR de la *AiiA*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se logró obtener la lactonasa 852, la cual aumentó el índice de especificidad (K_{cat}/K_m) $4,2 \times 10^6$ veces respecto de la nativa. En contraste, redujo la afinidad para C8-HSL en 3,3. veces respecto de la nativa lo que permite generar productos con mayor eficiencia catalítica Esta variante además de presentar actividad catalítica a pH 4, es termoestable lo que permite su aplicación en condiciones adversas.
- 2) La ausencia del residuo 235 en la variante 851 no afecta la actividad catalítica para C6-HSL y C8-HSL. Esta información es relevante respecto de la importancia de sitios conservados asociados a su función.
- 3) El tipo de sustituciones presentadas en la secuencia de las variantes estuvieron relacionados con la retención de la actividad catalítica en comparación con la nativa. En el caso de la variante 944, hubo variaciones puntuales en residuos que han sido descritos críticos en la actividad catalítica de las lactonasas. Sin embargo, esta variante no presentó diferencias frente a la hidrólisis de C6-HSL y C8-HSL.
- 4) La capacidad de atenuar las infecciones producidas por *Pc* en papa y por *A. tumefaciens* C58 y 15955 en zanahoria permite evidenciar la aplicación de estas variantes como promisorias en el control de enfermedades ocasionadas por fitopatógenos dependientes de QS. A su vez representan un potencial biotecnológico con aplicaciones biomédicas en la inhibición de infecciones mediadas por *Quorum Sensing* de patógenos que regulan sus procesos de virulencia con la producción de señales C6-HSL y C8-HSL lo cual permite el desarrollo de estrategias de atenuación de la infección mediante la producción de nano encapsulados.

9. RECOMENDACIONES

1. La alta eficiencia de la variante 852 y la capacidad de retener actividad a pH ácido (4), la convierten en una candidata ideal para realizar nano encapsulados que contengan esta proteína y poder determinar el efecto que puede tener la enzima inmovilizada sobre patógenos dependientes de *Quorum Sensing* como *Pseudomonas aeruginosa* y perfilar sus aplicaciones biotecnológicas en Biomedicina.
2. Cuantificar la actividad catalítica para las variantes 851 y 944 y establecer todos sus parámetros cinéticos de forma que se pueda establecer la relevancia de las mutaciones obtenidas y profundizar en el conocimiento de las lactonasas y de las implicaciones que estas variaciones representan en su afinidad por los sustratos y actividad QQ.

10. DIVULGACIONES

1. **Rueda N.J.**, Suarez M.O., Romero N., Correa E., Ordúz S. Flórez A.M. Genetic Improvement Of *Aiia* Gene Encoding N-Acyl – HomoserineLactonase From *Bacillus thuringiensis* by Error-Prone PCR. British Council Researcher Links Workshop. Cali, Colombia, Marzo 10–13, 2014.
2. **Rueda, N.J**, Suarez, M.O, Romero, N, Correa, E Orduz, S, Florez, A.M. Genetic Improvement Of *Aiia* Gene Encoding N-Acyl HomoserineLactonase From by Error-Prone PCR . Simposio Internacional de Inhibición de Quorum Sensing, Santiago de Compostela, Universidad de Santiago de Compostela, España, Junio 3-5, 2015.

BIBLIOGRAFIA

Balci, H., M. T. Ozturk, T. Pijning, S. I. Ozturk and F. Gumusel (2014). "Improved activity and pH stability of *E. coli* ATCC 11105 penicillin acylase by error-prone PCR." Appl Microbiol Biotechnol**98**(10): 4467-4477.

Bar-Rogovsky, H., A. Hugenmatter and D. S. Tawfik (2013). "The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases." J Biol Chem**288**(33): 23914-23927.

Barnard, A. M. and G. P. Salmond (2007). "Quorum sensing in *Erwinia* species." Anal Bioanal Chem**387**(2): 415-423.

Basak, S. and R. Jiang (2012). "Enhancing *E. coli* tolerance towards oxidative stress via engineering its global regulator cAMP receptor protein (CRP)." PLoS One**7**(12): e51179.

Bassler, B. L. (1999). "How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing." Curr Opin Microbiol**2**(6): 582-587.

Ben Mabrouk, S., D. Z. Ayadi, H. Ben Hlima and S. Bejar (2013). "Thermostability improvement of maltogenic amylase MAUS149 by error prone PCR." J Biotechnol**168**(4): 601-606.

Bokhove, M., P. Nadal Jimenez, W. J. Quax and B. W. Dijkstra (2010). "The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket." Proc Natl Acad Sci U S A**107**(2): 686-691.

Cao, Y., S. He, Z. Zhou, M. Zhang, W. Mao, H. Zhang and B. Yao (2012). "Orally administered thermostable N-acyl homoserine lactonase from *Bacillus sp.* strain

AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish." Appl Environ Microbiol**78**(6): 1899-1908.

Cobb, R. E., T. Si and H. Zhao (2012). "Directed evolution: an evolving and enabling synthetic biology tool." Curr Opin Chem Biol**16**(3-4): 285-291.

Copp, J. N., P. Hanson-Manful, D. F. Ackerley and W. M. Patrick (2014). "Error-prone PCR and effective generation of gene variant libraries for directed evolution." Methods Mol Biol**1179**: 3-22.

Currin, A., N. Swainston, P. J. Day and D. B. Kell (2015). "Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently." Chem Soc Rev**44**(5): 1172-1239.

Chan, K. G., S. Atkinson, K. Mathee, C. K. Sam, S. R. Chhabra, M. Camara, C. L. Koh and P. Williams (2011). "Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*." BMC Microbiol**11**: 51.

Chen, C. N., C. J. Chen, C. T. Liao and C. Y. Lee (2009). "A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity." BMC Microbiol**9**: 89.

Chen, R., Z. Zhou, Y. Cao, Y. Bai and B. Yao (2010). "High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus sp.* B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture." Microb Cell Fact**9**: 39.

Chong, H., H. Geng, H. Zhang, H. Song, L. Huang and R. Jiang (2014). "Enhancing *E. coli* isobutanol tolerance through engineering its global transcription factor cAMP receptor protein (CRP)." Biotechnol Bioeng**111**(4): 700-708.

Chow, J. Y., L. Wu and W. S. Yew (2009). "Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 in the amidohydrolase superfamily." Biochemistry**48**(20): 4344-4353.

Chow, J. Y., B. Xue, K. H. Lee, A. Tung, L. Wu, R. C. Robinson and W. S. Yew (2010). "Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily." J Biol Chem**285**(52): 40911-40920.

Dong, Y. H., A. R. Gusti, Q. Zhang, J. L. Xu and L. H. Zhang (2002). "Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus species*." Appl Environ Microbiol**68**(4): 1754-1759.

Dong, Y. H., L. H. Wang, J. L. Xu, H. B. Zhang, X. F. Zhang and L. H. Zhang (2001). "Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase." Nature**411**(6839): 813-817.

Dong, Y. H., J. L. Xu, X. Z. Li and L. H. Zhang (2000). "AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*." Proc Natl Acad Sci U S A**97**(7): 3526-3531.

Draganov, D. I. (2010). "Lactonases with organophosphatase activity: structural and evolutionary perspectives." Chem Biol Interact**187**(1-3): 370-372.

Dubern, J. F. and S. P. Diggle (2008). "Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species." Mol Biosyst**4**(9): 882-888.

Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Research,**32**(5): 6.

Elias, M. and D. S. Tawfik (2012). "Divergence and convergence in enzyme evolution: parallel evolution of paraoxonases from quorum-quenching lactonases." J Biol Chem**287**(1): 11-20.

Fetzner, S. (2015). "Quorum quenching enzymes." J Biotechnol**201**: 2-14.

Florez, A. M., A. Gonzalez, C. J. Pedroza, E. Correa, N. J. Rueda and S. Orduz (2014). "Identification, cloning and lactonase activity of recombinant protein of N-acyl homoserine lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis* 147-115-16 strain." Revista Colombiana de Biotecnología**16**(1): 153.

Garcia-Contreras, R., T. Maeda and T. K. Wood (2013). "Resistance to Quorum-Quenching Compounds." Appl. Envir. Microbiol.**79**(22): 6840-6846.

Gonzalez, J. E. and N. D. Keshavan (2006). "Messing with bacterial quorum sensing." Microbiol Mol Biol Rev**70**(4): 859-875.

Goo, E., Y. Kang, H. Kim and I. Hwang (2010). "Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*." J Proteome Res**9**(6): 3184-3199.

Grandclement, C., M. Tannieres, S. Morera, Y. Dessaux and D. D. Faure (2015). "Quorum quenching: role in nature and applied developments." FEMS Microbiol Rev.

Guerra, A. (2013). DISEÑO DE UN MODELO DE INFECCIÓN Y ATENUACIÓN EN *Solanum quitoense* POR *Pectobacterium carotovorum* PARA LA EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS DE SUELO CON ACTIVIDAD LACTONASA O ACILASA, Universidad de Santander, UDES.

Gupta, P., S. Chhibber and K. Harjai (2015). "Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model." Burns**41**(1): 153-162.

Hall A. Thomas (1999). "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98NT." Nucl Acids Symposium series**41**: 4.

Hansen, H., A. A. Purohit, H. K. Leiros, J. A. Johansen, S. J. Kellermann, A. M. Bjelland and N. P. Willassen (2015). "The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida*." BMC Microbiol**15**: 69.

Haudecoeur, E., M. Tannieres, A. Cirou, A. Raffoux, Y. Dessaux and D. Faure (2009). "Different regulation and roles of lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58." Mol Plant Microbe Interact**22**(5): 529-537.

Helman, Y. and L. Chernin (2015). "Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease." Mol Plant Pathol**16**(3): 316-329.

Huang, J. J., A. Petersen, M. Whiteley and J. R. Leadbetter (2006). "Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Appl Environ Microbiol**72**(2): 1190-1197.

Huma, N., P. Shankar, J. Kushwah, A. Bhushan, J. Joshi, T. Mukherjee, S. Raju, H. J. Purohit and V. C. Kalia (2011). "Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (*aiiA*) of *Bacillus*." J Microbiol Biotechnol**21**(10): 1001-1011.

Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool and W. J. Quax (2012). "The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiol Mol Biol Rev**76**(1): 46-65.

Kalia, V. C. (2013). "Quorum sensing inhibitors: an overview." Biotechnol Adv**31**(2): 224-245.

Ke, X., L. C. Miller and B. L. Bassler (2015). "Determinants governing ligand specificity of the *Vibrio harveyi* LuxN quorum-sensing receptor." Mol Microbiol**95**(1): 127-142.

Khersonsky, O., M. Rosenblat, L. Toker, S. Yacobson, A. Hugenmatter, I. Silman, J. L. Sussman, M. Aviram and D. S. Tawfik (2009). "Directed evolution of serum paraoxonase PON3 by family shuffling and ancestor/consensus mutagenesis, and its biochemical characterization." Biochemistry**48**(28): 6644-6654.

Kim, M. H., W. C. Choi, H. O. Kang, J. S. Lee, B. S. Kang, K. J. Kim, Z. S. Derewenda, T. K. Oh, C. H. Lee and J. K. Lee (2005). "The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(49): 17606-17611.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature**227**(5259): 680-685.

LaSarre, B. and M. J. Federle (2013). "Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens." Microbiol. Mol. Biol. Rev.**77**(1): 73-111.

Lee, S. J., S. Y. Park, J. J. Lee, D. Y. Yum, B. T. Koo and J. K. Lee (2002). "Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*." Appl Environ Microbiol**68**(8): 3919-3924.

Liao, Y., M. Zeng, Z. F. Wu, H. Chen, H. N. Wang, Q. Wu, Z. Shan and X. Y. Han (2012). "Improving phytase enzyme activity in a recombinant phyA mutant phytase

from *Aspergillus niger* N25 by error-prone PCR." Appl Biochem Biotechnol**166**(3): 549-562.

Lin, Y. H., J. L. Xu, J. Hu, L. H. Wang, S. L. Ong, J. R. Leadbetter and L. H. Zhang (2003). "Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes." Mol Microbiol**47**(3): 849-860.

Liu, D., B. W. Lepore, G. A. Petsko, P. W. Thomas, E. M. Stone, W. Fast and D. Ringe (2005). "Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from *Bacillus thuringiensis*." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(33): 11882-11887.

Liu, D., J. Momb, P. W. Thomas, A. Moulin, G. A. Petsko, W. Fast and D. Ringe (2008). "Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures." Biochemistry**47**(29): 7706-7714.

Liu, D., P. W. Thomas, J. Momb, Q. Q. Hoang, G. A. Petsko, D. Ringe and W. Fast (2007). "Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*." Biochemistry**46**(42): 11789-11799.

Liu, Y. H., B. Hu, Y. J. Xu, J. X. Bo, S. Fan, J. L. Wang and F. P. Lu (2012). "Improvement of the acid stability of *Bacillus licheniformis* alpha amylase by error-prone PCR." J Appl Microbiol**113**(3): 541-549.

Luo, Z. Q., T. E. Clemente and S. K. Farrand (2001). "Construction of a derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 that does not mutate to tetracycline resistance." Mol Plant Microbe Interact **14**(1): 98-103.

Lutz, S. (2010). "Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design." Curr Opin Biotechnol**21**(6): 734-743.

Manefield, M. and A. S. Whiteley (2007). "Acylated homoserine lactones in the environment: chameleons of bioactivity." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**362**(1483): 1235-1240.

Mascarenhas, R., P. W. Thomas, C. X. Wu, B. P. Nocek, Q. Q. Hoang, D. Liu and W. Fast (2015). "Structural and Biochemical Characterization of AidC, a Quorum-Quenching Lactonase with Atypical Selectivity." Biochemistry**54**(28): 4342-4353.

McClellan, K. H., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. Stewart and P. Williams (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones." Microbiology**143 (Pt 12)**: 3703-3711.

McCullum, E. O., B. A. Williams, J. Zhang and J. C. Chaput (2010). "Random mutagenesis by error-prone PCR." Methods Mol Biol**634**: 103-109.

Merone, L., L. Mandrich, E. Porzio, M. Rossi, S. Muller, G. Reiter, F. Worek and G. Manco (2010). "Improving the promiscuous nerve agent hydrolase activity of a thermostable archaeal lactonase." Bioresour Technol**101**(23): 9204-9212.

Michaelis, L., M. L. Menten, K. A. Johnson and R. S. Goody (2011). "The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper." Biochemistry**50**(39): 8264-8269.

Momb, J., C. Wang, D. Liu, P. W. Thomas, G. A. Petsko, H. Guo, D. Ringe and W. Fast (2008). "Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate modeling and active site mutations." Biochemistry**47**(29): 7715-7725.

Park, S. Y., S. J. Lee, T. K. Oh, J. W. Oh, B. T. Koo, D. Y. Yum and J. K. Lee (2003). "AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria." Microbiology**149**(Pt 6): 1541-1550.

Pedroza, C. J., A. M. Florez, O. S. Ruiz and S. Orduz (2014). "Enzymatic hydrolysis of molecules associated with bacterial quorum sensing using an acyl homoserine lactonase from a novel *Bacillus thuringiensis* strain." Antonie Van Leeuwenhoek**105**(1): 253-264.

Reimmann, C., N. Ginet, L. Michel, C. Keel, P. Michaux, V. Krishnapillai, M. Zala, K. Heurlier, K. Triandafillu, H. Harms, G. Defago and D. Haas (2002). "Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Microbiology**148**(Pt 4): 923-932.

Romero, M., A. B. Martin-Cuadrado and A. Otero (2012). "Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences." Appl Environ Microbiol**78**(17): 6345-6348.

Romero Manuel (2010). Interceptación de señales de comunicación bacteriana tipo N-acil homoserin lactonas (AHLs) en bacterias aisladas del medio marino. Doctor en Biología, Santiago de Compostela.

Sio, C. F., L. G. Otten, R. H. Cool, S. P. Diggle, P. G. Braun, R. Bos, M. Daykin, M. Camara, P. Williams and W. J. Quax (2006). "Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Infect Immun**74**(3): 1673-1682.

Thomas, P. W. and W. Fast (2011). "Heterologous overexpression, purification, and in vitro characterization of AHL lactonases." Methods Mol Biol**692**: 275-290.

Ulrich, R. L. (2004). "Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*." Appl Environ Microbiol**70**(10): 6173-6180.

Uroz, S., P. M. Oger, E. Chapelle, M. T. Adeline, D. Faure and Y. Dessaux (2008). "A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases." Appl Environ Microbiol**74**(5): 1357-1366.

Von Bodman, S. B., W. D. Bauer and D. L. Coplin (2003). "Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria." Annu Rev Phytopathol**41**: 455-482.

Wang, L. H., L. X. Weng, Y. H. Dong and L. H. Zhang (2004). "Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase)." J Biol Chem**279**(14): 13645-13651.

Wang, M., A. L. Schaefer, A. A. Dandekar and E. P. Greenberg (2015). "Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters." Proc Natl Acad Sci U S A**112**(7): 2187-2191.

White, C. E. and S. C. Winans (2007). "Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**362**(1483): 1135-1148.

Wu, H., C. Moser, H. Z. Wang, N. Hoiby and Z. J. Song (2015). "Strategies for combating bacterial biofilm infections." Int J Oral Sci**7**(1): 1-7.

Yang, M., P. Xie, S. Jian, L. Lin and C. Yang (2014). "[Enhancement of enzyme activity and thermostability of N-acylhomoserine lactonase by site-directed mutagenesis]." Wei Sheng Wu Xue Bao**54**(8): 905-912.

Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., et al. (2002). "N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*". Infection and Immunity, **70**(10), 5635–5646.

Zan, J., O. Choi, H. Meharena, C. L. Uhlson, M. E. Churchill, R. T. Hill and C. Fuqua (2015). "A solo luxI-type gene directs acylhomoserine lactone synthesis and contributes to motility control in the marine sponge symbiont *Ruegeria sp.* KLH11." Microbiology**161**(Pt 1): 50-56.

Zhang, Y., J. An, W. Ye, G. Yang, Z. G. Qian, H. F. Chen, L. Cui and Y. Feng (2012). "Enhancing the promiscuous phosphotriesterase activity of a thermostable lactonase (GkaP) for the efficient degradation of organophosphate pesticides." Appl Environ Microbiol**78**(18): 6647-6655.