



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ADITIVA DE PROTEÍNAS GroEL, DE BACTERIAS ASOCIADAS A NEMÁTODOS, EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LA BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* NA04

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ROBERTO BAHENA SANCHES**

**CODIRECTORES:
DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ
M. EN B. ABRAHAM OMAR RIVERA RAMÍREZ**

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2021

Agradecimientos

Al Dr. Edgar Dantán González por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. Además de su incontable ayuda y consejos, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de ésta.

Al M. en B. Abraham Omar Rivera Ramírez, al cual agradezco su apoyo durante toda la investigación además de todos sus conocimientos compartidos los cuales fueron invaluable para la realización de la tesis como para mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio que, gracias a su compañerismo, hicieron ameno mi periodo en el laboratorio.

A mis síodos por las correcciones y sus críticas constructivas que ayudaron a llevar a buen término mi proyecto.

A mi familia por su apoyo moral y cariño incondicional.

Índice Temático

Resumen	1
Introducción	2
Chaperonas Moleculares: Aspectos Básicos.....	2
Chaperoninas: clasificación y estructura	4
Grupo I y grupo II	4
Estructura.....	5
Mecanismo de acción	5
Fenómeno moonlighting.....	7
Moonlighting en GroEL.....	7
Actividad tóxica de GroEL en insectos.....	10
Análisis de la correlación tóxica de GroEL con otras moléculas	11
Antecedentes	12
Justificación	14
Hipótesis	15
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
Estrategia Experimental	16
Materiales y métodos	16
Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	16
Purificación de la proteína GroEL	17
Ensayos de la actividad insecticida del sobrenadante	17
Purificación de las Moléculas del Sobrenadante.....	17
HPLC	18
Análisis bioinformático	18
Resultados	19
Valoración de la actividad insecticida del sobrenadante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA04	19
Actividad del sobrenadante en conjunto con GroEL.....	20
Análisis bioinformático	22
Toxinas Secretadas al Medio por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA04	23
Purificación de la Toxinas del Sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> NA04	23

Discusión.....	31
Conclusión	34
Referencias Bibliográficas	35

Resumen

Las proteínas son moléculas de elevada importancia en los seres vivos. Impresionante resulta la vasta cantidad de funciones que cumplen dentro y fuera de estos.

Una de las razones para esta vastedad, es que pueden presentar más de una función bioquímica, es decir; pueden ejercer dos funciones diferentes, relacionadas o no. Esta capacidad es denominada multifuncionalidad o “*multitasking*”¹. Un tipo de multifuncionalidad es el fenómeno *moonlighting*, observado en algunas proteínas las cuales incluyen proteínas con tareas ya conocidas en rutas metabólicas, hasta proteínas involucradas en la homeostasis proteica, tal es el caso de algunas chaperonas moleculares como GroEL¹.

GroEL forma un oligómero en forma de doble anillo constituidos por subunidades de 14 a 16 constituyentes que se encargan de secuestrar sustratos proteicos para producir su plegamiento correcto en ciclos dependientes de ATP, además de esto, muestran una remarcable actividad tóxica en contra de insectos².

El comportamiento entomotóxico de GroEL ha sido reportado por diferentes autores, datos preliminares obtenidos en el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) mostraron que hay un potenciamiento de la actividad insecticida de *Pseudomonas aeruginosa* NA04 cuando está en asociación con GroEL. En este trabajo se pretende analizar la interacción entre el extracto extracelular de la cepa *P. aeruginosa* NA04 con las proteínas GroEL de *Alcaligenes faecalis* MOR02 y *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.

Introducción

Chaperonas Moleculares: Aspectos Básicos

Las chaperonas moleculares son un sistema de proteínas ubicuas que trabajan en la célula, encargándose de secuestrar sustratos proteicos para prevenir el plegamiento erróneo de estos². Éstas se encuentran en los tres dominios (eucariontes, procariontes y arqueas) de la clasificación biológica³.

Durante eventos en la que la célula atraviesa por situaciones de estrés que favorecen formaciones de agregados y plegamientos erróneos de proteínas, el fenómeno de proteostasis previene la formación de estos mediante la expresión de chaperonas moleculares. Es por la alta producción de éstas durante un evento de estrés por calor que también reciben el nombre *de Heat Shock Proteins* (Hsp)^{3,4}. Pero su actividad no se limita a condiciones de estrés celular, bajo condiciones fisiológicas, asisten el correcto plegamiento de proteínas recién sintetizadas por los ribosomas o de proteínas citoplasmáticas salientes de poros del lumen del retículo endoplásmico o de la matriz mitocondrial, con la finalidad de alcanzar un estado funcional, también llamado “nativo”⁵.

Las chaperonas moleculares entran en acción por exposición de aminoácidos hidrofóbicos a la fase acuosa por parte de proteínas parcialmente plegadas o completamente extendidas, que de otro modo en estados nativos estarían “enterrados” dentro de la estructura proteica.⁵⁻⁷.

Éstas se agrupan de acuerdo a su masa molecular (Fig 1) o, en su modo de acción: “holdasas”, “disgregasas” y “foldasas”⁵⁻⁷

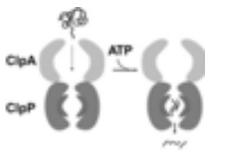
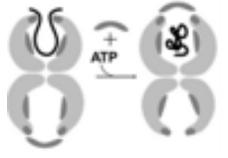
Familia chaperona	Topología de Unión	Cochaperona	Función conocida
Hsp100		ClpB, SspB, Hsp70, Hsp40	<ul style="list-style-type: none"> • Trabaja junto con DnaK en la desagregación y proteólisis ATP dependiente • Previene la agregación, degradación, y retorno de proteínas mitocondriales • Reactiva proteínas dañadas por calor • Establece y mantiene el fenotipo prion en levadura
Hsp90		Hop, Hip, Hsp70, inmunofilinas, Grp78	<ul style="list-style-type: none"> • Repliega proteínas en células estresadas. Probable chaperona secretora en procariontes • Principal chaperona citosólica en eucariontes • Señalización intracelular y citoprotección • En RE controla la homeostasis proteica, plegamiento y ensamblado de proteínas secretoras
Hsp70		Hsp40, GrpE	<ul style="list-style-type: none"> • Principal chaperona plegadora ubicua • Trabaja con ClpB como "disgregasa" • Plegamiento de proteínas recién sintetizadas • Transporte proteico dentro del RE y mitocondria
Hsp60 (Grupo I)		Hsp10	<ul style="list-style-type: none"> • Principal chaperona para el plegamiento de proteínas en procariontes • Estabiliza proteínas durante el estrés por calor • Promueve el plegamiento de proteínas sobre producidas • Principal chaperona en cloroplasto y mitocondria
Hsp60 (Grupo II)		Prefoldina GimC	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve el plegamiento de proteínas citosólicas en eucariontes • Replegamiento de péptidos desplegados <i>in vitro</i>
sHsps			<ul style="list-style-type: none"> • Estabiliza polipéptidos desplegados • Previene la agregación • Trabaja con Hsp70 en el replegamiento proteico • Proteína estructural del cristalino de los ojos

Fig. 1 Características y funciones conocidas de las diferentes chaperonas: las chaperonas moleculares son clasificadas de acuerdo a sus masas moleculares y presentadas en orden decreciente de tamaño: Hsp 100 - Hsp pequeña (sHsp). Hsp 60 se divide en dos grupos; grupo I y grupo II ².

Chaperoninas: clasificación y estructura

Se denominan chaperoninas a la familia Hsp60 de chaperonas moleculares, las cuales rondan los 60kDa. En bacterias, las chaperoninas son máquinas moleculares que facilitan el plegamiento de proteínas por ciclos dependientes de ATP que son coordinados por regulación alostérica^{7,8}. Cuentan con la particularidad de formar una estructura cilíndrica de 800 a 1000kDa conformada por dos anillos idénticos unidos consecutivamente, cada anillo formado por 7 a 9 subunidades de 60kDa. La estructura encapsula sustratos proteicos durante condiciones celulares desfavorables para mantener la proteostasis.^{2,10-14}

Grupo I y grupo II

La clasificación de las chaperoninas se basa en dos subgrupos. La separación se hace de acuerdo a la distribución filogenética, estructura y requerimiento de una cochaperona. El grupo I se encuentra en organismos procariontes y en organelos endosimbióticamente relacionados (cloroplastos y mitocondrias). Por su parte el grupo II se encuentra en el citosol de arqueas y eucarias^{2,12}.

Enfocándonos en el grupo I, estas chaperoninas reciben varios nombres; Hsp60, Cpn60 o GroEL. En general, a las Hsp60 homólogas bacterianas se les refiere como GroEL, esto debido a que así se designó a la bien caracterizada Hsp60 de *Escherichia coli*^{10,15}. GroEL de *E. coli* forma una estructura mencionada anteriormente de 14 sub-unidades, pero trabaja en conjunto con una proteína de alrededor de los 10 kDa conocida como GroES, Hsp10 o Cpn10, la cual forma una estructura en forma de domo formada por 7 sub-unidades, y se une al doble anillo de GroEL formando una cavidad en la cual el sustrato proteico alcanza su estado funcional¹⁶⁻¹⁸. Una diferencia entre el grupo I y el grupo II de chaperoninas es que el grupo II no necesita de la estructura en forma de capucha para ejercer su función (Fig 2).

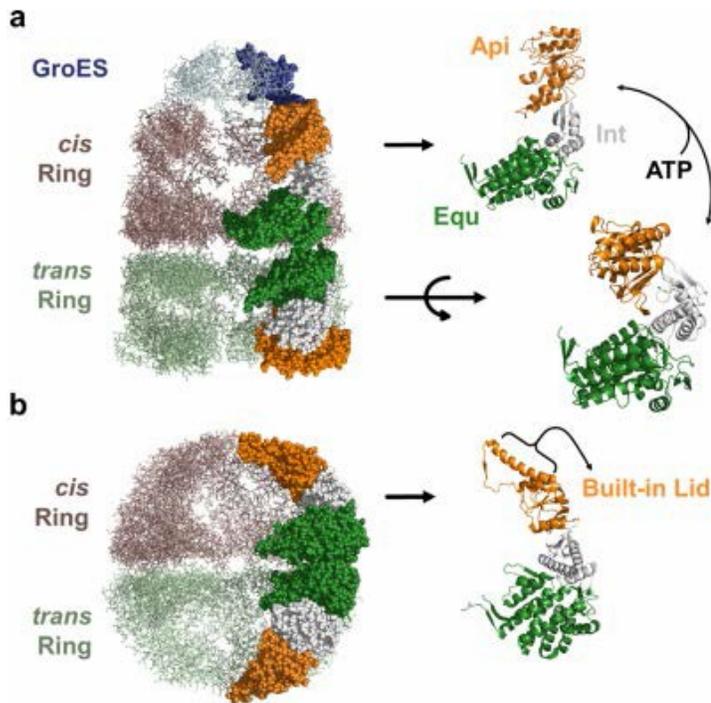


Fig 2. Arquitectura estructural a partir de modelos cristalográficos: chaperoninas del grupo I (a) y II (b)².

Estructura

La subunidad o monómero de GroEL (*E. coli*) está constituido por 547 aminoácidos arreglados en tres dominios. El dominio apical, el cual abarca los residuos 191-376 en la región central de la estructura primaria, es rico en residuos hidrofóbicos y forma los sitios de unión para los sustratos y la cochaperonina GroES. Por su parte, el dominio ecuatorial es el más largo y grande de todos, abarca residuos

en los dos extremos del polipéptido, desde los residuos 1-133 y 409-523, es responsable de las interacciones intersubunidad e intraanillo, además de contener un sitio de unión a ATP denominado motivo *pseudowalker* constituido por alfa-hélices. Por último, el dominio intermedio es el más pequeño y conecta el dominio ecuatorial y el dominio apical y transfiere los cambios inducidos por ATP desde el dominio ecuatorial hasta el dominio apical, abarca 89 residuos, desde el 134-190 hasta 377-408^{2,10,16,18}

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de GroEL consiste en la captura del polipéptido en un anillo con residuos hidrofóbicos que recubren los extremos del complejo en forma de anillo. Una vez que el sustrato se encapsula, la hidrólisis de ATP proporciona una ventana de tiempo para que tenga lugar el plegamiento, pero la hidrólisis de ATP no es necesaria para el plegamiento de proteínas. En su lugar, la hidrólisis hace que el proceso de captura y liberación del sustrato continúe. La hidrólisis en el anillo unido a GroES es un requisito previo para la unión de ATP al anillo opuesto, que a su vez provoca la descarga alostérica de GroES, ADP y el sustrato, ya sea plegado o no, desde la cámara de plegado. Si el sustrato liberado no está plegado correctamente, puede volver a unirse para otros ciclos de interacción con la chaperonina¹⁹. (Fig 3)

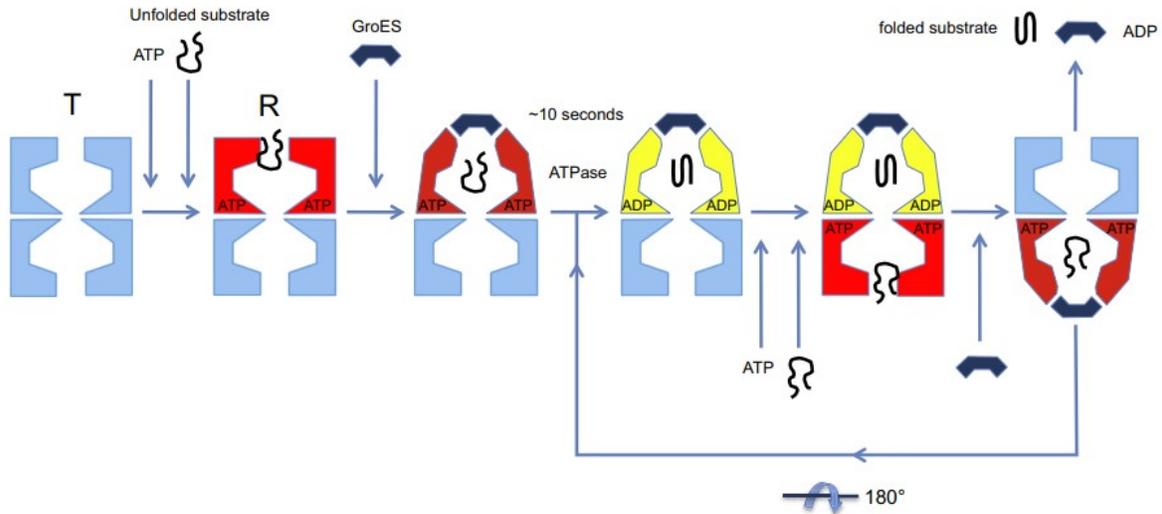


Fig. 3. Diagrama del ciclo ATPasa de GroEL-GroES, que muestra los pasos de la unión, encapsulación, plegado y liberación del sustrato¹⁹.

Los análisis de la formación del complejo GroEL/GroES cuando interactúa con el sustrato sugieren dos estados conformacionales distintos: llamados el estado trans y cis. Estados que difieren en el tamaño y forma de la cavidad del complejo en la cual es interiorizado el sustrato. En el primer estado conformacional denominado cis, el sustrato y GroES se une en el mismo anillo de la estructura, mientras que en la estructura trans, el sustrato proteico es muy grande en tamaño y, por lo tanto, no es posible que GroES lo encapsule, uniéndose entonces a la cavidad opuesta^{2,20}.

Lo descrito antes es la actividad canónica de GroEL, sin embargo, se describen actividades *moonlighting* en homólogos de estas proteínas, para abordar el tema, necesitamos definir el término *moonlighting* y que parámetros se establecen para indicar si una proteína se puede o no catalogar bajo este término.

Fenómeno moonlighting

Moonlighting es un fenómeno de multifuncionalidad especial en proteínas, porque éstas desempeñan funciones múltiples, autónomas y frecuentemente sin relación entre sí¹⁹. Los primeros reportes de este comportamiento fueron vistos en proteínas con una función estructural del cristalino de distintos vertebrados, poseyendo además de la primera, una función catalítica en rutas metabólicas^{21,22}. La multifuncionalidad adquirida por fusión de genes, variantes de *splicing*, así como también la promiscuidad enzimática, no entra dentro de los parámetros que describen una actividad *moonlighting*^{21,1,24}.

Estas funciones *moonlighting* se pueden observar bajo ciertas circunstancias. Como la diferente localización celular; una misma proteína puede mostrar diferentes funciones en dos lugares distintos dentro de la célula o, realizar una función dentro de la célula y presentar otra fuera de la misma. La función *moonlighting* también se observa bajo la formación de estados oligoméricos, expresión en diferentes tipos celulares o una diferente concentración de sustrato o ligando, además de interacción con sitios de unión distintos²⁵.

De acuerdo a datos recientes, en la base de datos MoonProt 2.0 disponible en línea (www.moonlightingproteins.org), se enlistan más de 500 proteínas junto a su actividad canónica y las variadas actividades *moonlighting* de diversos organismos²⁶. Algunas proteínas muestran más de una función alterna *moonlighting*; algunos ejemplos son la fosfoglucosa isomerasa, que tiene al menos cinco funciones *moonlighting* diferentes²⁴. En el caso de GroEL, se reportan 13 homólogos que presentan este fenómeno.

Moonlighting en GroEL

Se ha observado que muchos organismos poseen más de una copia del gen que codifica para la chaperonina GroEL. Algunos estudios demuestran que al menos uno de los genes en los organismos multicopia no está implicado en la función de plegamiento y estos posiblemente tengan una función diferente.

Los genes que codifican para GroEL y Cpn 10 son encontrados en casi todas las bacterias²⁷. En 2009, Lund realizó un análisis de 699 genomas bacterianos, revelando que cerca del 30% contenían dos o más genes de chaperoninas, algunos solo contenían un gen Cpn10, y otros tenían más de uno²⁷. Por otra parte, (Kumar *et al.*, 2015) en busca de una expansión de los datos arrojados por Lund, gracias a nuevas herramientas genómicas y la disponibilidad de nuevos genomas

secuenciados, se exploraron datos de GroEL parálogos para 1318 genomas bacterianos completamente secuenciados². Mostrando que la tendencia de múltiples GroEL en diferentes *phylum* sigue manteniéndose en nuevos genomas secuenciados (Fig 3a y 3b). Cabe destacar que

organismos poseedores de más de un gen GroEL pueden contenerlo en un operón junto con Cpn10²⁸.

a

Number of GroELs	1	2	3	4	5	6	7
Phyla							
Actinobacteria	34	119	10	6	0	0	0
Aquificae	11	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes/Chlorobi group	92	2	1	0	0	0	0
Caldiserica	1	0	0	0	0	0	0
Chlamydiae/Verrucomicrobia group	3	3	10	0	0	0	0
Chloroflexi	5	7	0	0	0	0	0
Chrysiogenetes	1	0	0	0	0	0	0
Cyanobacteria	1	49	3	0	0	0	0
Deferribacteres	4	0	0	0	0	0	0
Deinococcus-Thermus	16	0	0	0	0	0	0
Dictyoglomi	2	0	0	0	0	0	0
Elusimicrobia	2	0	0	0	0	0	0
Fibrobacteres/Acidobacteria group	8	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	243	7	2	0	1	0	0
Fusobacteria	5	0	0	0	0	0	0
Gemmatimonadetes	1	1	0	0	0	0	0
Nitrospirae	4	0	0	0	0	0	0
Planctomycetes	0	0	6	0	0	0	0
Proteobacteria	470	79	25	8	6	2	1
Spirochaetes	35	0	0	0	0	0	0
Synergistetes	4	0	0	0	0	0	0
Tenericutes	9	0	0	0	0	0	0
Thermodesulfobacteria	2	0	0	0	0	0	0
Thermotogae	14	1	0	0	0	0	0

b

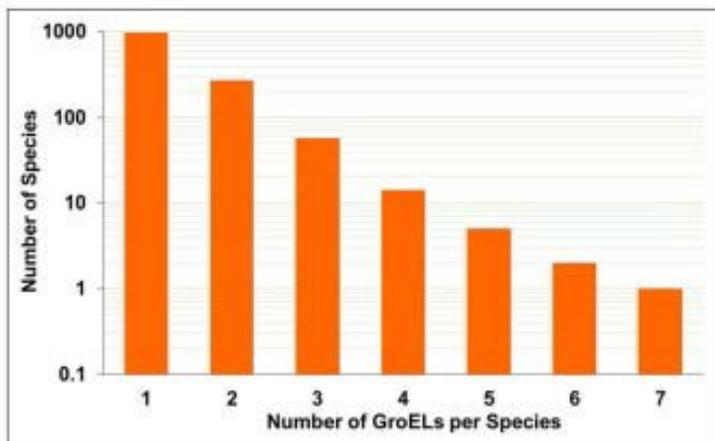


Fig. 3 (a) Distribución de múltiples genes de Cpn60 en bacterias en 1318 genomas bacterianos (b) Frecuencias específicas para cada *phylum* de Cpn60 por genoma¹

//

La ocurrencia de varios genes GroEL en distintos organismos puede tener dos explicaciones: la primera remarca que no existe una divergencia de funciones y que todos los genes cumplen con la misma tarea canónica, tan sólo se encuentran regulados de diferentes maneras para tener un control de la actividad chaperonina dentro de la célula. La segunda posibilidad contempla la evolución de una función distinta y no sobrelapada, con propiedades bioquímicas distintas, así como diferentes modos de regulación ²⁷.

Se han estudiado diversos organismos mostrando distintos genes GroEL con diversificación de funciones, a continuación, se detallarán algunos ejemplos. En el género *Mycobacterium* se han reportado actividades fuera de la canónica, *Mycobacterium smegmatis* es un organismo saprófito formador de biofilm que posee tres copias de genes GroEL. Estudios mostraron que uno de ellos es requerido para la maduración del biofilm²⁸. Por otro lado *M. tuberculosis* agente causante de la tuberculosis, tiene dos copias de genes GroEL; Cpn60.1 y Cpn60.2. Se mostró que Cpn60.1 no es esencial para la viabilidad del organismo, pero en contraste es vital en la formación de granulomas en los pulmones de ratones infectados²⁹.

En la clase *Alphaproteobacteria*, que forman nódulos en las raíces de las plantas leguminosas y también son fijadores de nitrógeno, se presenta un ejemplo excepcional de múltiples genes GroEL en un organismo, la especie *Bradyrhizobium japonicum* codifica 7 genes GroEL, siendo el organismo con más copias hasta ahora registrados en su genoma^{1,26}. Uno de estos, Cpn60.3, se encuentra coregulado con genes de fijación de nitrógeno, los cuales tienen propósitos simbióticos³⁰. Lo que podría indicar una participación en eventos fuera de su actividad canónica. La especie *Rhizobium meliloti* es una bacteria fijadora de nitrógeno, la cual coexiste en simbiosis con algunas plantas y cuenta con dos copias de GroEL. Una de las copias se encuentra en el operón GroELSc, el cual juega un papel importante en la nodulación, ya que promueve la unión al ADN del activador de transcripción NodD, regulando así genes importantes en el evento³¹. Además de ésta, hay evidencias que muestran una relación entre la existencia de más de un gen que codifica para GroEL y la habilidad de fijar nitrógeno³¹.

Algunas actividades moonlighting de GroEL se muestran en la siguiente figura (Fig. 4).

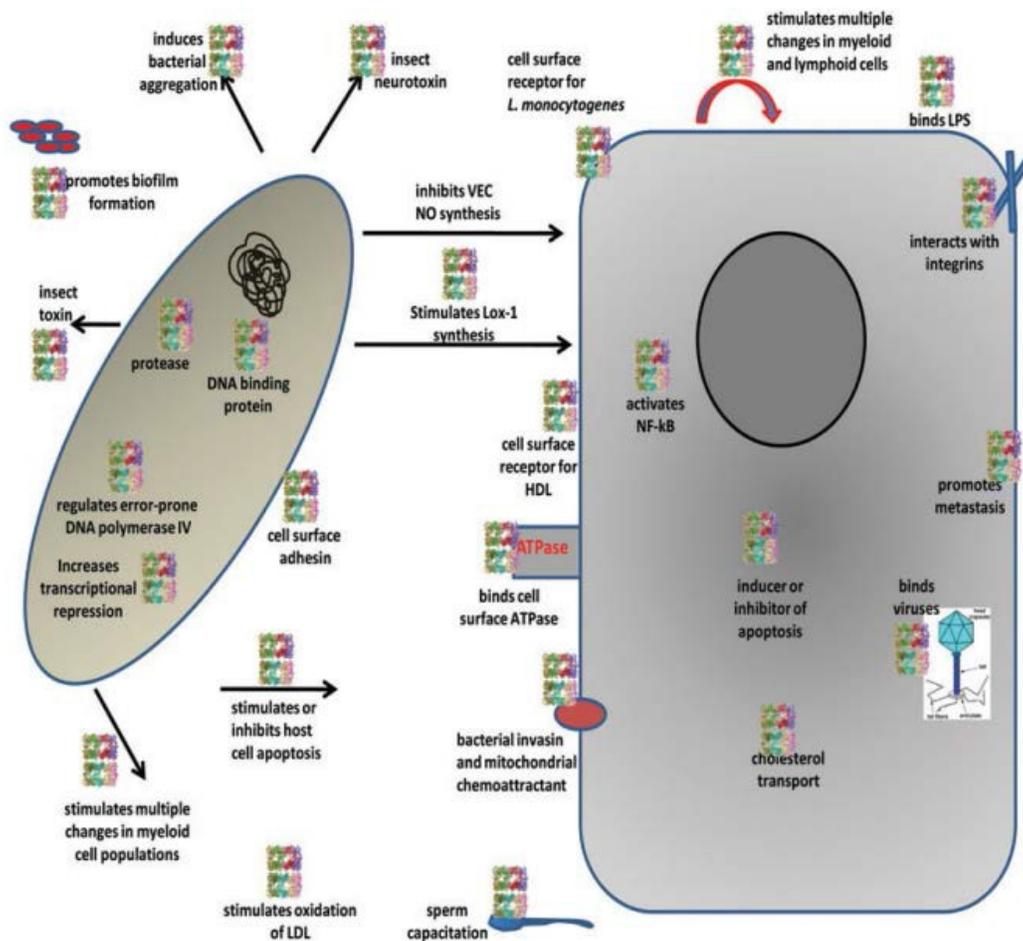


Fig 4. Esquema que muestra las diferentes actividades de GroEL en dos diferentes tipos celulares, extra e intracelularmente³².

Actividad tóxica de GroEL en insectos

En el 2001 *Yoshida et al.*, realizaron un remarcable descubrimiento, estudiando la saliva de larvas pertenecientes a la especie *Myrmeleon bore*, las cuales utilizan su saliva para paralizar a sus presas, encontraron que la saliva de las larvas contenía a la bacteria *Enterobacter aerogenes*. La bacteria al ser inyectada en la cucaracha alemana *Blattella germanica* resultaba en una rápida paralización de la misma. La purificación del componente con actividad paralizante resultó en una proteína con una masa molecular de alrededor de los 60kDa que resultó ser un homólogo de GroEL. El análisis de la secuencia y la generación de mutantes permitieron saber que sólo cuatro residuos resultaron cruciales para la actividad tóxica, Val 100, Asn 101, Asp 338 y Ala 471³³. Posteriormente en el 2012 Yang et al. analizaron una proteína de alrededor de 57kDa designada como HIP57, la proteína

es producida por la bacteria *Xenorhabdus budapestensis*. HIP57 mostró una actividad insecticida, en este caso probada en larvas de *Galleria mellonella*, la DL_{50} medida fue de 206 ng. Un efecto llamativo fue el ennegrecimiento en el cuerpo de la larva, a partir de este se realizaron experimentos que demostraron que la proteína activaba el mecanismo de defensa inmunológico en insectos denominado como sistema profenol-oxidasa, en éste se produce, además de otras moléculas, melalanina y quinonas, la primera causa el ennegrecimiento de la larva, y la segunda tiene actividad citotóxica. Concluyendo que podría ser posible la hiperactivación del sistema profenol-oxidasa la principal causa de muerte de las larvas. Estudios de comparación de secuencia de HIP57 mostraron una gran similitud con la GroEL de otras bacterias, concluyendo que se trataba de un homólogo de esta³⁴.

Otra investigación concluyó que la Cpn60 de *X. ehlersii* activaba el sistema profenol-oxidasa y mostraba la misma característica insecticida³⁵. En otro estudio se demostró que en la GroEL de *X. nematophila* dos residuos mostraban correlación con la actividad tóxica y la unión a quitina, en este caso, en el epitelio del intestino³⁶. También fue demostrado que esta misma proteína en plantas transgénicas de tabaco, aportaba resistencia en contra de *Helicoverpa armígera*, una plaga de un amplio número de cultivos³⁷.

Análisis de la correlación tóxica de GroEL con otras moléculas

Como se observó, existe reportes del efecto entomotóxico de GroEL, pero, por otro lado, son nulos los estudios en los que se pretende observar las interacciones con otras moléculas para esclarecer su papel como una molécula tóxica en insectos. La potenciación de un efecto entre dos o más moléculas es un fenómeno que puede ser aditivo o sinérgico.

El efecto aditivo puede decirse que es la adición de los efectos de al menos dos agentes diferentes, retratado en una simple ecuación del modo $1+1=2$ ³⁸. La sinergia se define normalmente como el efecto de dos agentes trabajando en conjunto que van más allá que el efecto aditivo de dichos agentes^{38,39}.

Antecedentes

En el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en tres proyectos diferentes, se obtuvieron los siguientes resultados.

En el primero se aisló a la bacteria *Alcaligenes faecalis* MOR02 a partir de una larva de *G. mellonella* infectada con nematodos entomopatógenos. Ensayos de patogenicidad en contra de *G. mellonella* mostraron que la bacteria causó el 96% de mortalidad a las 24 horas después de inyectar 24,000 UFC en la hemolinfa de las larvas. En el mismo reporte una proteína de alrededor de 60kDa fue detectada por análisis del genoma de *A. faecalis* MOR02, resultando ser un homólogo de GroEL, la cual tuvo actividad toxica contra larvas de *G. mellonella*⁴¹.

En otro se obtuvo el aislamiento de un nematodo entomopatógeno identificado molecularmente como *Heterorhabditis indica* MOR03. De juveniles infectivos se aislaron dos bacterias, una de ellas se identificó con la secuenciación y anotación del genoma como *Pseudomonas aeruginosa* NA04^{42,43}.

En el tercero se transformaron células de *E. coli* BL-21 con el vector de expresión pET-28a (+) con el gen GroEL de *A. faecalis* MOR02 y de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 para realizar ensayos de toxicidad. En estos ensayos se probaron cinco concentraciones de GroEL: 100, 200, 500, 1000 y 2000 ng de la proteína en larvas del sexto instar de la especie *Galleria mellonella*. Vale la pena remarcar que a las 48 horas 100 ng de GroEL de *X. nematophila* SC 0516 y 200 ng de GroEL de *A. faecalis* MOR02 tuvieron 40 y 20 % de mortalidad respectivamente (Fig. 5).

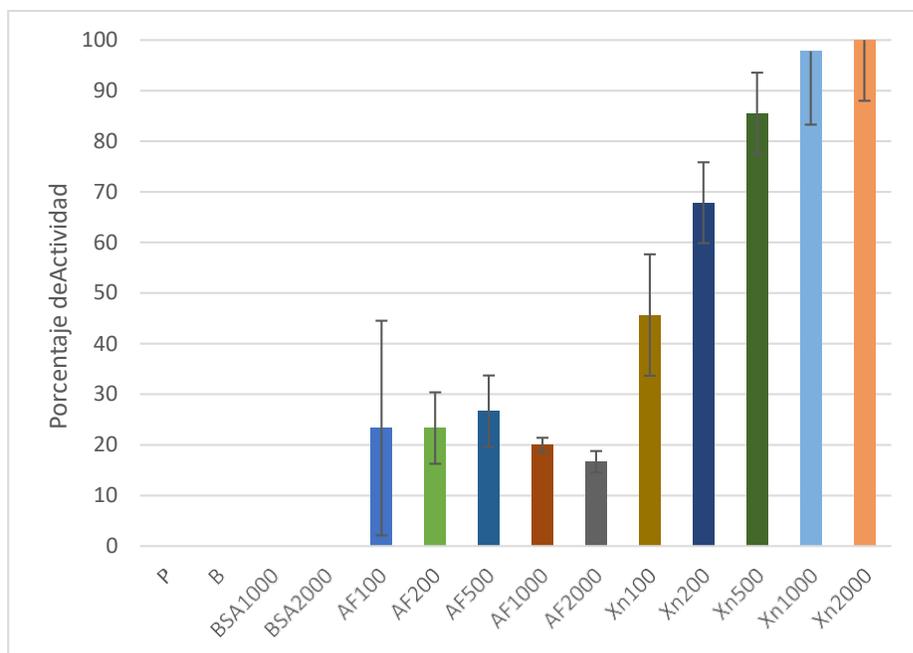


Fig. 5. Actividad de GroEL proveniente de *Alcaligenes faecalis* y *Xenorhabdus nematophila* a las 48 horas. P: Pinchazo, B: Inyección de 10µl de PBS (Buffer fosfato salino), BSA1000 Y 2000: Inyección de 1000µg y 2000µg de BSA (Albúmina de suero bovino) respectivamente, AF100-AF2000: Inyección de diferentes dosis en ug de la proteína GroEL desde 100 µg hasta 2000 µg, Xn100-2000: Inyección de diferentes dosis en ug de la proteína GroEL desde 100 µg hasta 2000 µg.

En el mismo estudio, se analizó la actividad de GroEL de *A. faecalis* junto con moléculas provenientes del extracto extracelular de *P. aeruginosa* NA04. A las 12 horas el extracto de *P. aeruginosa* NA04 y GroEL no presentaron actividad alguna, sin embargo, en igual lapso de tiempo, la administración en conjunto de 100 ug de GroEL con el extracto, en una dilución 1:200, mostró actividad cercana al 100%, mientras que a una concentración de 1000ug la actividad disminuía al 70%. Se probó el extracto de *P. aeruginosa* con la chaperona Hsp90, pero no mostró mortalidad, indicando no ser una actividad general de chaperonas moleculares (Fig. 6).

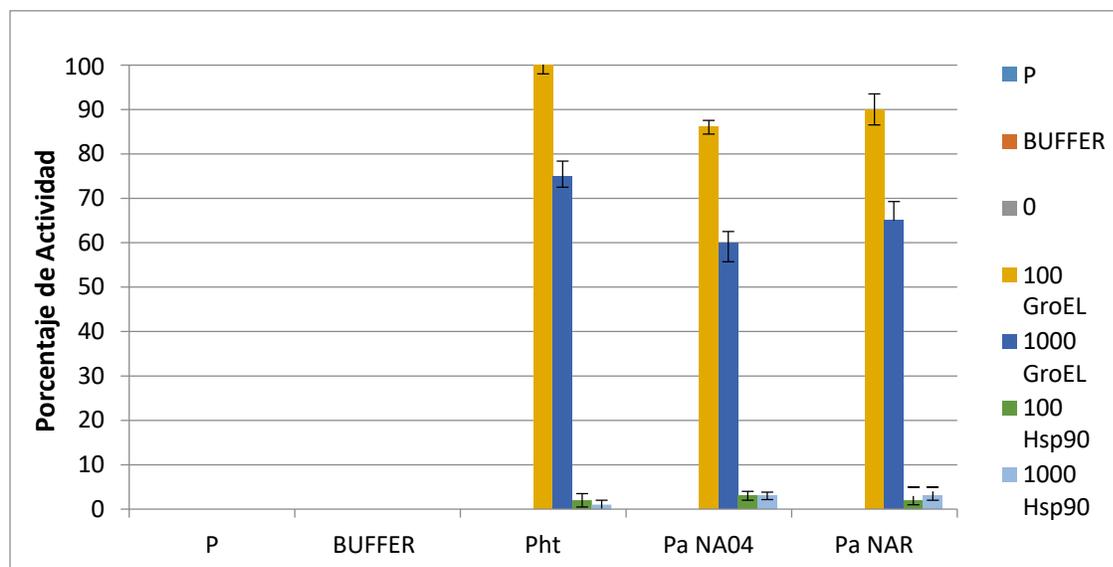


Fig.6. Actividad GroEL y el sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* NA04 evaluado a las 12 horas. P: Pinchazo, BUFFER: PBS, Pht: Sobrenadante de *Photorhabdus luminescens* HIM3 administrado en conjunto con GroEL de *A. faecalis* NA04 y la chaperona Hsp90, Pa NA04: Sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04 administrado en las mismas condiciones anteriores. Pa NAR: Sobrenadante de *Pseudomonas sp.* administrado como ya se describió anteriormente.

Justificación

Los mecanismos por los cuales GroEL podría estar ejerciendo la actividad insecticida aún no han sido elucidados. En el presente trabajo se busca dar indicios que aporten información para la futura caracterización del mecanismo entomotóxico de GroEL.

Un resultado preliminar, indica que la GroEL proveniente de *A. faecalis* al ser suministrada junto con el sobrenadante de tres cepas bacterianas provenientes de nematodos entomopatógenos potencializa la actividad insecticida.

Con base en lo anterior, se busca la aplicación de las proteínas GroEL de *Alcaligenes faecalis* MOR02 y *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 junto las moléculas del extracto del sobrenadante de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* NA04 en larvas de *Galleria mellonella*, buscando un aumento de la actividad insecticida al ser suministrados en conjunto. Esto nos proporcionará indicios sobre una posible actividad insecticida diferencial entre los dos tipos de GroEL y si la actividad en conjunto es al menos aditiva.

Hipótesis

Las proteínas GroEL con actividad entomopatógena, producidas por las bacterias *Alcaligenes faecalis* MOR02 y *Xenorhabdus nematophila* SC 0516, al estar en asociación con las proteínas secretadas por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* NA04 podrán potenciar la actividad insecticida de esta bacteria.

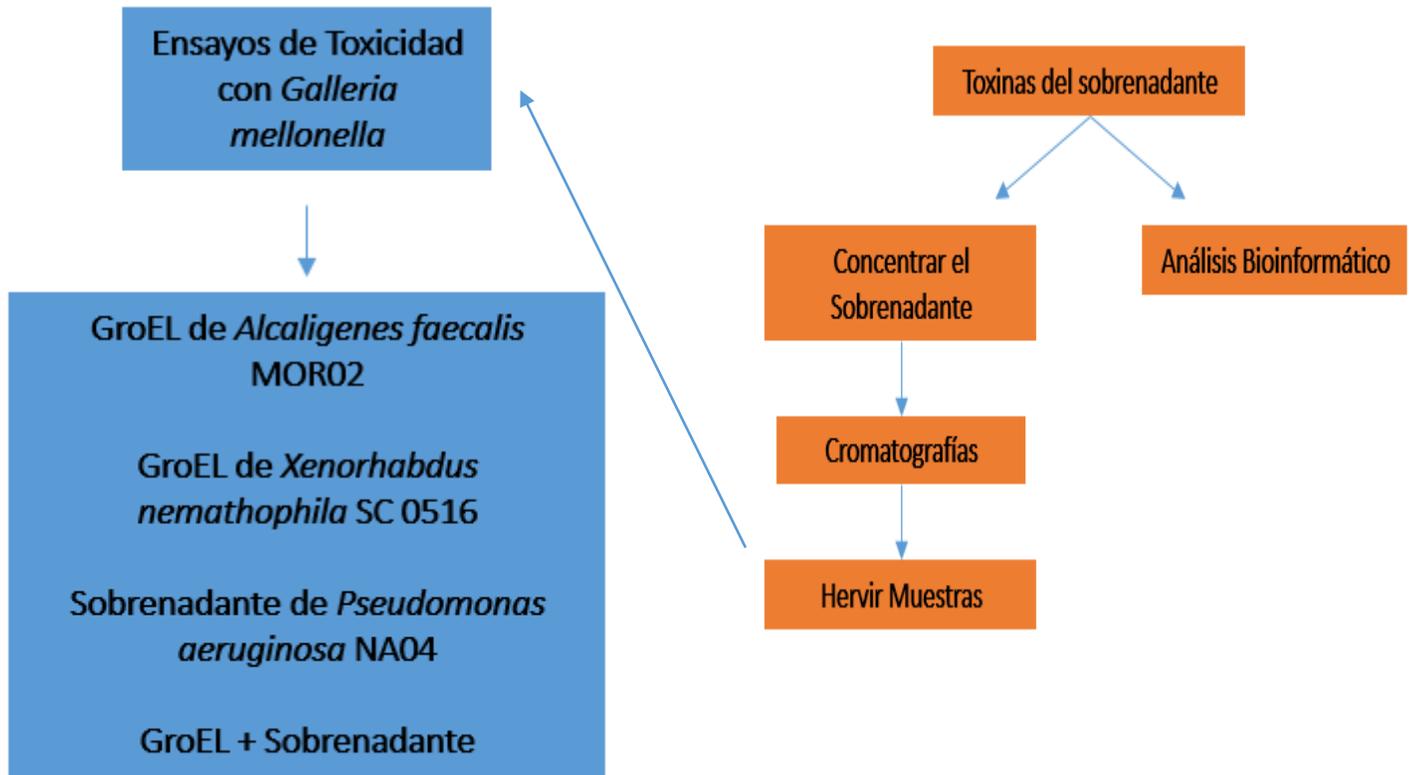
Objetivo general

Analizar la capacidad aditiva de las proteínas GroEL de *Alcaligenes faecalis* MOR02 y *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 en la actividad insecticida de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* NA04.

Objetivos particulares

- Determinar la actividad de insecticida de la proteína GroEL de *Alcaligenes faecalis* MOR02.
- Determinar la actividad de insecticida de la proteína GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.
- Determinar la actividad de insecticida de las proteínas secretadas por *Pseudomonas aeruginosa* NA04.
- Analizar la capacidad aditiva de la proteína GroEL de *Alcaligenes faecalis* MOR02 con las proteínas secretadas por *Pseudomonas aeruginosa* NA04
- Analizar la capacidad aditiva de la proteína GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 con las proteínas secretadas por *Pseudomonas aeruginosa* NA04

Estrategia Experimental



Materiales y métodos

Cepas bacterianas y medios de cultivo

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* NA04 fue aislada de juveniles infectivos del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica* MOR03. Las células de *P. aeruginosa* NA04 fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) líquido con ampicilina a una concentración de 100 µg por ml, a 30 °C.

La cepa *E. coli* BL-21 con el plásmido peET28(a)+ con la proteína GroEL fue crecida en medio LB líquido con kanamicina a una concentración de 50 µg por ml a 37°C.

Purificación de la proteína GroEL

La cepa *E. coli* BL-21 con el plásmido pET28 +GroELAF fue cultivada en un preinóculo de medio LB 12 horas y después escalado en una dilución de 1:100 en un volumen final de 500 ml de medio LB nuevo hasta alcanzar una O.D₆₀₀ de 0.4-0.5, posteriormente se agregó un inductor de la expresión IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 24 horas. Para purificar la proteína GroEL, el cultivo se centrifugó a 17,000 xg por 15 minutos obteniendo una pastilla celular, la cual se resuspendió en 5ml de buffer PBS 1x, se trataron las células con lisozima a una concentración de 0.17 mg por ml de cultivo por una hora a 37°C a 180 rpm, para completar la disrupción celular se sonicaron las células junto con perlas de vidrio a una amplitud del 100 % con un pulso con una duración de 45 segundos a 4°C (SONICS, Vibra Cell™), repitiendo este paso 5 veces. Para quitar los restos celulares se centrifugó a 75,000xg durante 30 minutos a 10°C quedándonos únicamente con el sobrenadante. Este fue pasado a través de una columna de Ni-NTA (ácido nitriloacético-niquel) previamente empacadas y equilibradas con PBS, el lisado se pasó 3 veces en la columna, a continuación, se hizo un lavado esta con 100ml de buffer de lavado (25mM Imidazol) para eliminar todo componente no deseado. Para eluir la proteína GroEL, se agregó un buffer de elución (250mM Imidazol) y se recolectaron 10 fracciones. Se cuantificó cada fracción por el método de Bradford (Thermo Fisher).

Ensayos de la actividad insecticida del sobrenadante

Se realizó un preinóculo de 3ml de *P. aeruginosa* en medio LB incubado por 12 horas a 37°C, después este cultivo fue utilizado para inocular un volumen de 10 ml de medio LB a una dilución de 1:100 dejándole crecer durante 12 a 14 horas a 180 rpm a 37°C. Este cultivo se centrifugó a 20,000 xg durante 20 minutos, y después se filtró manualmente utilizando un dispositivo con un tamaño de poro de 0.22 μm (MILLEX Merck). El sobrenadante obtenido se refrigeró a 4°C

Para los ensayos de patogenicidad se inyectaron larvas de sexto instar de *Galleria mellonella* en la región ventral en la tercera región del último segmento abdominal con agujas para insulina de una longitud de aguja de 6mm (BD Ultra-Fine™), se inyectaron 10 μl de cada tratamiento por larva y se mantuvieron a 28°C.

Purificación de las Moléculas del Sobrenadante

Se preparó un preinóculo con un volumen de 3 ml en medio LB de *P. aeruginosa* NA04 con 100ug por ml de Ampicilina y se dejó 12 horas a 37°C. Se hizo una dilución 1:100 en de 200 ml de medio

LB nuevo y se dejó de 12-14 horas. El sobrenadante se obtuvo como se especificó anteriormente y se concentró 10 veces por liofilización (LABCONCO). Se cargaron 4 ml de sobrenadante concentrado en una columna de intercambio aniónico débil con un volumen de 10 ml de DEAE-Sepharose (SIGMA-ALDRICH). La columna previamente fue equilibrada con 30 ml de buffer (25 mM TRIS-HCL, pH 8.0). Después de ser cargada la muestra, se utilizaron 30 ml de buffer de equilibrio para las fracciones inespecíficas. Después se utilizó 30ml de un gradiente continuo para eluir la muestra (25 mM TRIS-HCL, pH 8.0, 0.15 M- 1 M de NaCl). Se midió cada fracción en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 280nm (NANO DROP 2000c, Thermo Scientific). Se hizo un pool de las fracciones que por absorbancia arrojaron picos, se concentraron por liofilización y se probó su actividad insecticida en larvas del sexto instar de *Galleria mellonella*. Se cuantificó por método de Bradford cada pool y se cargaron 15µg en un gel SDS-PAGE para su visualización.

HPLC

Las muestras analizadas por HPLC de fase reversa se realizaron en el sistema Waters 2695, con una columna C-18 (5 µm, 15cm x 4.6mm), el horno para la columna a una temperatura de 30°C y a un flujo de 3ml por minuto. La fase móvil consistió de un gradiente creciente de acetonitrilo (CH₃CN). Para el monitoreo de las proteínas en las muestras se utilizó una longitud de onda de 280 nm.

Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático, se tomó la anotación genómica en formato fasta de aminoácidos (.faa) de *P. aeruginosa* NA04 de *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*(PGAP) de NCBI y se corrió en el servidor SignalP 5.0⁴⁴, el cual predice los péptido señales para dos vías de secreción: la vía Sec (General secretory pathway) y la vía Tat (*Twin-arginine translocation*). Las señales peptídicas (SP) son secuencias aminoacídicas cortas ubicados mayoritariamente en el extremo N-terminal de las proteínas que llevan información para la secreción de proteínas. Son ubicuas para todos los procariontes y eucariotes⁴⁵. Durante o después de la translocación de membrana, una enzima (*signal peptidase*) escinde la péptido señal. En el servidor SignalP 5.0 para organismos procariontes, se distinguen dos tipos de péptido señal para la vía de secreción Sec, las señales peptídicas escindidas por la enzima SPase I o LepB (bacteria), y las escindidas por la enzima signal peptidase II o LPS, la cual es específica para lipoproteínas. Por su parte en la vía Tat solo se toma en cuenta la señal peptídica escindida por la enzima SPase I. Por lo tanto, SignalP 5.0 distingue

tres tipos de señal peptídica en rporariontes, aquellas proteínas que pasan por la vía Sec escindidos por Spase I (Sec/SPI) y por SPase II (Sec/SPII), y proteínas que pasan por la vía Tat escindidos por SPase I (Tat/SPI). Para la búsqueda, no se tomaron en cuenta aquellas proteínas con una predicción de Sec/SPII, ya que esta vía es para incorporar proteínas en la membrana plasmática, por lo cual no son secretadas al medio extracelular. Aunado a esto, el servidor arroja un porcentaje de probabilidad en la predicción de la señal peptídica de 0 a 1. Se tomaron aquellas que tuvieran un puntaje igual o mayor a 0.6.

Resultados

Valoración de la actividad insecticida del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* NA04

Se evaluó la actividad insecticida del sobrenadante en larvas de *Galleria mellonella* del sexto instar. Los tratamientos consistieron en la aplicación del extracto del sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04 sin diluir, una dilución 7:10, 1:2, 3:10 y 1:10, como controles se utilizó sólo un pinchazo y la inyección de 1mg de BSA. Las larvas se inspeccionaron cada 12 horas, reportándose una actividad marcada a las 24 y 48 horas (Fig. 7A y 7B). Como se puede observar el sobrenadante sin diluir tiene una actividad cercana al 80%, lo mismo para la dilución 7:10, la dilución 1:2 muestra una actividad cercana al 50%, y la dilución 3:10 cuenta con una actividad cercana el 10%, mientras que la dilución 1:10 no presentó actividad, esto a las 24 horas. A las 48 horas se observó un aumento alrededor de un 10% para los tratamientos que mostraron actividad, el sobrenadante sin diluir mostró un 90% de actividad, al igual que la dilución 7:10, por su parte, la dilución 1:2 mostró alrededor del 60% de actividad, mientras que la dilución 3:10 un 20%.

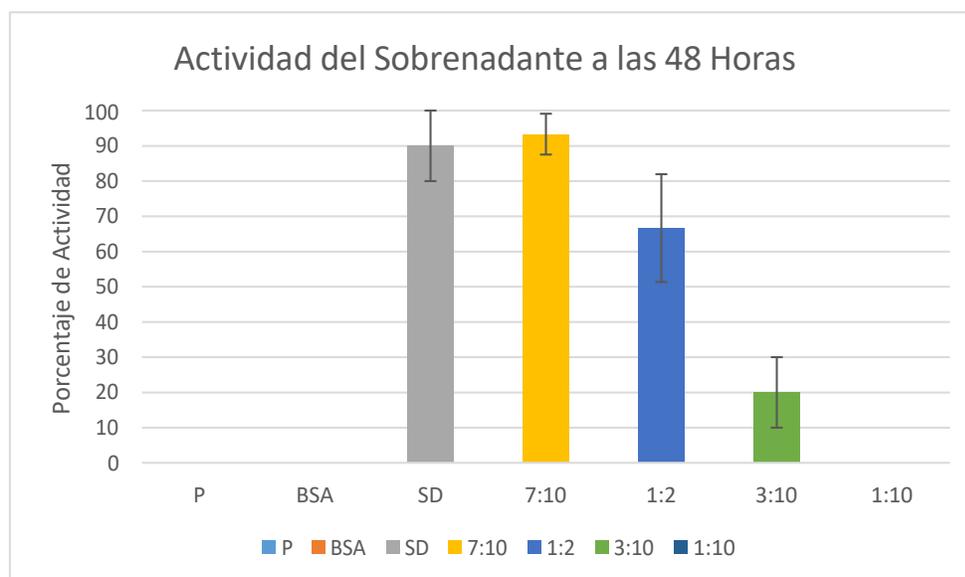
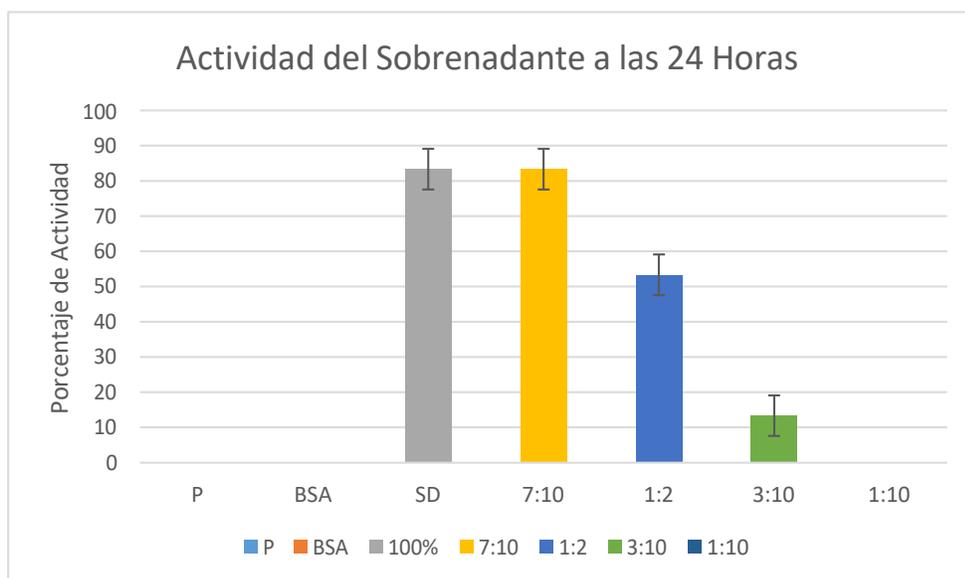


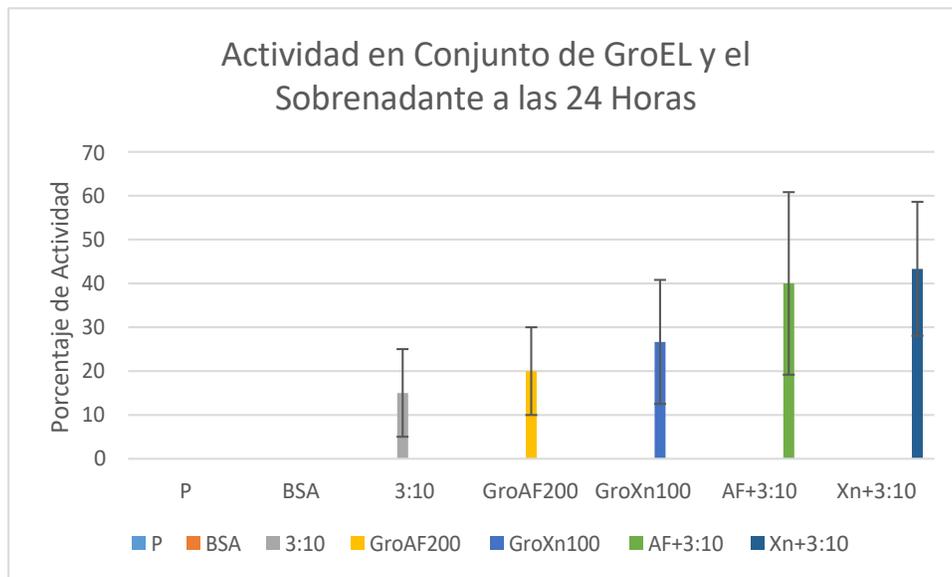
Fig. 7. Actividad del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* NA04. P: Pinchazo, BSA: Inyección de 1mg de BSA, SD: Inyección del sobrenadante sin diluir, 7:10 – 1:10: Inyección de diluciones del sobrenadante denotado como a: b, a partes del volumen del sobrenadante respecto al volumen total b.

- (A) Actividad insecticida a las 24 horas del sobrenadante de *P.aeruginosa*.
- (B) Actividad insecticida a las 48 horas del sobrenadante de *P.aeruginosa*.

Actividad del sobrenadante en conjunto con GroEL

Para evaluar la capacidad aditiva de las moléculas del sobrenadante junto con GroEL se eligió la dilución 3:10 del sobrenadante, la cual cuenta con una actividad de alrededor del 20% de

mortalidad a las 48 horas. Con respecto a GroEL se eligieron las concentraciones 200 y 100 ng de *Alcaligenes faecalis* y *Xenorhabdus nematophila* respectivamente (Fig. 8), las cuales cuentan con una mortalidad de alrededor del 20% y 40% a las 48 horas como se mostró en antecedentes. La dilución 3:10 mostró una actividad similar a los ensayos de actividad del sobrenadante, con una mortalidad del 20% a las 48 horas. Por su parte GroEL de *A. faecalis* y de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 a las 48 horas tuvieron una actividad similar a las reportadas en antecedentes. La actividad del sobrenadante en conjunto con GroEL se evaluaron hasta las 48 horas. A las 24 horas la dilución junto con GroEL de *A. faecalis* tuvo una actividad cercana al 40%, por su parte la dilución en conjunto con GroEL de *Xenorhabdus namatophila* SC 0516 mostró una actividad similar cercana al 40% en el mismo lapso de tiempo. A las 48 horas el sobrenadante junto con GroEL de *A. faecalis* alcanzaron una mortalidad del 70 %, por su parte el sobrenadante y GroEL de *X. nematophila* alcanzaron una actividad del 90%.



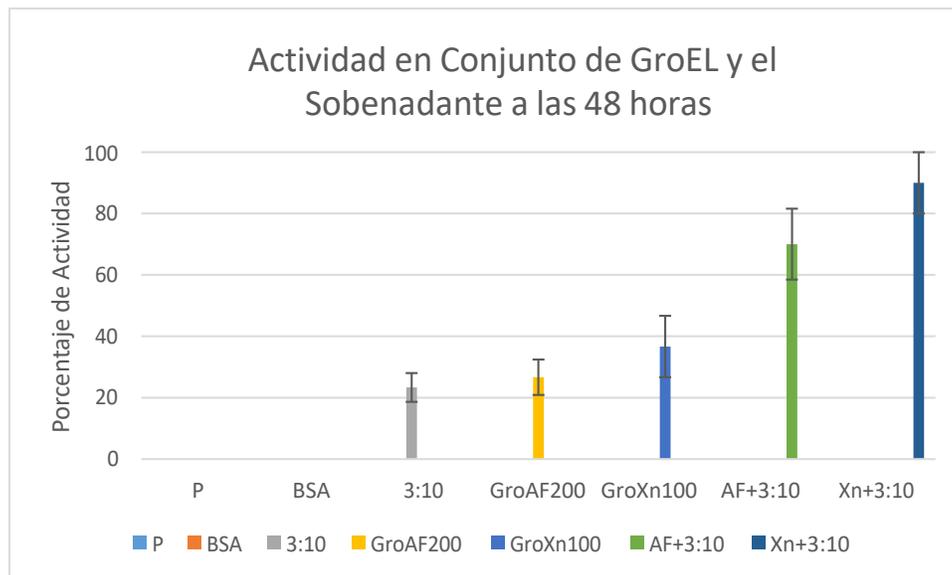


Fig. 8. Actividad del sobrenadante en conjunto con GroEL proveniente de *A. faecalis* y *Xenorhabdus nematophila* SC 0516. P: Pinchazo, BSA: Inyección de 1mg de BSA, 3:10: Inyección de la dilución 3:10 del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* NA04, GroAF200: Inyección de 200 ng de GroEL de *Alcaligenes faecalis*, GroXn100: Inyección de 100 ng de GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516, AF+3:10: Inyección de GroEL de *A. faecalis* y la dilución 3:10 del sobrenadante, Xn+3:10: Inyección de la dilución 3:10 del sobrenadante más GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516.

Análisis bioinformático

Para tener una idea de posibles proteínas con actividad insecticida secretadas por *Pseudomonas aeruginosa* NA04 al medio extracelular, se realizó un análisis bioinformático. El servidor SignalP 5.0 arrojó un total de 653 proteínas con una predicción de señal peptídica, de las cuales 608 son sustratos para la vía Sec, y el resto para la vía Tat. En la siguiente tabla (Fig. 8) se muestran 3 proteínas con potencial de secreción además de ser catalogadas como factores de virulencia, la Exotoxina A⁴⁶ y la Proteasa IV⁴⁷ y Fosfolipasa C⁴⁸. La elección se hizo de manera manual, en base a la proteína con posibilidad de secreción, y a su actividad reportada en la anotación genómica.

Toxinas Secretadas al Medio por *Pseudomonas aeruginosa* NA04

	Vía de Secreción	Función	Probabilidad
Exotoxina A	Vía Sec	Una ADP-ribosiltransferasa dependiente de NAD (ADPRT). Cataliza la transferencia del resto ribosilo ADP de NAD oxidado (NAD ⁺) al factor de alargamiento eucariótico 2 (eEF-2), lo que detiene la síntesis de proteínas.	0.9918
Proteasa IV	Vía Sec	In vitro puede digerir inmunoglobulinas, fibrinógeno, plasminógeno.	0.9919
Fosfolipasa C	Vía Tat	Actividad hemolítica	0.9949

Fig. 9. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* NA04 con alta probabilidad de ser secretados al medio extracelular.

Purificación de la Toxinas del Sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04

Para la purificación de las toxinas responsables de la actividad insecticida, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose SIGMA-ALDRICH). En la columna se cargaron 2ml del sobrenadante concentrado 10 veces por liofilización. Se obtuvieron 120 fracciones con un volumen de 1 ml por fracción. Cada una fue monitoreada por absorbancia a

280 nm (Fig. 9) con el objetivo de encontrar fracciones con proteína. Como se puede observar en la gráfica, se obtuvieron dos picos. El primero es del lavado de la columna con el buffer de equilibrio, las cuales abarcan de la fracción 2 a la 24. En el segundo pico son las fracciones obtenidas con el buffer de elución, las cuales abarcan las fracciones 37 hasta la 58. Se hizo una mezcla de las fracciones, la primera consta de las fracciones 2 hasta la 24, la cual se llamó F1. La mezcla del resto de fracciones, de la 59 hasta la 120, se llamó F2. F1 y F2 se liofilizaron hasta sequedad y se resuspendieron en 1 ml y 500 µl de agua estéril respectivamente.

Para probar su actividad se inyectaron 10 µl de cada mezcla en larvas de *Galleria mellonella*, mientras que F1 mostró una mortalidad del 100%, F2 no mostró actividad alguna: (Fig.10). Posteriormente se cargaron 15 µl de cada pico en un gel SDS-PAGE AL 12%, pero no se observó ninguna banda.

Debido a que no se detectaron proteínas en el SDS-PAGE, se concentró el sobrenadante 20 veces y se cargaron 5 ml a la columna. Debido a que sólo se encontró actividad en la mezcla F1, la recolección se realizó de manera diferente; se recolectaron 30 ml pertenecientes al lavado por el buffer de equilibrio y se denominó a la fracción como F1. Para el paso del buffer de elución, se recolectaron 3 fracciones con un volumen de 10 ml cada una, y se denominaron como F2, F3 y F4 según el orden de recolección. Se realizó liofilización de las fracciones y se resuspendieron en 500 µl de agua estéril.

Se cuantificó la proteína por el método de Bradford de cada fracción, arrojando F1 una concentración de 842.43 µg por ml, F2 1245.85 µg por ml, F3 1149.56 µg por ml y F4 no dio lectura.

Se cargaron 20 µl de cada fracción en un SDS-PAGE al 12%. En el carril de la fracción F1 se observaron 2 bandas con un peso molecular de alrededor de 25 y 15 kDa, en el carril de F2 se observó una banda de alrededor de 65 kDa, mientras en el carril de F3 se nota una banda del mismo peso de 65 kDa y una banda de alrededor de 35 kDa, por su parte en el carril perteneciente a F4 no se observaron bandas (Fig 12). Se inyectaron 10 µl de cada fracción en *Galleria mellonella* para volver a comprobar la actividad insecticida, nuevamente, sólo se encontró actividad en la fracción perteneciente al paso del buffer de equilibrio. Para comprobar que la actividad insecticida de la fracción F1 es debido a un componente proteico, se procedió a calentar la muestra durante 10 minutos a 100°C. La actividad disminuyó un 60% en la fracción tratada por calor (Fig 13).

Posteriormente, para enriquecer la proteína con mayor actividad insecticida, se decidió utilizar la cromatografía rápida de alta eficacia (HPLC). Específicamente se utilizó una columna C-18 y acetonitrilo como fase móvil (5% - 100%), la duración de la corrida fue de 40 minutos y para el monitoreo de los compuestos de la muestra se usó la medición de la absorbancia a 280nm. Durante los primeros 10 minutos de corrida en la fase móvil se usó un porcentaje constante del 5% de acetonitrilo, enseguida el gradiente empieza desde 5% hasta el 100% por 30 minutos.

Se inyectó en el equipo 700 µl de la fracción F1 proveniente de la separación por la cromatografía de intercambio aniónico y, se procedió a hacer una recolección de los picos que surgieron por la medición de la absorbancia. Como se puede observar en el cromatograma (Fig. 14), se forman tres picos, uno correspondiente a los minutos 4 - 12, otro de los minutos 13 - 14.5 y otro en los minutos 16-36, los cuales fueron recolectados. Además, fue recolectado el resto de volumen que no pertenece a ningún pico. Las muestras se pasaron por un ultrafiltrador con una membrana de 10kDa y se utilizaron 10 volúmenes del buffer (25 mM TRIS-HCL, pH 8.0) para eliminar la cantidad de acetonitrilo.

Para evaluar la actividad insecticida, se inyectaron 10 µl de cada muestra en larvas de *Galleria mellonella*. Como se puede observar (Fig. 15), la actividad se observó prominentemente en la fracción 4-12, con un porcentaje cercano al 80%, mientras que la fracción 16-36 tuvo actividad cercana al 20%, las otras fracciones no tuvieron actividad, todo esto a las 48 horas.

Con base a estos resultados nos enfocamos en el pico 4 - 12, ya que los resultados indicaban que probablemente el componente con mayor actividad insecticida se encuentre ahí. El pico 4 - 12 se inyectó en el equipo. Para la elución, se utilizó la solución con acetonitrilo al 5%. De esta manera se trató de dividir el pico con base a los tiempos de recolección, como se muestra en la siguiente figura (Fig. 16). El pico se dividió en dos, uno que abarca los minutos 4 - 5.9 y otro que abarca los minutos 5.9 - 12. Se evaluó la actividad insecticida de ambas fracciones (Fig. 17). Ambas tuvieron un porcentaje de actividad muy cercano a las 48 horas, de alrededor del 70%.

A la par del experimento anterior, se realizó otro intento para separar la actividad insecticida del pico 4 -12. Ya que este eluye con 5% de acetonitrilo, por lo tanto, es de un carácter hidrofílico, es por esto que ahora se utilizaron dos fases móviles, durante los primeros 15 minutos de la corrida se utilizó agua miliQ, y enseguida una concentración del 100% de acetonitrilo, la primera se denominó fase acuosa (Aq) y la segundo como fase acetonitrilo (Ac).

Posteriormente, todas las fracciones fueron tratadas por calor, además del sobrenadante concentrado. Como se hizo anteriormente, las muestras fueron hervidas durante 10 minutos a una temperatura de 100°C, la actividad fue la siguiente (Fig. 18). El porcentaje de actividad observado en la fase acuosa tiene un porcentaje cercano al 50%, mientras la fase acetonitrilo una actividad de alrededor del 70%, el sobrenadante completo tuvo un porcentaje del 100%, el resto de las fracciones no hervidas mantuvieron una actividad similar a las mostradas antes. Es de destacar que todas las fracciones tratadas por calor perdieron completamente la actividad, excepto el sobrenadante completo hervido, el cual conservó 20%.

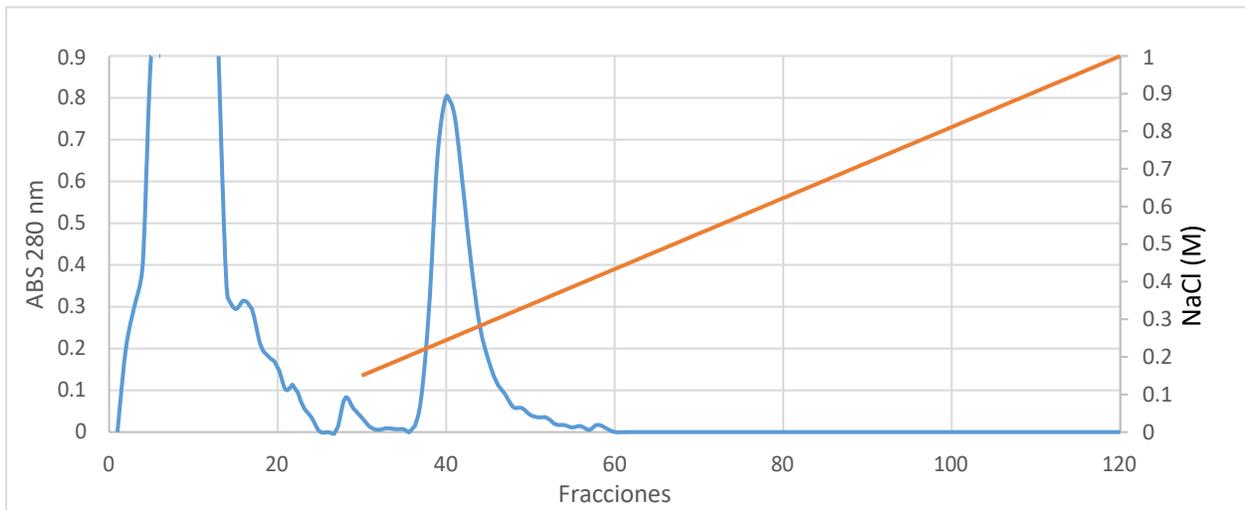


Figura 10. Cromatograma que muestra los dos picos obtenidos en la corrida por cromatografía de intercambio iónico.

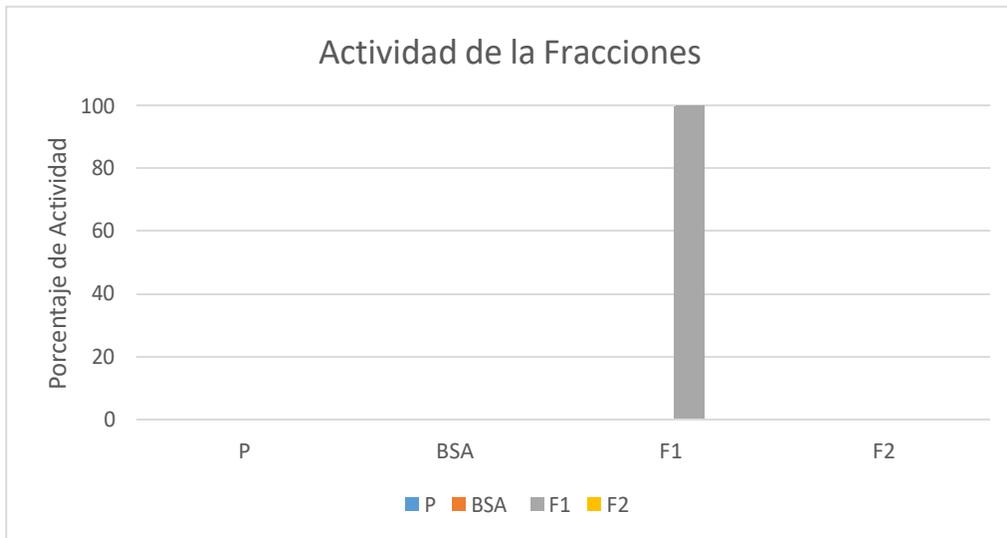


Figura 11. Actividad de picos que mostraron absorbancia a 280nm.

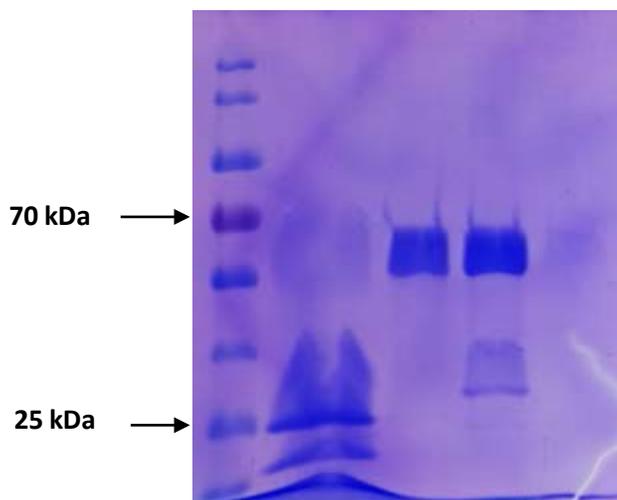


Fig 12. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la separación de los componentes del sobrenadante por una cromatografía de intercambio aniónico débil. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: F1, carril 3: F2, carril 4: F3, carril 5: F4

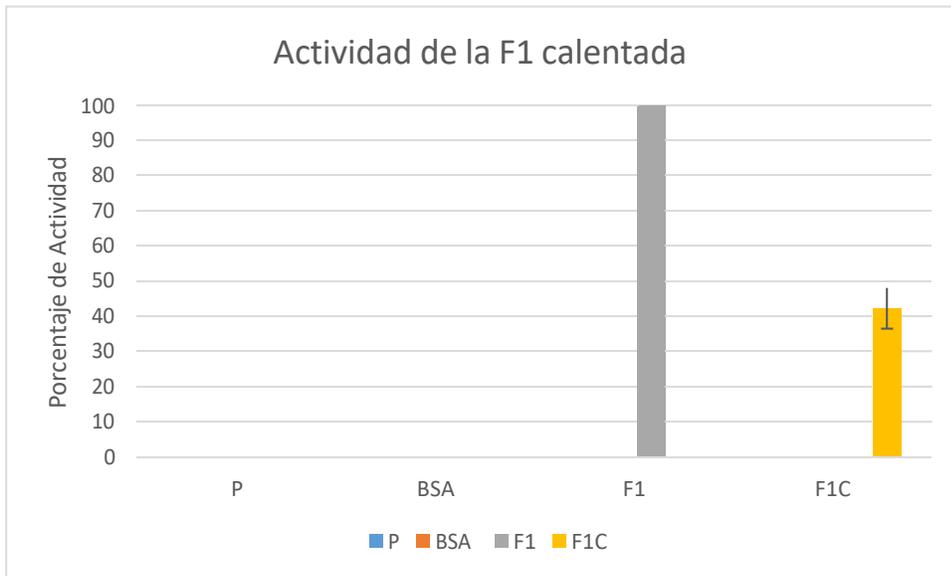


Fig. 13 Actividad de la Fracción con actividad insecticida tratada por calor. P: Pinchazo, BSA: Inyección de 1mg de BSA, F1: Inyección de la fracción obtenida por el paso del buffer de equilibrio, F1C: Inyección de la misma fracción tratada por calor.

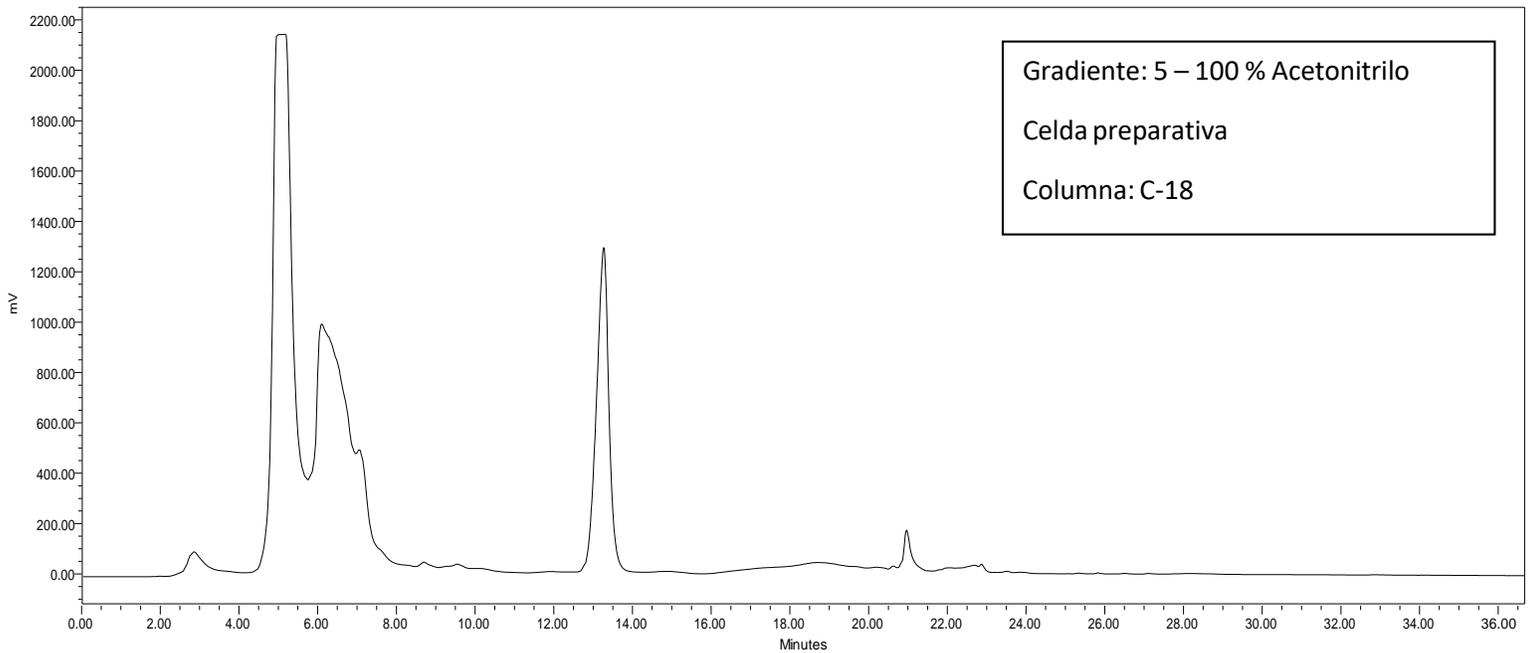


Fig. 14 Cromatograma de la fracción F1 separada por HPLC en una columna C-18

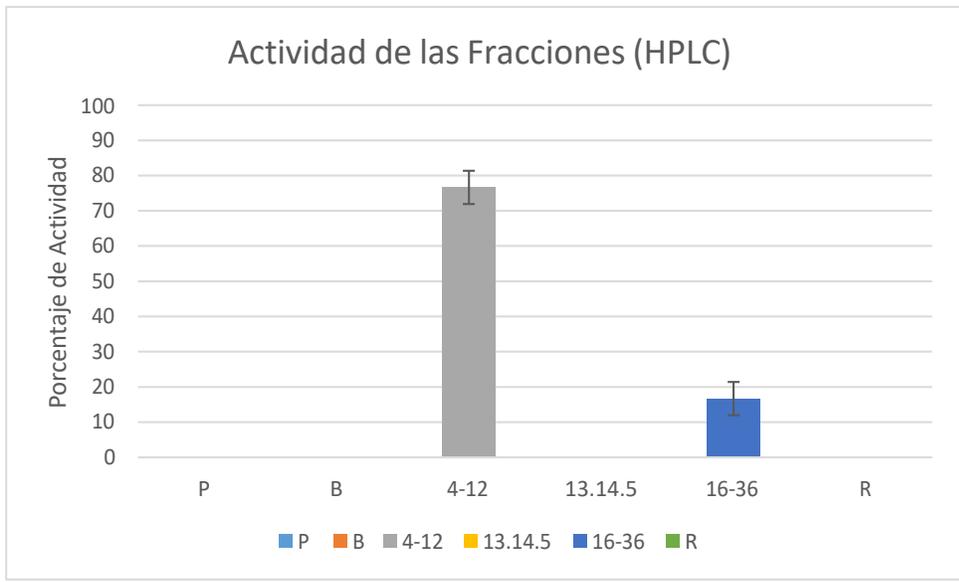


Fig. 15 Actividad de las fracciones 4-12, 13-14.5, 16-36 y R con actividad insecticida tratada por calor. P: Pinchazo, B: Inyección de 1mg de BSA, R: Restos de la corrida

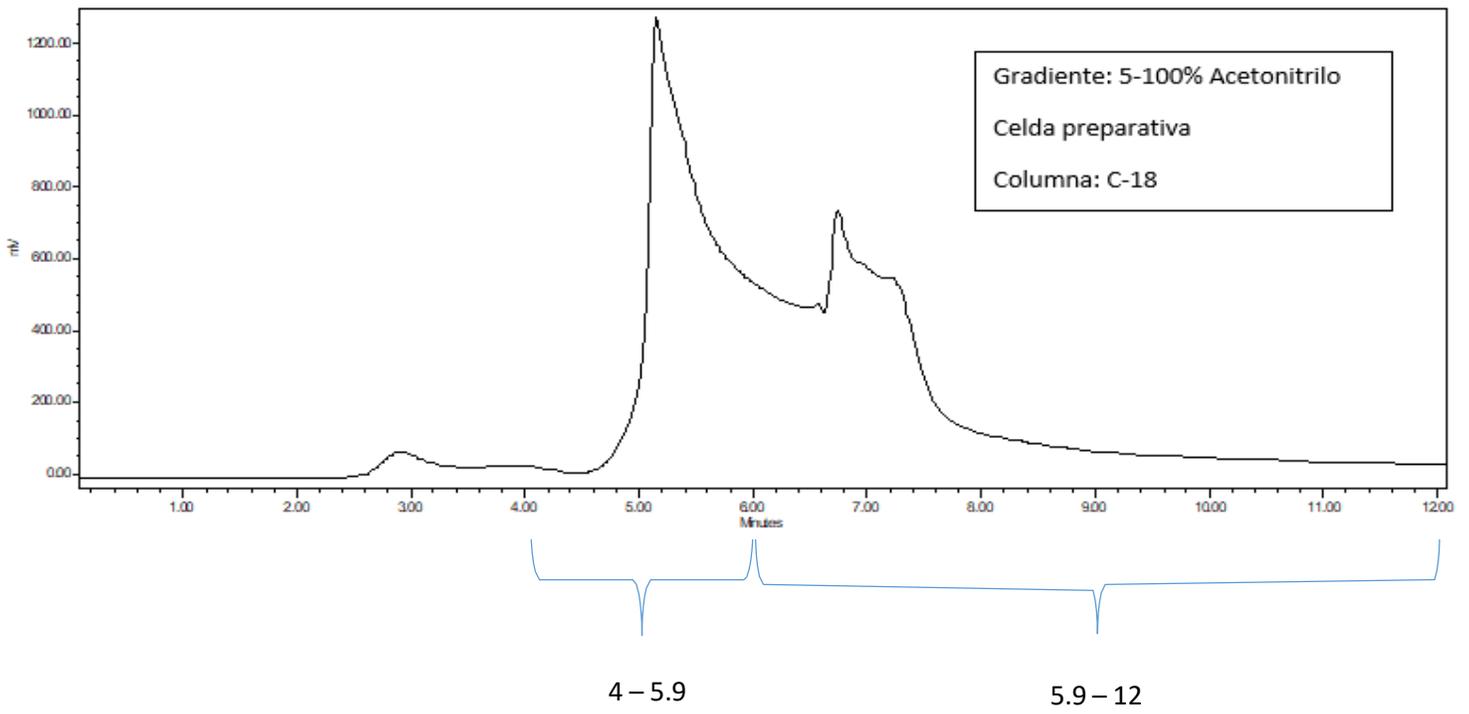


Fig. 15 Cromatograma de la fracción de la recolección por tiempo del pico 4.0-12

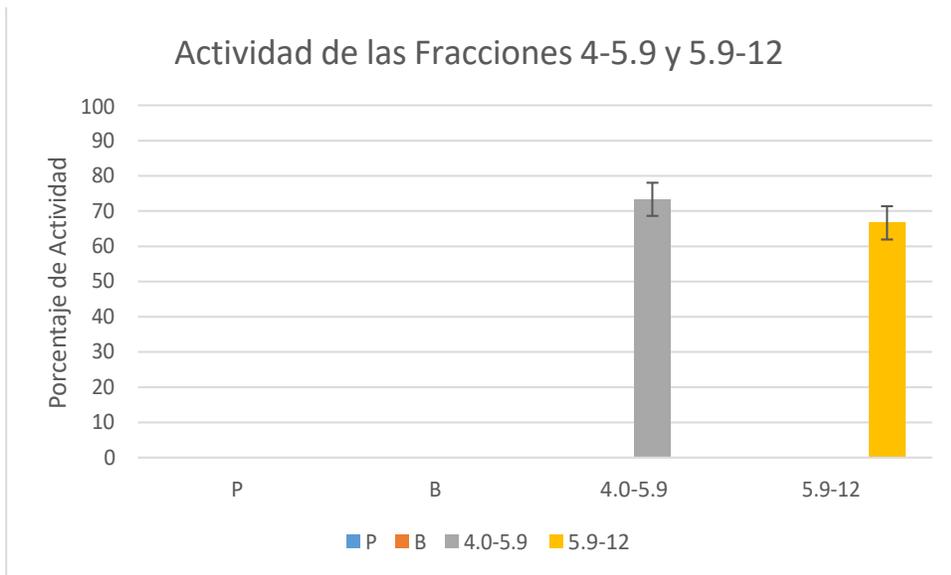


Fig. 16 Actividad de las fracciones 4.0-5,9, 5.9-12. P: Pinchazo, B: Inyección de 1mg de BSA

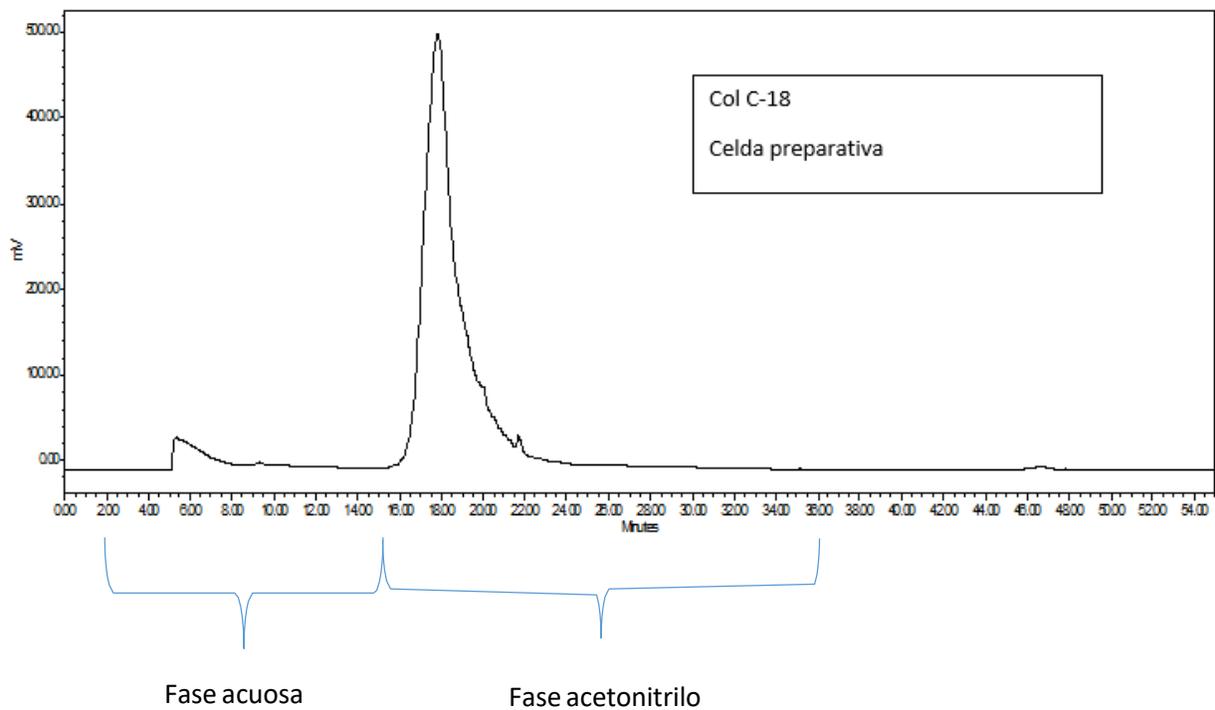


Fig. 17 Cromatograma de la separación del sobrenadante concentrado por dos fases, fase acuosa (consiste en el paso de agua miliQ por 15 minutos) y fase acetonitrilo (consiste en el paso de acetonitrilo al 100% durante 21 minutos)

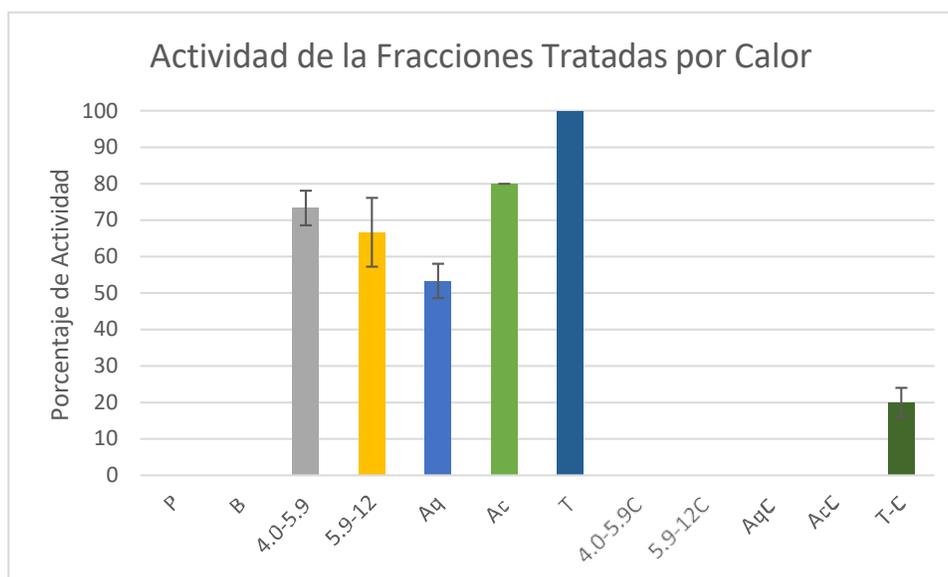


Fig. 18 Actividad de todas las fracciones obtenidas por HPLC además de la actividad de éstas tratadas por calor. P: Pinchazo, B: 1mg de BSA Aq: Fase acuosa, Ac: Fase acetonitrilo, C: indica que la muestra fue hervida a 100°C

Discusión

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de las diferentes diluciones del sobrenadante mostraron una actividad del 20% a las 48 en la dilución 3:10. Para evaluar la capacidad aditiva de las moléculas del sobrenadante y la chaperonina GroEL se utilizó una dosis de GroEL que causara un porcentaje de mortalidad semejante en el mismo lapso de tiempo que la dilución mencionada. Es por eso que se utilizaron 200ng de GroEL de *Alcaligenes faecalis* y 100ng de la GroEL de *Xenorhabdus nematophila*. Se utilizaron estas dos GroEL ya que en un experimento previo se observó que de todas las GroEL probadas, eran las chaperoninas con la menor y mayor actividad insecticida respectivamente. Los resultados muestran que la administración de la dilución del sobrenadante de *P. aeruginosa* en conjunto con GroEL de *A. faecalis* y *Xenorhabdus nematophila* tienen una mortalidad del 70% y 90% a las 48 horas respectivamente, mientras que por separado todos los tratamientos en el mismo lapso de tiempo tienen una actividad de alrededor del 20% excepto por la GroEL de *Xenorhabdus sp*, la cual cuenta con un 40%.

La actividad insecticida de GroEL en conjunto con el sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* NA04 tiene una mortalidad más grande que la suma de los tratamientos individuales, lo que podría definirse como un efecto sinérgico^{39,40}, pero debido a que el sobrenadante es una mezcla de varias moléculas, el uso de herramientas matemáticas para corroborarlo no sería adecuado, ya que se

utilizan moléculas purificadas para hacer este tipo de análisis⁵⁰. Aunque no se pueda asegurar una sinergia, hay al menos una clara tendencia aditiva entre el sobrenadante y las GroEL probadas.

Por otra parte, la separación del sobrenadante por cromatografía de intercambio iónico arrojó una fracción con actividad insecticida, para constatar que esta actividad es debido a un componente proteico, se calentó la muestra a 100 °C. La actividad se vio reducida un 60 %. Aunado a esto, todas las muestras con actividad obtenidas por HPLC y el sobrenadante concentrado cuando fueron tratadas por calor perdieron la actividad, excepto por el sobrenadante concentrado que mantuvo una actividad pequeña del 20%.

La pérdida de actividad al ser calentado el sobrenadante concentrado, las muestras de intercambio aniónico y HPLC, indica que la actividad insecticida en el sobrenadante se encuentra dada mayoritariamente por moléculas sensibles a altas temperaturas, como lo son las proteínas.

Para dar más soporte a lo anterior, se realizó un análisis *in silico* de las posibles proteínas que pudiera producir y excretar la bacteria, las cuales pudieran tener actividad insecticida. El análisis bioinformático indicó que 653 proteínas pudieran estar siendo secretadas al medio extracelular. Comparándolo con un estudio en donde se analiza el secretoma de una *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial por medio de espectrometría de masas⁵¹, tenemos que nuestro análisis pronostica el doble de proteínas, ya que en este se encontraron 371 proteínas secretadas al medio, tal vez la discrepancia se deba a los rangos de probabilidad de péptido señal elegidos, tomando parámetros más estrictos probablemente se hubiera obtenido un número similar al del estudio. En nuestro análisis bioinformático tres proteínas; Exotoxina A, Fosfolipasa C y la Proteasa IV, son candidatas para la actividad insecticida, aunque nunca se ha comprobado en ningún modelo de insecto, y sólo se ha observado actividad de virulencia en humanos y en ratones. En otro estudio de igual forma se analizó el secretoma de una *Pseudomonas aeruginosa*⁵², en este caso se encontraron factores virulencia como la Fosfolipasa C, la zinc metaloproteasa AprA, una quitinasa ChiC, la elastasa LasB, y algunas proteasas como la PasP, y la LasA. Fosfolipasa C es la única proteína que aparece en nuestro análisis bioinformático y en el análisis del secretoma, se ha demostrado que la fosfolipasa C cuenta con actividad hemolítica⁵³, siendo un factor de virulencia en humanos y ratones. Como se mencionó antes, ésta podría ser una molécula candidato para la actividad insecticida. Comparando el peso molecular de estas proteínas, con las bandas observadas en el SDS-PAGE de la fracción F1 obtenida por cromatografía de intercambio aniónico, el peso

molecular de la fosfolipasa C no corresponde con ninguna banda del gel, ya que la Fosfolipasa C se encuentra en los 80 kDa, mientras que las bandas en el gel tienen un peso molecular de 25 y 15 kDa.

Existe un reporte de actividad insecticida de la zinc metaloproteasa AprA proveniente de *Pseudomonas entomophila* en *Galleria mellonella*⁵⁴, en este estudio aislaron la proteína del sobrenadante de la bacteria por medio de una cromatografía de intercambio aniónico, al igual que en nuestra corrida, la proteína se encontró en la fracción que no interactúa con la resina, además en nuestro análisis se encontraron dos homólogos de la AprA; la AprE y la AprF, las cuales cuentan con una péptido señal. De nuevo comparando el peso molecular de la AprA con las bandas en el gel, esta cae fuera del rango, ya que cuenta con un peso molecular de 45 kDa.

En el análisis del secretoma, se menciona a la proteína PasP. Esta es una proteasa de 20 kDa, inyectada en cornea de conejo causa un severo daño ocular⁵⁵. La proteína no se encontró en nuestro análisis, pero el peso molecular es similar a las bandas mostradas en el gel.

La proteasa IV no se encontró en el secretoma de *Pseudomonas aeruginosa*, pero si en nuestro análisis bioinformático, como se mencionó, esta proteína es un factor de virulencia que degrada moléculas del sistema inmune *in vitro*, tiene un peso molecular de 26 kDa y además se reporta que tiene un punto isoeléctrico de 8.70^{56,57}, esto quiere decir que al pH 8.0 que se utiliza en la columna de intercambio aniónico tendría una carga positiva, por lo que tendría la misma carga que la resina, por lo tanto es comprensible que la proteína se encuentre en la fracción F1, la cual no se adhiere a la resina.

Los resultados obtenidos por el análisis bioinformático y los análisis de secretomas consultados, indican que hay proteínas que pueden ser las responsables de la actividad insecticida. Aunque algunas discrepan en el peso molecular propio de la proteína y, de las bandas mostradas en el gel, esto no quiere decir que estén excluidas de ser candidatas, ya que es posible que lo que observamos en el gel sean proteínas que están degradadas y, por lo tanto, son partes de la proteína y no la proteína entera como tal. Por otro lado, proteínas encontradas en el secretoma pero que no se encontraron en el análisis bioinformático, pueda deberse a que varias proteínas en la anotación genómica con alto porcentaje de péptido señal, eran marcadas como proteínas putativas y la búsqueda de su actividad bioquímica no arrojó resultados. Por lo que es posible que algunas de estas proteínas putativas se trataran de las mencionadas en el análisis del secretoma.

Analizando las posibles interacciones de GroEL y las moléculas del sobrenadante, un estudio reporta la interacción de GroEL física con microcistinas⁵⁹, estas son toxinas peptídicas producidas por la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, en el estudio se discute que existe la posibilidad de que esta unión esté implicada en la regulación de la síntesis de carbohidratos.

Ya que GroEL se encarga de plegar proteínas y al hacer esto tiene que interactuar físicamente con ellas, con el reporte de GroEL uniéndose a quitina³⁹ y a microcistinas, además de los indicios de actividad insecticida por parte de proteínas en el sobrenadante, puede pensarse que GroEL esté interactuando físicamente con una proteína en el sobrenadante, lo cual potencia el efecto tóxico individual de ambas. Aunque ningún experimento realizado puede corroborar esto.

Debatiendo lo anterior, la GroEL de *Xenorhabdus nematophila* y el sobrenadante tienen una mayor actividad que la GroEL de *Alcaligenes faecalis* y el mismo sobrenadante. La diferencia de actividad es similar cuando se compara con la diferencia de actividad de las GroEL por si solas. En base a esto, se puede discutir que, aunque puede haber un potenciamiento de la actividad cuando se suministran las GroEL junto con el sobrenadante, es posible que la actividad se deba a que el organismo, en este caso *Galleria mellonella*, tenga que lidiar con dos toxinas, y sea esta la razón del porcentaje de individuos muertos observados. Entonces en la actividad en conjunto no existe la interacción física entre las dos moléculas y es el efecto tóxico individual de ambas moléculas en sitios diferentes el causante de la mortalidad observada. De nuevo, los datos no son suficientes para corroborarlo.

Por último, no se descarta la posibilidad de que una molécula con un origen diferente al proteico esté implicada en la actividad insecticida. En la bacteria del mismo género, *Pseudomonas protegens* F6 se encontró el metabolito Orfamida A, el cual mostró actividad insecticida en contra del insecto *Myzus persicae*⁶⁰.

Conclusión

La dilución 3:10 del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* mostró actividad insecticida en larvas de *Galleria mellonella*, cuando se administró junto con la GroEL de *Xenorhabdus sp.* y *Alcaligenes faecalis* se observó un potenciamiento de la actividad tóxica en insectos, correspondiente a un efecto cuando menos aditivo.

La fracción F1, 4-5.9, 5.9-12, 1.8-14.5, 15-36 mostraron una disminución de la actividad cuando se trataron por calor, es por eso que la actividad insecticida probablemente se deba a un componente proteico, aunque no se descarta la posibilidad de que otro tipo de molécula sea la responsable de esta. Los análisis bioinformáticos aunados a los reportes de secretoma de la bacteria muestran posibles candidatos proteicos con actividad insecticida los cuales pudieran encontrarse en las fracciones 4-5.9, 5.9-12 y 1.8-14.5.

Tomando en cuenta todas las variables (aparición en el análisis bioinformático, peso molecular, aparición en análisis de secretoma, punto isoeléctrico y virulencia en insectos), la proteína responsable de la actividad insecticida probablemente se trate de algún homólogo de la proteína AprA.

Referencias Bibliográficas

1. Jeffery, C. J. (2009). *Moonlighting proteins—an update*. *Molecular BioSystems*, 5(4), 345.
2. Kumar, C. M. S., Mande, S. C., & Mahajan, G. (2015). *Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors*. *Cell Stress and Chaperones*, 20(4), 555–574.
3. Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, 22(1), 631–677.
4. Niforou, K., Cheimonidou, C., & Trougakos, I. P. (2014). *Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance*. *Redox Biology*, 2, 323–332.
5. Mattoo, R. U. H., & Goloubinoff, P. (2014). *Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(17), 3311–3325.
6. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). *Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis*. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 323–355.
7. Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). *The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death*. *Molecular Cell*, 40(2), 253–266.
8. Ranson, N. A., Farr, G. W., Roseman, A. M., Gowen, B., Fenton, W. A., Horwich, A. L., & Saibil, H. R. (2001). ATP-Bound States of GroEL Captured by Cryo-Electron Microscopy. *Cell*, 107(7), 869–879.
9. Horovitz, A., & Willison, R. K. (2006). Allosteric regulation of chaperonins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(6), 646–651.
10. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1994). *The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å*. *Nature*, 371(6498), 578–586.
11. Thirumalai, D., & Lorimer, G. H. (2001). *Chaperonin-Mediated Protein Folding*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30(1), 245–269.
12. Valpuesta, J. M., Martín-Benito, J., Gómez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., & Willison, K. R. (2002). *Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT*. *FEBS Letters*, 529(1), 11–16.

13. Huo, Y., Hu, Z., Zhang, K., Wang, L., Zhai, Y., Zhou, Q., ... Sun, F. (2010). *Crystal Structure of Group II Chaperonin in the Open State. Structure, 18(10), 1270–1279.*
14. Kim, S., Willison, K. R., & Horwich, A. L. (1994). *Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. Trends in Biochemical Sciences, 19(12), 543–548.*
15. Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., ... Hightower, L. E. (2008). *Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress and Chaperones, 14(1), 105–111.*
16. Grallert, H., & Buchner, J. (2001). *Review: A Structural View of the GroE Chaperone Cycle. Journal of Structural Biology, 135(2), 95–103.*
17. Breiman, A., & Azem, A. (2018). Editorial: Type I Chaperonins: Mechanism and Beyond. *Frontiers in molecular biosciences, 5, 72.*
18. Xu, Z., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1997). *The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)₇ chaperonin complex. Nature, 388(6644), 741–750.*
19. Clare, D. K., Vasishtan, D., Staggs, S., Quispe, J., Farr, G. W., Topf, M., ... Saibil, H. R. (2012). *ATP-Triggered Conformational Changes Delineate Substrate-Binding and -Folding Mechanics of the GroEL Chaperonin. Cell, 149(1), 113–123.*
20. Weissman, J. S., Hohl, C. M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., ... Norwich, A. L. (1995). *Mechanism of GroEL action: Productive release of polypeptide from a sequestered position under groes. Cell, 83(4), 577–587.*
21. Huberts, D. H. E. W., & van der Klei, I. J. (2010). *Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1803(4), 520–525.*
22. Hendriks, W., Mulders, J. W., Bibby, M. A., Slingsby, C., Bloemendal, H., & de Jong, W. W. (1988). *Duck lens epsilon-crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: a single-copy gene product with two distinct functions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85(19), 7114–7118.*
23. Wistow, G. J. (1988). *Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. The Journal of Cell Biology, 107(6), 2729–2736.*
24. Copley, S. (2003). *Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. Current Opinion in Chemical Biology, 7(2), 265–272.*
25. Jeffery, C. J. (1999). *Moonlighting proteins. Trends in Biochemical Sciences, 24(1), 8–11.*
26. Chen, C., Zabad, S., Liu, H., Wang, W., & Jeffery, C. (2017). *MoonProt 2.0: an expansion and update of the moonlighting proteins database. Nucleic Acids Research, 46(D1), D640–D644.*
27. Lund, P. A. (2009). *Multiple chaperonins in bacteria – why so many? FEMS Microbiology Reviews, 33(4), 785–800.*
28. Kong, T. H., Coates, A. R., Butcher, P. D., Hickman, C. J., & Shinnick, T. M. (1993). *Mycobacterium tuberculosis expresses two chaperonin-60 homologs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(7), 2608–2612.*
29. Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W. R., & Hatfull, G. F. (2005). *GroEL1: A Dedicated Chaperone Involved in Mycolic Acid Biosynthesis during Biofilm Formation in Mycobacteria. Cell, 123(5), 861–873.*
30. Hu, Y., Henderson, B., Lund, P. A., Tormay, P., Ahmed, M. T., Gurcha, S. S., ... Coates, A. R. M. (2008). *A Mycobacterium tuberculosis Mutant Lacking the groEL Homologue cpn60.1 Is Viable but Fails To Induce an Inflammatory Response in Animal Models of Infection. Infection and Immunity, 76(4), 1535–1546.*
31. Fischer, H. M., Babst, M., Kaspar, T., Acuña, G., Arigoni, F., & Hennecke, H. (1993). *One member of a gro-ESL-like chaperonin multigene family in Bradyrhizobium japonicum is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. The EMBO journal, 12(7), 2901–12.*

32. Ogawa, J., & Long, S. R. (1995). *The Rhizobium meliloti groELc locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD*. *Genes & Development*, 9(6), 714–729.
33. Henderson, B., Fares, M. A., & Lund, P. A. (2013). *Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions*. *Biological Reviews*, 88(4), 955–987.
34. Yoshida, N., Oeda, K., Watanabe, E., Mikami, T., Fukita, Y., Nishimura, K., ... Matsuda, K. (2001). *Chaperonin turned insect toxin*. *Nature*, 411(6833), 44–44.
35. Yang, J., Zeng, H.-M., Lin, H.-F., Yang, X.-F., Liu, Z., Guo, L.-H., ... Qiu, D.-W. (2012). *An insecticidal protein from Xenorhabdus budapestensis that results in prophenoloxidase activation in the wax moth, Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(1), 60–67.
36. Shi, H., Zeng, H., Yang, X., Zhao, J., Chen, M., & Qiu, D. (2012). *An Insecticidal Protein from Xenorhabdus ehlersii Triggers Prophenoloxidase Activation and Hemocyte Decrease in Galleria mellonella*. *Current Microbiology*, 64(6), 604–610.
37. Joshi, M. C., Sharma, A., Kant, S., Birah, A., Gupta, G. P., Khan, S. R., Bhatnagar, R., ... Banerjee, N. (2008). *An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from Xenorhabdus nematophila*. *The Journal of biological chemistry*, 283(42), 28287–96
38. Kumari, P., Kant, S., Zaman, S., Mahapatro, G. K., Banerjee, N., & Sarin, N. B. (2013). *A novel insecticidal GroEL protein from Xenorhabdus nematophila confers insect resistance in tobacco*. *Transgenic Research*, 23(1), 99–107
39. Roell, K. R., Reif, D. M., & Motsinger-Reif, A. A. (2017). *An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy—Perspectives from Across Disciplines*. *Frontiers in Pharmacology*, 8.
40. Greco, W. R., Faessel, H., & Levasseur, L. (1996). *The Search for Cytotoxic Synergy Between Anticancer Agents: a Case of Dorothy and the Ruby Slippers?* *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(11), 699–700.
41. Quiroz-Castañeda, R. E., Mendoza-Mejía, A., Obregón-Barboza, V., Martínez-Ocampo, F., Hernández-Mendoza, A., Martínez-Garduño, F., Guillén-Solís, G., Sánchez-Rodríguez, F., Peña-Chora, G., Ortiz-Hernández, L., Gaytán-Colín, P., & Dantán-González, E. (2015). *Identification of a new Alcaligenes faecalis strain MOR02 and assessment of its toxicity and pathogenicity to insects*. *BioMed research international*, 2015, 570243.
42. Salgado-Morales, R., Rivera-Gómez, N., Lozano-Aguirre Beltrán, L. F., Hernández-Mendoza, A., & Dantán-González, E. (2017). *Draft Genome Sequence of a Pseudomonas aeruginosa NA04 Bacterium Isolated from an Entomopathogenic Nematode*. *Genome announcements*, 5(36), e00746-17.
43. Salgado-Morales, R., Rivera-Gómez, N., Martínez-Ocampo, F., Lozano-Aguirre Beltrán, L. F., Hernández-Mendoza, A., & Dantán-González, E. (2017). *Draft Genome Sequence of Photorhabdus luminescens HIM3 Isolated from an Entomopathogenic Nematode in Agricultural Soils*. *Genome announcements*, 5(35), e00745-17.
44. Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. (2018). *A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications*. *European Journal of Cell Biology*, 97(6), 422–441.
45. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. *SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks*. *Nat Biotechnol*.37(4):420-423.
46. Michalska, M., & Wolf, P. (2015). *Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing*. *Frontiers in microbiology*, 6, 963.
47. Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C., & O'Callaghan, R. J. (1998). *Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16792–16797.
48. Vasil, M. L., Berka, R. M., Gray, G. L., & Nakai, H. (1982). *Cloning of a phosphate-regulated hemolysin gene (phospholipase C) from Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 152(1), 431–440.

49. Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). *Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. International journal of medical microbiology : IJMM*, 300(8), 534–543.
50. Cedergreen, N. (2014). *Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. PLoS ONE*, 9(5), e96580.
51. Scott, N. E., Hare, N. J., White, M. Y., Manos, J., & Cordwell, S. J. (2013). *Secretome of Transmissible Pseudomonas aeruginosa AES-1R Grown in a Cystic Fibrosis Lung-Like Environment. Journal of Proteome Research*, 12(12), 5357–5369.
52. Scott, N. E., Hare, N. J., White, M. Y., Manos, J., & Cordwell, S. J. (2013). *Secretome of Transmissible Pseudomonas aeruginosa AES-1R Grown in a Cystic Fibrosis Lung-Like Environment. Journal of Proteome Research*, 12(12), 5357–5369.
53. Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C., ... Vasil, M. L. (2002). *A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. Molecular Microbiology*, 46(3), 661–676.
54. Lee, S. A., Jang, S. H., Kim, B. H., Shibata, T., Yoo, J., Jung, Y., ... Lee, B. L. (2018). *Insecticidal activity of the metalloprotease AprA occurs through suppression of host cellular and humoral immunity. Developmental & Comparative Immunology*, 81, 116–126.
55. Tang, A., Caballero, A. R., Marquart, M. E., & O’Callaghan, R. J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa Small Protease (PASP), a Keratitis Virulence Factor. Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(4), 2821.
56. Traidej, M., Caballero, A. R., Marquart, M. E., Thibodeaux, B. A., & O’Callaghan, R. J. (2003). *Molecular Analysis of Pseudomonas aeruginosa Protease IV Expressed in Pseudomonas putida. Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(1), 190.
57. Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C., & O’Callaghan, R. J. (1998). *Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16792–16797.
58. Li, H., & Bouwer, G. (2014). *Evaluation of the synergistic activities of Bacillus thuringiensis Cry proteins against Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology*, 121, 7–13.
59. Wei, N., Hu, L., Song, L., & Gan, N. (2016). *Microcystin-Bound Protein Patterns in Different Cultures of Microcystis aeruginosa and Field Samples. Toxins*, 8(10), 293.
60. Jang, J. Y., Yang, S. Y., Kim, Y. C., Lee, C. W., Park, M. S., Kim, J. C., & Kim, I. S. (2013). *Identification of Orfamide A as an Insecticidal Metabolite Produced by Pseudomonas protegens F6. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6786–6791.

Cuernavaca, Morelos a 8 de febrero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Roberto Bahena Sánchez**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ADITIVA DE PROTEÍNAS GroEL, DE BACTERIAS ASOCIADAS A NEMÁTODOS, EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LA BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* NA04**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE

SECRETARIO: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

VOCAL: M. EN B. ABRAHAM OMAR RIVERA RAMÍREZ

SUPLENTE: BIÓL. NAYELI SÁNCHEZ GUEVARA

SUPLENTE: DRA. BLANCA INÉS GARCÍA GÓMEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

BLANCA INES GARCIA GOMEZ | Fecha:2021-02-09 14:36:55 | Firmante

vkITf+biQVSRq410wSWYwpkfzo2k9vlztlk5qhMwBk0d6U1Cnf9w0AaKlhd6szwOh4cPi010uPhuzDBq5BV88Dgzo4XNKAbpaZCABT+6y5Rvi2e19TNZy8WlABZv6Xo3BagitNFh9cQHoGlmk0kPx7mRucV0dUPFB0fJNKguhYFiYQZVP6FyeQ1U17eWoL2qY0VOVhg0eXBb8iHOyCy/oLTGnHtg/1WOJEXrq5qhbafmpKIA3mM+cHY/mlm2tf5eP+bVVENipyFwZlAaGNZTGeQzhl4zcn0jYN1rtC9mPXwz+1Q3q+nfu01DJB95MVJrxQ/eEF0OKMhcd3nBBTWRw==

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2021-02-10 11:00:05 | Firmante

wYoS6WzxTDrGoCGSoNr7NTHI8FIUT2ivFKAACrP3bjieMyS//bjeK9qitBB1XEUEQYKsD0Y01ksLobPwJln2q/ByeVOC5a/8Aw6aa00LENGfdg/YJHWvn64Eh8JqqK07enN3WDfmBzJBSnx5bQe/jFeq9xwNyLDsgf69SszvJC42puNO99lRtX12tOzp3mkJBLcXXlCFDwplcfeE9R8yFU//biu4qwOXJKvNMoz/22eZm3RFCK780Gfp/0kKohx6MsRcVvyKEJGysG0dXfVohITarpiTqF2g6s0xPwOPDhvp32IZB2TPHxv8VXj3ec2BMWxK8gOTJHCrCIGevv/w==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2021-02-12 09:55:31 | Firmante

c/mcplY4XQ+1Lul2u3vLLXkWNkPQ/AVHs7NMbtsVoWBsCcmCwTgN4TPQKccXj0WjflMjlezgP/99uCF0e1uYUDC0GqTkP/8cGsB9PwRUKd4jA7H/44oXZ/txVpGKaHO8MW4tJUhxp3E1Pkxv0AXH5GABWaxFrZVnHT1emlkgfYTEl5r9KrxeAM6gHKzQEPB6dWVxxbElJsVPq7YanbGVKzJHDVQyUxzrYpsjE3JXCod/ak0jK3h5oeB1EYMjroZlKfVuVgXEPxdbjo8NaoAoc0vdt+n+SOcbQFIIGidqHW6kOgA/zbxDWU90g0xYwkkHDKg4ml1hewVYQ6QkWzJ4g==

NAYELI SANCHEZ GUEVARA | Fecha:2021-02-14 18:19:28 | Firmante

OpDvHDM8qErwX9zyUxKWndBTL7bQs21I6Jbwl+SKnF+lm6reqd8/lh+25BABME7xf+nVUclYCCw7jhjYLOlf0hfFYR3v3MH1AKRzbe9fx3nvphQ0D/FQ28SAjC8B+TLIs/soHdtOHq3zbdNtE4ofK4xVNx/hOvdhyQDEennKG8kUPhPQ84e/GVN/dZ7lc3PLB7a714TE+hAlwmtjMXcKCy1sMCKwC4l2QIIAqqRJoRFymdu+cUkvQAcavfR7ICi8+n2MjJHF5C3agMIETjSxlqD/7z38wtTNy2CNK4XmGRNmfbVmy3oqIHd9V+PANDD/6oaKE/LDKAF+OvrjV9Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



SWPdD2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mywwT4CEyjes8a1Hxh65qR5HR9JR9Jmk>

