



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

“Estudio de gen *fadD2* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 involucrado en la degradación de compuestos 3-metil ramificados”

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO-FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

p. Q.F.B. GABRIELA MARIA OROZCO LÓPEZ

ASESOR:

D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA

MORELIA, MICHUACÁN, JUNIO 2012



CONTENIDO	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESÚMEN	viii

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a toda mi familia y especialmente a mi papás, que gracias al apoyo incondicional que me han dado a lo largo de toda mi vida me ha ayudado a ser quien hoy soy, ustedes son mi fuerza y mi motivación para seguir adelante, gracias también a mis hermanos (Eli y Miguel), porque siempre cuento con ustedes y porque sé el sacrificio que han hecho por mi, y también gracias a mi chaparrito hermoso por alegrarme la vida, mi sobrinito Gabriel que lo amo.

Quiero agradecer también al DC Jesús Campos García por haberme permitido formar parte del grupo de trabajo del laboratorio de biotecnología microbiana, por la paciencia y el esfuerzo que este trabajo significó para él, gracias también a la MC Alma Laura Díaz Pérez por la paciencia y por ser mi guía eterna a lo largo de la realización de mi tesis, agradezco también a mis compañeros del laboratorio, Viri, Wicho, Mau, Perla, Lore, Laura, Marco, Víctor y César porque siempre me animaron y me apoyaron a lo largo de mi estancia en el laboratorio, y a ti Fax Arellano mil gracias por todo lo vivido en estos años juntas en el lab, porque más que compañeras de trabajo y amigas fuimos cómplices y pues como una vez dijimos “hasta que la tesis nos separe”, espero que no se haga realidad, te quiero mucho y gracias peke.

Omar te agradezco por todo lo que me brindaste durante todo este tiempo pero sobre todo el amor, el apoyo y la paciencia, gracias por estar a mi lado. Les agradezco a todos mis amigos por todo el apoyo incondicional que siempre me brindaron, Ana (Tix Tix), Maye (Xhula), Esmeralda (gualucita) y Erandi (vieja) porque más que mis amigas son mi hermanas y las adoro, a Mauricio Chávez, Yajaira, Andrés, Hermes, Ixchel, Blanca, Maricarmen Ponce, Florecita, Gustavo, Héctor, Maricarmen Estrada, Mayrita, Carlangas, Erika, Yunuen, Anatacha, Omar Ayala, Marlen, y a todos por su grandiosa e incondicional amistad.

Quiero hacer un agradecimiento muy especial a un amigo que por desgracia hoy ya no está, a ti Gerardo Arteaga, gracias por haberme brindado esa amistad tan sincera y generosa, gracias por los consejos, por la ayuda y sobre todo por lo momentos tan increíbles y tan divertidos que pase a tu lado, se que no estás para escuchar esto, pero sé que desde donde estas sabes que estas palabras son especialmente para ti. Te quiero mucho y te extraño.

DEDICATORIA

A mis padres que son mi luz,
mi fuerza y mi motivación
para salir adelante
“LOS AMO”

INDICE GENERAL	PÁGINA
1- INTRUDUCCIÓN	1
1.1- Biodegradación	1
1.1.1- Biodegradación de hidrocarburos lineales	3
1.1.2- Biodegradación de hidrocarburos ramificados	4
1.1.3- Terpenos / isoprenoides	6
1.2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.1- activación de ácidos grasos	14
2- ANTECEDENTES	15
3- JUSTIFICACIÓN	19
4- OBJETIVOS	20
Objetivo general	
Objetivos específicos	
5- MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1- Cepas y plásmidos	21
5.2- Medios de cultivo	22
5.2.1- Caldo Luria-Bertani (CLB)	22
5.2.2- Agar Luria-Bertani (ALB)	22
5.2.3- Medio 2XYT	22
5.2.4- Agar 2XYT	22
5.2.5- Medio mínimo M9	23
5.3- Métodos	24
5.3.1- Procedimientos con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
5.3.1.1- Selección de clonas de mutantes en el ORF PA3300 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 involucradas en la degradación de citronelol, 1-octanol y leucina.	24
5.3.1.2- Curvas de crecimiento de las clonas de las mutantes en el ORF PA3300 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	24
5.3.1.3- Aislamiento de ADN total (cromosómico) de <i>P. aeruginosa</i>	25
5.3.2- Procedimientos con células de <i>Escherichia coli</i>	26
5.3.2.1- Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina	26
5.3.2.2- Electroforesis en geles de agarosa	27

5.3.2.3-	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	28
5.3.2.4-	Transformación	29
5.3.2.4.1-	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	29
5.3.2.4.2-	Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	29
5.3.3-	Procesos enzimáticos	30
5.3.3.1-	Restricción de ADN con enzimas de restricción (endonucleasas)	30
5.3.3.2-	Ligación de ADN	30
5.3.3.3-	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
5.3.4-	Procedimientos con proteínas	31
5.3.4.1-	Obtención de extractos celulares	31
5.3.4.2-	Western-blot	32
5.3.4.3-	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
5.3.4.3.1-	Gel separador al 14%	33
5.3.4.3.2-	Gel concentrador al 4%	33
5.3.4.3.3-	Buffer de carga	34
5.3.4.3.4-	Tinción del gel SDS-PAGE	34
5.3.4.3.5-	Buffer de corrida Tris-Glicina	35
6-	RESULTADOS	36
6.1-	Selección de clonas mutantes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en el gen <i>fadD2</i>	36
6.2-	Comprobación de la inserción del transposón en las mutantes en <i>fadD2</i> PA33 y PA21	38
6.3-	Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes en <i>fadD2</i>	41
6.4-	Obtención del gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 de pGEM T Easy	46
6.5-	PCR del gen <i>fadD2</i> en pGEM- <i>fadD2</i>	47
6.6-	Subclonación del gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en pTrcHis2A	49
6.7-	Inducción y detección de la proteína recombinante FadD2	51
7-	DISCUSIÓN	54
8-	CONCLUSIONES	57
9-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INDICE DE TABLAS

PÁGINA.

Tabla 1. Persistencia de herbicidas e insecticidas en el suelo. Tiempo en que tardan en desaparecer algunos plaguicidas del suelo, esto debido a su composición y estructura.

2

Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo.

21

Tabla 3. Crecimiento de las cepas mutantes en agar M9 adicionado con citronelol, 1-octanol o leucina a las 72 hrs.

37

INDICE DE FIGURAS	PÁGINA.
Figura 1. Secuencia de reacciones propuesta para el metabolismo del pristano en <i>Brevibacterium erythrogenes</i> .	5
Figura 2. Estructuras del isopreno.	6
Figura 3. Ejemplos de estructuras de terpenos hallados comúnmente en la naturaleza.	7
Figura 4. Ruta degradativa de isoprenoides acíclicos en <i>Pseudomonas citronellolis</i> .	9
Figura 5. El grupo de genes <i>atu</i> y <i>liu</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	10
Figura 6. Pasos generales que comprenden la vía catabólica de terpenos/isoprenoides acíclicos en especies de <i>Pseudomonas</i> .	11
Figura 7. Vía superior de oxidación-activación de terpenos acíclicos.	12
Figura 8. Modelo para el metabolismo de PHA's a nivel enzimático.	15
Figura 9. Esquema del transporte de los ácidos grasos en <i>P. aeruginosa</i> .	16
Figura 10. Actividad enzimática de FadD1 y FadD2 de <i>P. aeruginosa</i> .	17
Figura 11. Reacción propuesta donde participa la enzima FadD2 de <i>P. aeruginosa</i> para la formación del correspondiente terpenil-CoA en la vía de degradación de terpenos, usando como sustrato el ácido citronélico.	18
Figura 12. Transposones usados para mutagénesis por inserción en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	36
Figura 13. PCR de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y las mutantes por transposición en el gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> .	39
Figura 14. Cinética de crecimiento de las clonas mutantes en <i>fadD2</i> y la cepa silvestre PAO1SR en citronelol.	41
Figura 15. Cinética de crecimiento de las clonas mutantes en <i>fadD2</i> y la cepa silvestre PAO1SR en leucina.	42
Figura 16. Cinética de crecimiento de las clonas mutantes en <i>fadD2</i> y la cepa silvestre PAO1SR en ácido isovalérico.	43
Figura 17. Cinética de crecimiento de las clonas mutantes en <i>fadD2</i> y la cepa silvestre PAO1SR en ácidos grasos de palma disueltos en Tritón X-100.	44
Figura 18. Cinética de crecimiento de las clonas mutantes en <i>fadD2</i> y la cepa silvestre PAO1SR en ácidos grasos disueltos con calor.	45
Figura 19. Plásmido pGEM- <i>fadD2</i> .	46

Figura 20. Aislamientos de pGEM- <i>fadD2</i> .	46
Figura 21. PCR del gen <i>fadD2</i> del plásmido pGEM- <i>fadD2</i> .	47
Figura 22. Liberación del gen <i>fadD2</i> del plásmido pGEM- <i>fadD2</i> para su purificación. A) Diagrama del plásmido pGEM- <i>fadD2</i> .	48
Figura 23. Plásmido pTrcHis2A- <i>fadD2</i> .	49
Figura 24. Serie de restricciones con enzimas que permitieron verificar la construcción del plásmido pTrcHis2A- <i>fadD2</i> .	50
Figura 25. Imagen del gel de acrilamida SDS-PAGE al 14% de la verificación de la sobreexpresión de la proteína FadD2.	52
Figura 26. Imagen de la placa radiográfica del western-blot expuesta por 5 min con la membrana de nitrocelulosa.	52

RESÚMEN

La biodegradación ha sido tema de estudio en los últimos años, se han encontrado microorganismos capaces de llevar a cabo la degradación de compuestos con estructuras muy variadas, como los hidrocarburos.

La biodegradabilidad de los hidrocarburos se basa en la estructura de su cadena hidrocarbonada, siendo ramificaciones en carbonos específicos las que dificultan la biodegradación, como es el caso de la ramificación en el carbono β que impide la oxidación- β . Los terpenos tienen esta característica y es por eso que son compuestos recalcitrantes o persistentes en la naturaleza, sin embargo, hay microorganismos capaces de degradarlos como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*.

En nuestro grupo de trabajo se identificaron en *P. aeruginosa* genes involucrados en la degradación de este tipo de compuestos describiendo a detalle la vía de degradación de terpenos/isoprenoides. Al inicio de esta vía participa una acil-CoA sintetasa que lleva a cabo la activación del terpeno hasta la formación del terpenil-CoA. *P. aeruginosa* posee dos genes que codifican esta enzima: *fadD1* y *fadD2* sugiriendo que alguna de las proteínas codificadas por estos genes (FadD1 ó FadD2) sea la que lleve a cabo la activación del terpeno.

En el presente trabajo se estudió el gen *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 y con el uso de cepas mutantes en este gen se evaluó el crecimiento en compuestos como el citronelol, la leucina, el ácido isovalérico y ácidos grasos de palma como única fuente de carbono, mostrando las mutantes solo un menor crecimiento en el compuesto citronelol. Debido a esto se dio un indicio a que FadD2 tendría participación en la activación de compuestos 3-metil ramificados ya que su ausencia impide que *P. aeruginosa* los degrade.

El gen *fadD2* fue clonado en un plásmido de expresión y dicha construcción se transformó en células de *Escherichia coli* JM101 donde la proteína recombinante fue detectada mediante Western-blot, observándose la presencia de dos bandas de un peso molecular de 63 y 68 KDa. Los

resultados obtenidos sugieren que el gen clonado corresponde a la proteína FadD2 que al sintetizarse sufre una probable modificación postraduccional.

1- INTRODUCCIÓN

1.1-Biodegradación

Cuando se habla de biodegradación se hace referencia a la degradación de compuestos o sustancias químicas hacia sus estructuras o componentes básicos mediante los procesos de digestión, asimilación y metabolización llevada a cabo por microorganismos como bacterias, hongos, protozoos, entre otros. Puede llevarse a cabo en ambientes aerobios y anaerobios; pero hay factores que pueden afectarla como son la temperatura y humedad, el pH del medio, la disponibilidad de oxígeno, la cantidad de materia a degradar, así como también los microorganismos presentes (Campos-García, 2010; Madigan *et al.*, 2004; Solanas, 2009).

En la actualidad se tiene conocimiento de una gran cantidad de microorganismos que tienen la capacidad de biodegradar xenobióticos e hidrocarburos; compuestos que debido a su aumento tanto en producción y utilización han sido causantes de un incremento en la contaminación ambiental (Madigan *et al.*, 2004).

En la biodegradación es de gran importancia la estructura de los compuestos que serán degradados ya que dependiendo de ésta pueden servir como fuente de carbono y donadores de electrones para ciertos microorganismos; aunque para la desaparición total o parcial de algunos compuestos como por ejemplo los plaguicidas no necesariamente implica que hayan sido degradados por microorganismos, ya que también su eliminación puede deberse a la volatilización, lixiviado o a la rotura química espontánea de éstos. Es por eso que el tiempo de desaparición varía para ciertos plaguicidas como se muestra en la Tabla 1 (Madigan *et al.*, 2004).

Tabla 1. Persistencia de herbicidas e insecticidas en el suelo. Tiempo en que tardan en desaparecer algunos plaguicidas del suelo, esto debido a su composición y estructura (Tomada de Madigan *et al.*, 2004).

Persistencia de herbicidas e insecticidas en el suelo

Sustancia	Tiempo requerido para la desaparición del 75-100%
Insecticidas clorados	
DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etano]	4 años
Aldrina	3 años
Clordano	5 años
Heptano	2 años
Lindano (hexaclorociclohexano)	3 años
Insecticidas organofosforados	
Diazinón	12 semanas
Malatión	1 semana
Paratión	1 semana
Herbicidas	
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	4 semanas
2,4,5-T (ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético)	20 semanas
Dalapina	8 semanas
Atrazina	40 semanas
Simazina	48 semanas
Propazina	1,5 años

1.1.1- Biodegradación de hidrocarburos lineales

Los hidrocarburos son compuestos químicos formados únicamente por carbono e hidrógeno y resultan ser insolubles en agua. Los de bajo peso molecular son gases, mientras que los de peso molecular más alto son líquidos o sólidos a temperatura ambiente. Estos se clasifican en aromáticos y alifáticos y así mismo los alifáticos se clasifican en saturados e insaturados. El benceno (C_6H_6) es el ejemplo más común de un hidrocarburo aromático, mientras que los hidrocarburos alifáticos pueden ser lineales (una sola cadena continua de carbono), ramificados (una cadena de carbono que tiene bifurcaciones a lo largo de ella de grupos metilo) y cíclicos (compuestos por uno o varios anillos de carbono unidos entre ellos) (Sikkema *et al.* 1995; Madigan *et al.*, 2004 y Campos-García, 2010).

El petróleo es una fuente de hidrocarburos aromáticos y alifáticos formada por la descomposición de plantas y animales. Está compuesto de los contaminantes más comunes de categoría orgánica que son una mezcla de n-alcenos, mono, di y poli compuestos aromáticos, aromáticos heterocíclicos, resinas, asfaltenos y otros componentes menores (Campos-García, 2010; Solanas, 2009).

Los alcanos constituyen aproximadamente 20-50% de los derivados del petróleo y su degradación se lleva a cabo mediante la oxidación del grupo metil terminal para producir el ácido n-alcanóico correspondiente, el cual se degrada mediante la vía clásica de oxidación de los ácidos grasos, oxidación- β , hasta generar acetil-CoA. (Rojo, 2009; Campos-García, 2010).

Los hidrocarburos ramificados son generalmente menos susceptibles a la biodegradación, pero también la ubicación de las ramificaciones y el que se encuentren cerca del extremo terminal es una causa de bajo nivel de biodegradabilidad ya que interfieren en la secuencia normal del ciclo de oxidación de los ácidos grasos (Campos-García, 2010).

1.1.2- Biodegradación de hidrocarburos ramificados

Los hidrocarburos que tienen una ramificación en el carbono C2 (carbono α) pueden llegar a biodegradarse sugiriendo la participación de más de una vía oxidativa como pueden ser la oxidación α , la descarboximetilación β o la oxidación ω . La biodegradación de pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano) en *Corynebacterium sp.* y en *Brevibacterium erythrogenes* es un claro ejemplo de este tipo de degradación ya que requiere del acoplamiento de la oxidación- α , la oxidación- ω , además de la oxidación- β (Fig 1). La degradación comienza con la oxidación α para la formación del ácido pristánico, el cual puede sufrir por un lado un ciclo de oxidación ω para producir un ácido dicarboxílico (ácido pristanodioico), el cual es metabolizado por etapas posteriores de oxidación β liberando alternamente acetil-CoA y propionil-CoA como productos, y por otro lado el ácido pristánico puede sufrir oxidación β para producir ácido trimetiltridecanoico eliminando la ramificación sobre el carbono α mediante la formación de propionil-CoA que puede ser metabolizado vía transformación previa a metilmalonil-CoA y posteriormente a succinil-CoA, metabolito que puede incorporarse al ciclo del ácido cítrico. Aparentemente la oxidación de alcanos ramificados es inducida por ácidos dicarboxílicos, vía que es reprimida durante la oxidación de n-alcanos, mostrando por lo tanto la existencia de vías diferentes en la oxidación de n-alcanos y alcanos ramificados (Pirnik *et al.*, 1974; Fall *et al.*, 1979; Pirnik y McKenna., 1977).

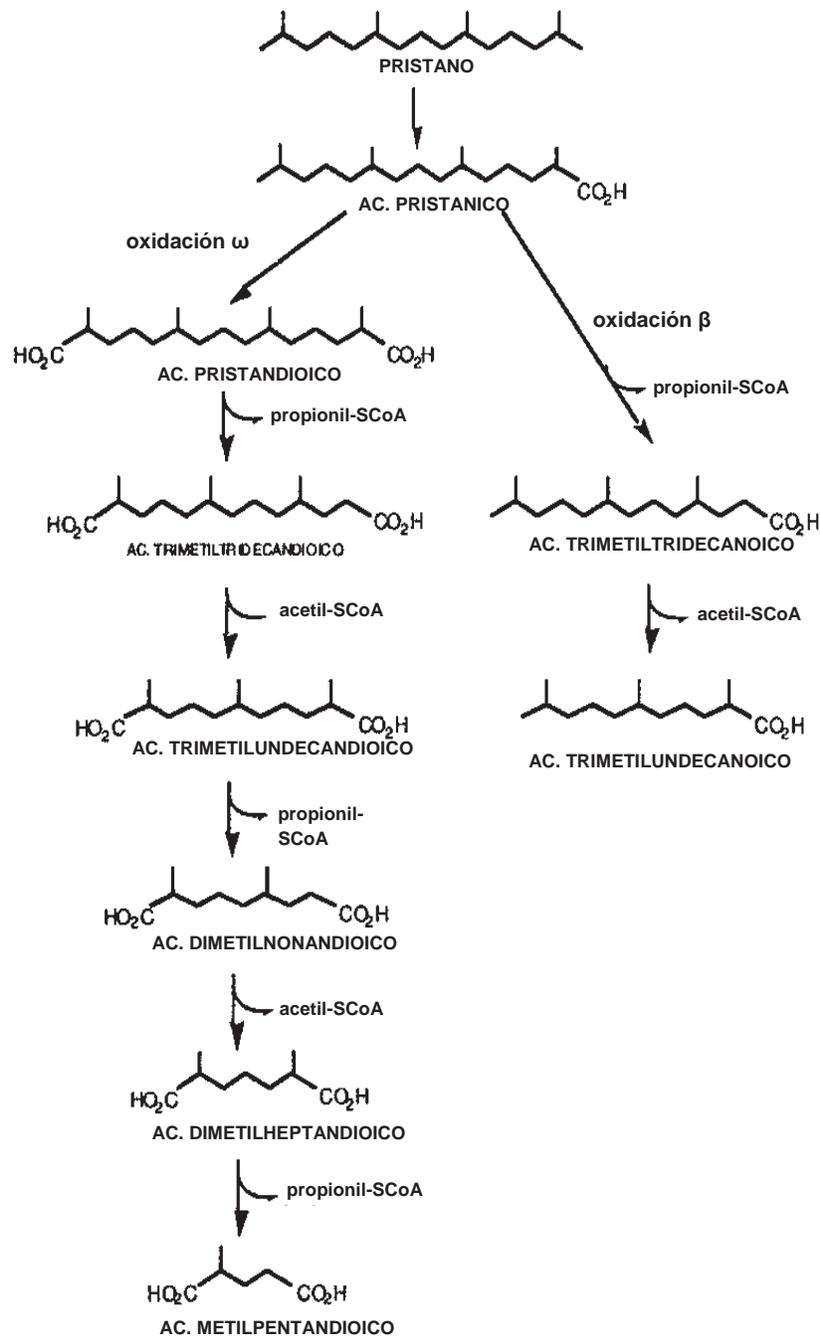


Figura 1.-Secuencia de reacciones propuesta para el metabolismo del pristano en *Brevibacterium erythrogenes*, basada en la producción de metabolitos. El ácido pristánico es producido mediante oxidación α a partir del pristano. Posteriormente este ácido por oxidación β puede liberar la ramificación sobre el carbono α mediante la formación propionil-CoA obteniendo ácido trimetiltridecanoico, o bien por oxidación ω el ácido pristánico puede ser transformado a un ácido dicarboxílico, el cual es metabolizado por oxidación β liberando alternamente acetil-CoA y propionil-CoA. Tomada de Pirnik *et al.*, 1974.

Los hidrocarburos que tienen una ramificación en el C3 (carbono β) tienen la característica de ser compuestos recalcitrantes, persistiendo en el ambiente por periodos prolongados de tiempo, un ejemplo de ellos son los terpenos. (Fall *et al.*, 1979; Cantwell *et al.*, 1978; Voet *et al.*, 2007).

1.1.3- Terpenos / isoprenoides

Los terpenos o isoprenoides son compuestos orgánicos altamente distribuidos en la naturaleza derivados de la polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno); un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (Fig. 2) (Cox *et al.*, 2009).

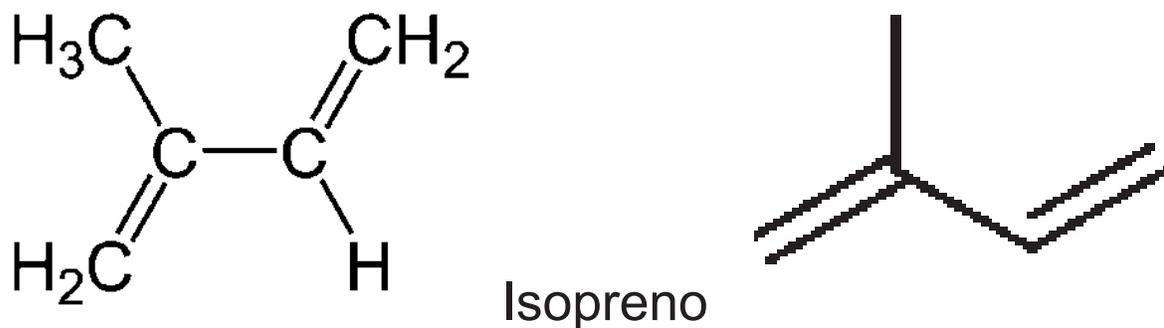
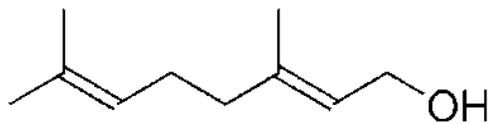


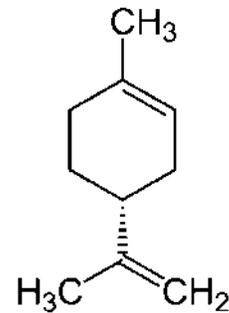
Figura. 2. Estructuras del isopreno

Las cadenas que resultan de la condensación de estas unidades, son estructuras hidrofóbicas, hecho que las incluye dentro del grupo de los lípidos. Se han identificado un gran número de terpenos, de los cuales muchos poseen olores y sabores característicos, siendo también componentes principales de los aceites esenciales de algunas plantas (Fig. 3). También pueden ser obtenidos del petróleo y sus derivados (Cox *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2004).



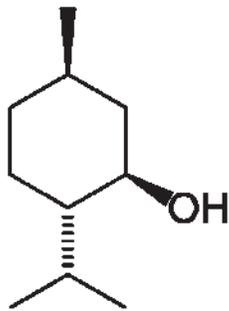
3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol

-Geraniol-



1-metil-4-isopropenil-1-ciclohexano

-Limoneno-



5-metil-2-isopropil ciclohexa-1-ol

-Mentol-

3,7-dimetil-6-octen-1-ol

-citronelol-

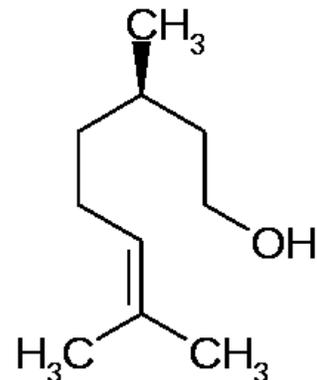


Figura 3. Ejemplos de estructuras de terpenos hallados comúnmente en la naturaleza.

Los terpenos son comúnmente tóxicos para los microorganismos porque se intercalan y tienen acceso fácil en la membrana citoplasmática, provocando modificaciones en la membrana, además de que son recalcitrantes debido al grupo metilo ubicado en el carbono β que impide la acción de las enzimas de la vía de oxidación de los ácidos grasos (Campos-García, 2010).

El citronelol ha sido desde mucho tiempo atrás la molécula modelo para el estudio de microorganismos capaces de degradar este tipo de compuestos.

El isoprenoide conocido como citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) (Fig. 3) es un alcohol monoterpénico que se encuentra entre los principales constituyentes

de los aceites esenciales de varias plantas, como los cítricos, zacate de citronela, rosas, hierba de limón, albahaca, eucalipto, limón, entre otros, siendo responsable de las propiedades aromáticas y biológicas, incluyendo la actividad antibacterial de estos aceites. Tiene una gran aplicación en la industria alimentaria, en la perfumería y en la cosmética, así como en la medicina tradicional, usado también como repelente de mosquitos. (Aguiar, *et a* 2001; Tozoni, *et al.*, 2010).

Como se ha mencionado, los terpenos 3-metil ramificados son compuestos persistentes en la naturaleza, sin embargo, existen algunas bacterias que son capaces de degradarlos.

Seubert, en 1959 descubrió que *Pseudomonas citronellolis* es un organismo capaz de degradar isoprenoides, en especial el citronelol, posteriormente Cantwell y colaboradores en 1978 demostraron que no solo *P. citronellolis* sino que varias cepas de *Pseudomonas* son capaces de degradar isoprenoides 3-metil ramificados, entre ellas *P. mendocina* y *P. aeruginosa*. Observaron su capacidad de mineralizar citronelol utilizándolo como única fuente de carbono y energía, también demostraron que había especies de *Pseudomonas* que no eran capaces de utilizar estos isoprenoides como es el caso de *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* entre otras (Seubert, 1959; Cantwell, *et al.*, 1978).

Cantwell fue el primero en proponer la vía de degradación de isoprenoides acíclicos en *P. citronellolis* (Cantwell *et al.*, 1978), en la que se involucra la β -descarboximetilación mediante la cual se remueven las ramificaciones sobre el carbono 3 de la cadena principal y así permitiendo que se lleve a cabo la oxidación- β (Fig. 4).

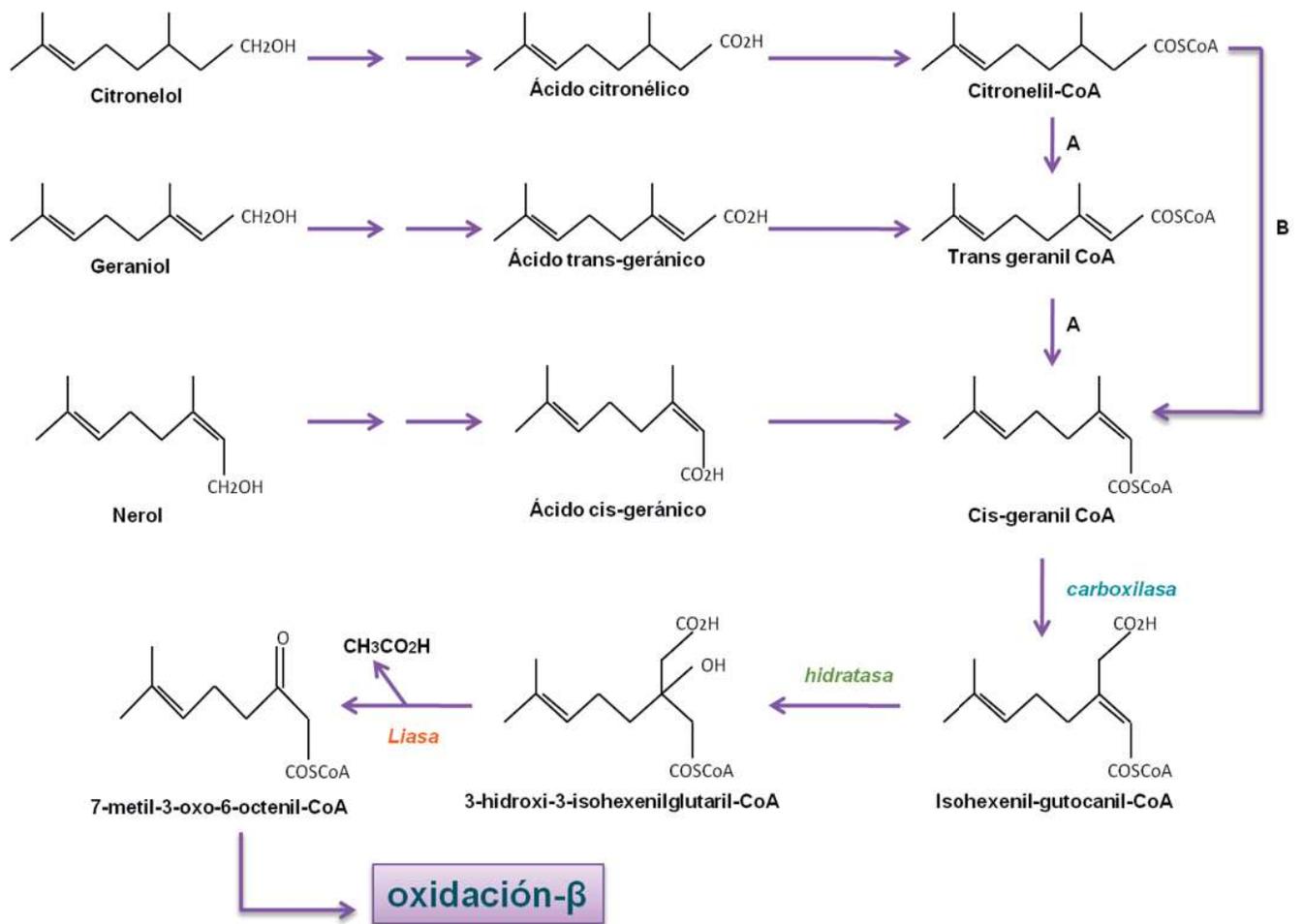


Figura 4.- Ruta degradativa de isoprenoides acíclicos en *Pseudomonas citronellolis*. Las enzimas nombradas han sido parcialmente caracterizadas; los pasos enzimáticos que han sido obviados representan reacciones enzimáticas análogas a las involucradas en la oxidación de alcoholes y ácidos carboxílicos. Los pasos A o B representan incertidumbre en la vía. Tomada de Cantwell *et al.*, 1978.

En *P. aeruginosa* se identificó un grupo de genes implicados en el catabolismo de terpenos acíclicos (Fig. 5) que se han denominado como el operón *liuRABCDE* por la utilización de leucina-isovalerato y otro grupo llamado *atuRABCDEFGH* por la utilización de terpenos (Díaz-Pérez *et al.*, 2004; Hoschle *et al.*, 2005, Aguilar JA *et al.*, 2006).

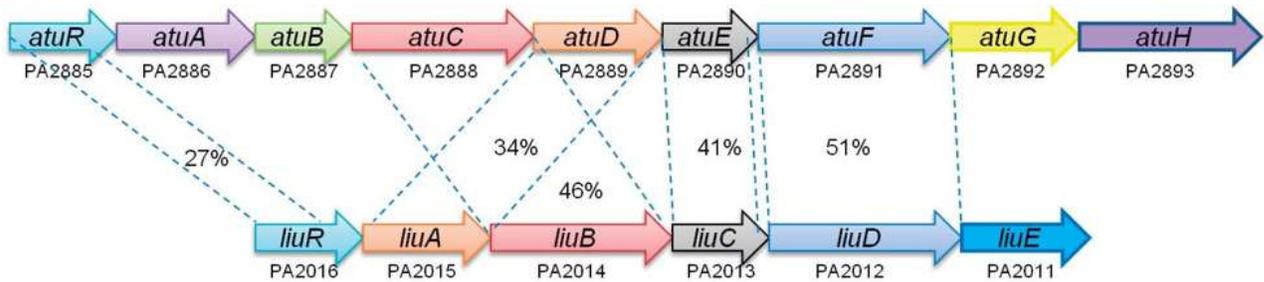


Figura 5. El grupo de genes *atu* y *liu* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Estos genes se proponen para codificar las enzimas implicadas en las vías catabólicas de terpenos y leucina-isovalerato respectivamente. Se muestran el nombre de los genes y su respectivo OFR del genoma de PAO1. La identidad de los aminoácidos de las proteínas homólogas se indica en porcentaje por debajo de los genes.

Campos-García en el 2010 logró describir cuatro pasos principales en la degradación de terpenos acíclicos (i) vía superior de oxidación-activación, (ii) vía central de los terpenos acíclicos (ATU), (iii) acoplamiento a la oxidación- β y (iv) vía convergente con leucina/isovalerato (Fig. 6).

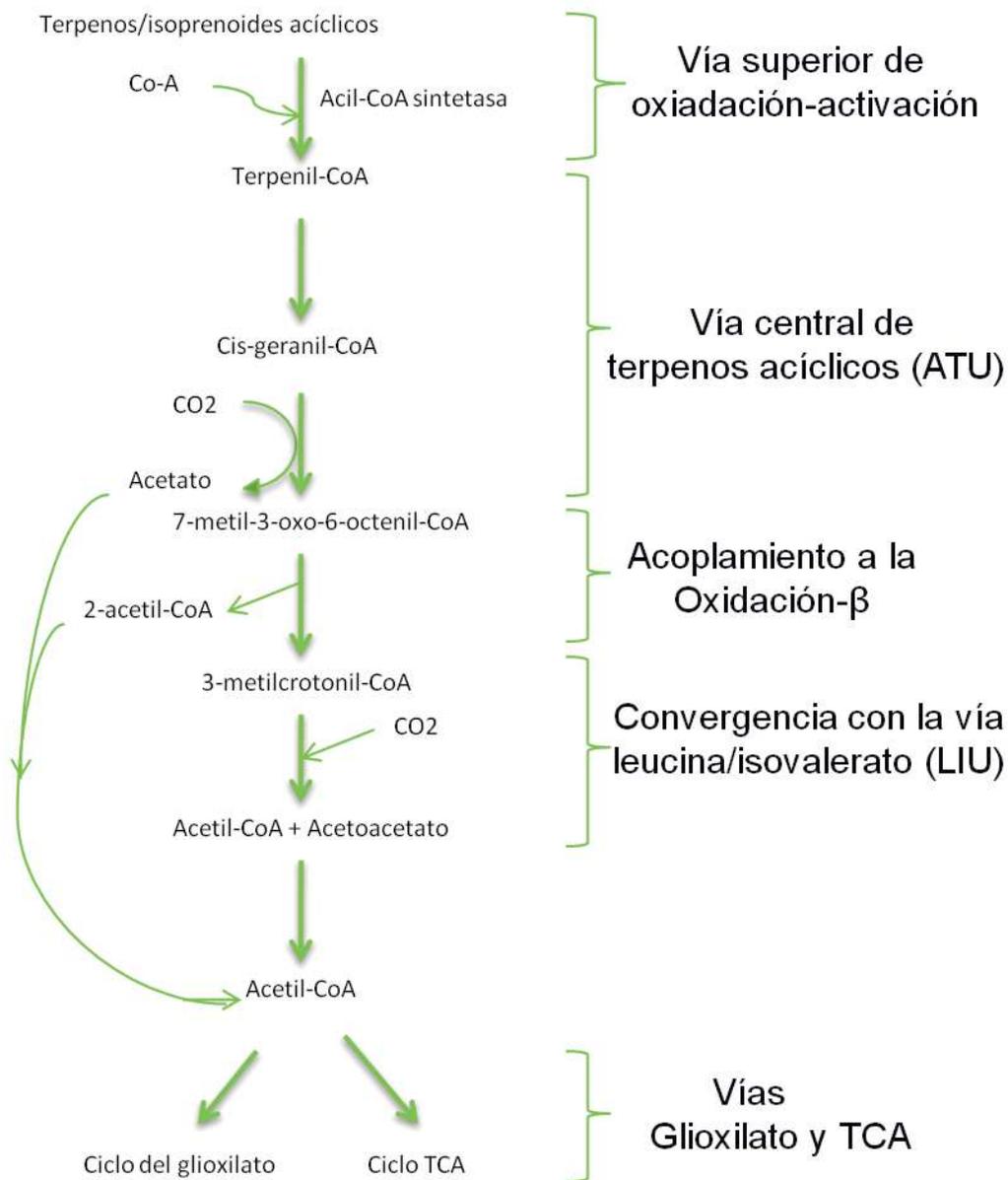


Figura 6. Pasos generales que comprenden la vía catabólica de terpenos/isoprenoides acíclicos en especies de *Pseudomonas* (Tomada de Campos-García, 2010).

La vía superior consiste en la oxidación del terpenol a su correspondiente terpenal y ácido terpenóico, se ha sugerido que la oxidación de estos compuestos es llevada a cabo por dos deshidrogenasas que probablemente son codificadas por los genes *atuB* o *atuG*; la reacción que se realiza sucesivamente es la

activación del ácido graso (Fig 7), en la que participa una acil-CoA sintetasa que no ha sido identificada (Campos-García, 2010).

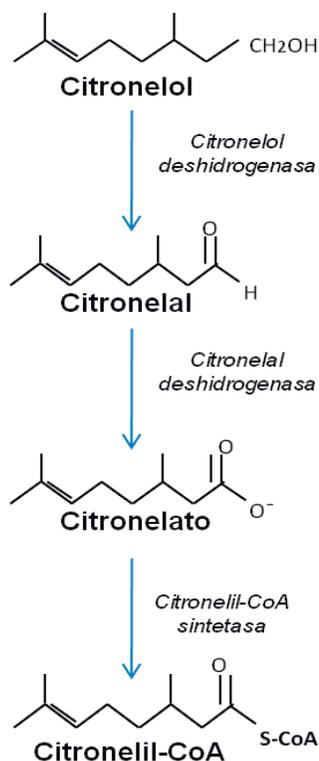


Figura 7. Vía superior de oxidación-activación de terpenos acíclicos (Tomada de Campos-García, 2010).

Enseguida, el terpenil-CoA formado entra en la vía central de terpenos acíclicos, aquí las enzimas que están involucradas son codificadas en el grupo de genes *atuRABCDEFGH*. En esta etapa se forma el 7-metil-3-oxo-6-octenil-CoA, este metabolito entra directamente a la oxidación- β mediante la cual se forman 2 moléculas de acetil-CoA y el 3-metil-crotonil-CoA; éste es el compuesto con el cual converge la vía de leucina/isovalerato (Fig. 6). Las enzimas que participan en la vía LIU son codificadas en el grupo de genes *liuRABCDE*. El producto final es la formación de acetil-CoA que es canalizada ya sea en el ciclo del glioxilato o en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Campos-García, 2010).

1.2- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa, en forma de bacilo recto o ligeramente curvado, aerobio y con un flagelo polar, oxidasa y catalasa positivos, capaz de crecer hasta 43°C y patógeno oportunista, especialmente en medios hospitalarios, capaz de contaminar heridas quirúrgicas, abscesos y quemaduras. Es ubicua, común en el medio ambiente y es fácil encontrarla en heces, suelo, aguas residuales, pantanos, hábitats marinos y costeros. Es considerada como patógena y capaz de resistir a varios antibióticos y desinfectantes (Madigan MT *et al.*, 2004; Stover, *et al.*, 2000).

P. aeruginosa tiene la capacidad de crecer en distintos medios y usar como fuente de carbono distintos compuestos que van desde azúcares, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, alcoholes, polialcoholes, alcanos lineales y ramificados, compuestos aromáticos, aminoácidos y aminas, entre otros. Debido a la gran capacidad metabólica de *P. aeruginosa* es considerado un organismo ecológicamente importante en la transformación de muchos compuestos presentes en el suelo y en el agua (Campos-García, 2010).

El genoma de *P. aeruginosa* tiene un tamaño de 6.3 millones de pares de bases y un total de 5570 marcos de lectura abiertos. Se han identificado dentro del genoma de *P. aeruginosa* varios genes que se ha comprobado su participación en la degradación de terpenos acíclicos. Sin embargo aún es desconocido el gen que codifica para la acil-CoA sintetasa que participa en la vía de activación-oxidación llevando a cabo la activación del ácido terpenoico, siendo éste un paso fundamental para la degradación de éste tipo de compuestos.

1.2.1- Activación de ácidos grasos

Para poder llevar a cabo la degradación de un ácido graso es necesario que se “active” este ácido, esa función la lleva a cabo una acil-CoA sintetasa, de acuerdo con la siguiente reacción:



Es necesario que se lleve a cabo la “activación” para que este pueda ser degradado en la vía clásica de oxidación de los ácidos grasos, la oxidación- β . La acil-CoA sintetasa es una enzima que se encuentra en la membrana de las células eucariotas como es el caso de los neutrófilos en los que participa convirtiendo los ácidos grasos libres en ésteres acil-CoA que sirven como moduladores de las funciones de éstos (Korchak, *et al.*, 1994).

Una acil-CoA sintetasa fue caracterizada en *E. coli*, donde fue denominada FadD, en esta bacteria es una proteína de membrana que participa en la degradación de ácidos grasos y es afín a ácidos grasos de cadena mediana a larga (Black, *et al.*, 1992).

Dentro del genoma de *P. aeruginosa* también han identificado dos acil-CoA sintetasa (FadD1 y FadD2) ubicadas en citoplasma, correspondientes a los ORF PA3299 para FadD1 y PA3300 para FadD2 (Winsor, *et al.*, 2010; Kang, *et al.*, 2010)

2- ANTECEDENTES

En el año 2008 Ruth y colaboradores identificaron en *P. putida* GPo1 dos acil-CoA sintetetas, una de ellas (ACS1) fue localizada en la superficie de los gránulos de polihidroxicanoatos (PHA) demostrando su preferencia en sustratos por cadenas hidrocarbonadas medianas a largas mientras que la segunda acil-CoA sintetasa (ACS2) fue localizada en la membrana citoplásmica. Propusieron un modelo mediante el cual se lograba explicar la participación de la ACS1 en el metabolismo de los PHA's en *P. putida* GPo1 (Fig. 8). El modelo señala que cuando hay deficiencia de carbono se comienzan a degradar los PHA's por la PHA depolimerasa y libera monómeros de ácido 3-hidroxicarboxílico, los monómeros liberados son activados a hidroxiacil-CoA por la ACS1 a través de una reacción dependiente de ATP. El metabolito es un sustrato para la PHA polimerasa, así como para el ciclo de oxidación de los ácidos grasos. (Ruth, *et al.*, 2008).

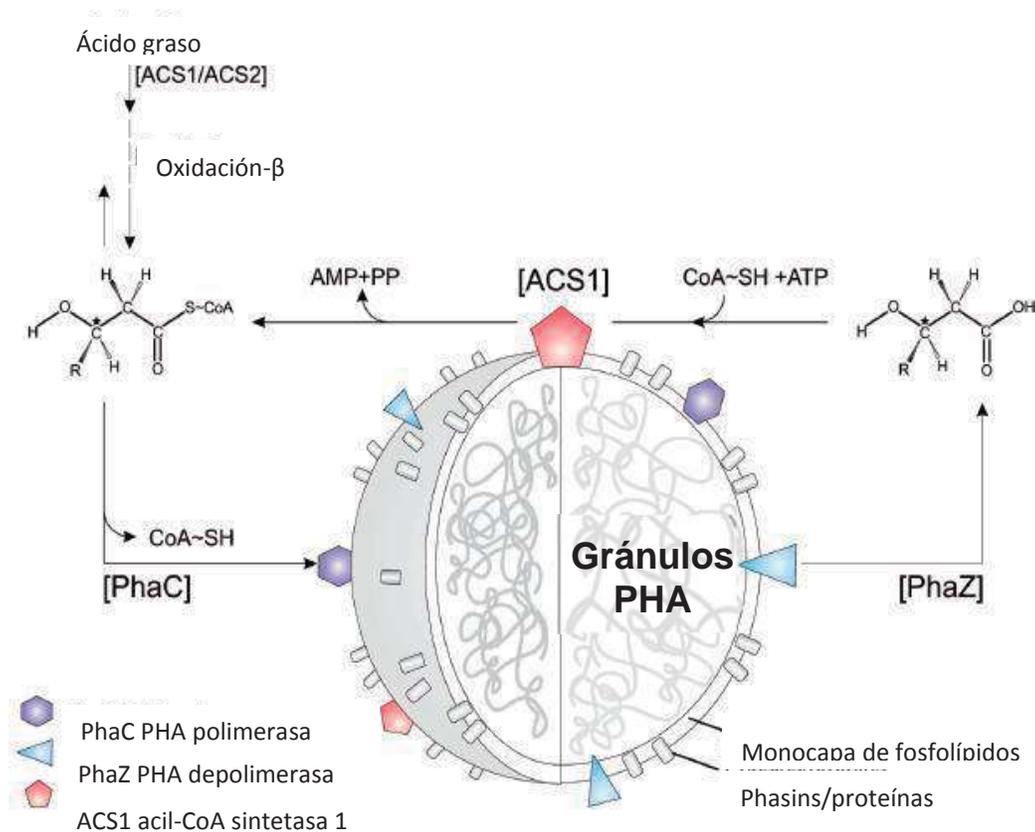


Figura 8. Modelo para el metabolismo de PHA's a nivel enzimático (Tomada de Ruth, *et al.*, 2008).

Kang y colaboradores en el 2010 caracterizaron en *P. aeruginosa* PAO1 dos acil-CoA sintetetasas, FadD1 y FadD2 involucradas en la degradación de ácidos grasos. Mostraron un esquema modelo del transporte de los ácidos grasos en la célula (Fig. 9), en él participa una proteína aún desconocida denominada FadL que ayuda a los ácidos grasos a ser transportados a través de la membrana; FadD1 y FadD2 aparecen como proteínas ancladas a una proteína de membrana activando los ácidos grasos para su posterior oxidación.

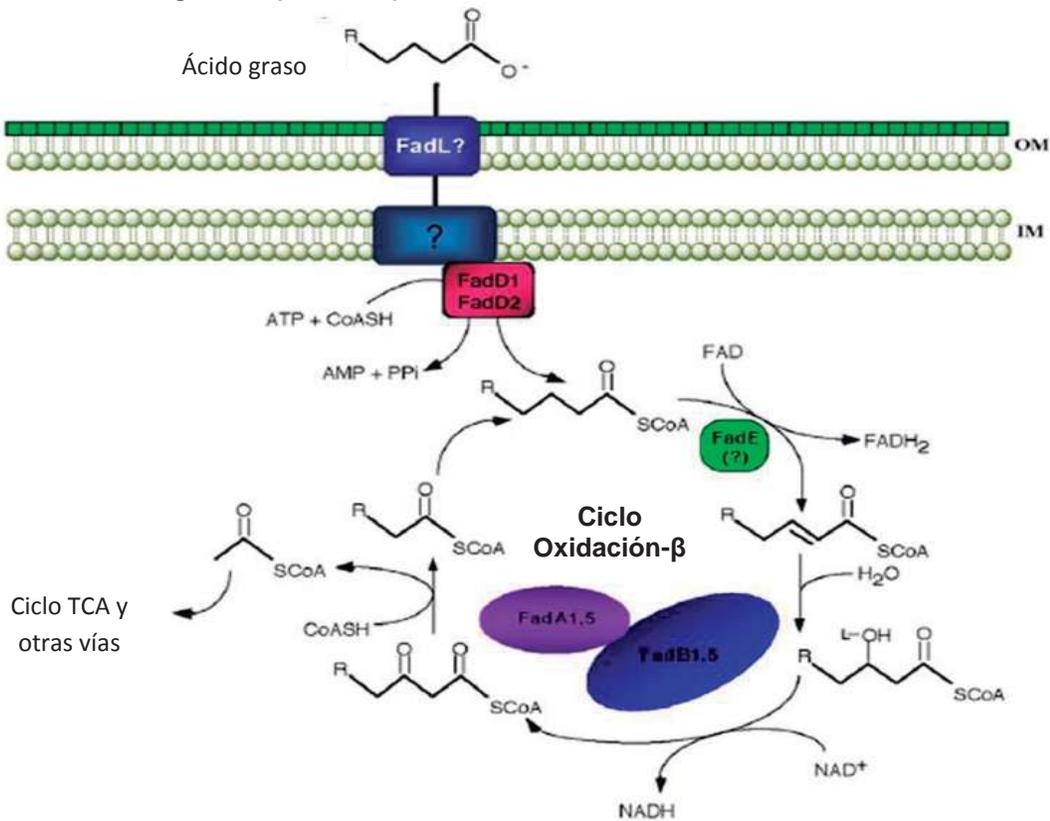


Figura 9. Esquema del transporte de los ácidos grasos en *P. aeruginosa*. Los ácidos grasos son transportados a través de la membrana externa ayudada por una proteína no identificada llamada FadL de *P. aeruginosa*. En *E. coli*, los ácidos grasos pueden ser transportados a través de la membrana interna por un mecanismo desconocido acoplado a una proteína de membrana periférica FadD. Sin embargo, *P. aeruginosa* contiene al menos 2 FadDs (FadD1 y FadD2). A pesar de que hay más de una docena de potenciales homólogos FadE en el genoma de *P. aeruginosa*, la enzima específica que cataliza esta reacción no ha sido identificada. FadB cataliza los dos siguientes pasos seguidos de la unión del 3-ceto-acil-CoA por FadA. Los dos operones *fadBA* (*fadBA1* y *fadBA5*) han sido identificados en *P. aeruginosa* (Tomada de Kang, *et al.*, 2010).

Realizaron también estudios bioquímicos de las proteínas FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* PAO1 indicando que mientras FadD1 prefiere ácidos grasos de cadena larga, FadD2 prefiere ácidos grasos de cadena mediana o corta (Fig. 10), por lo cual concluyeron que éstas enzimas están involucradas en la capacidad de invasión de tejidos de *P. aeruginosa* en enfermos por fibrosis quística (Kang, *et al.*, 2010).

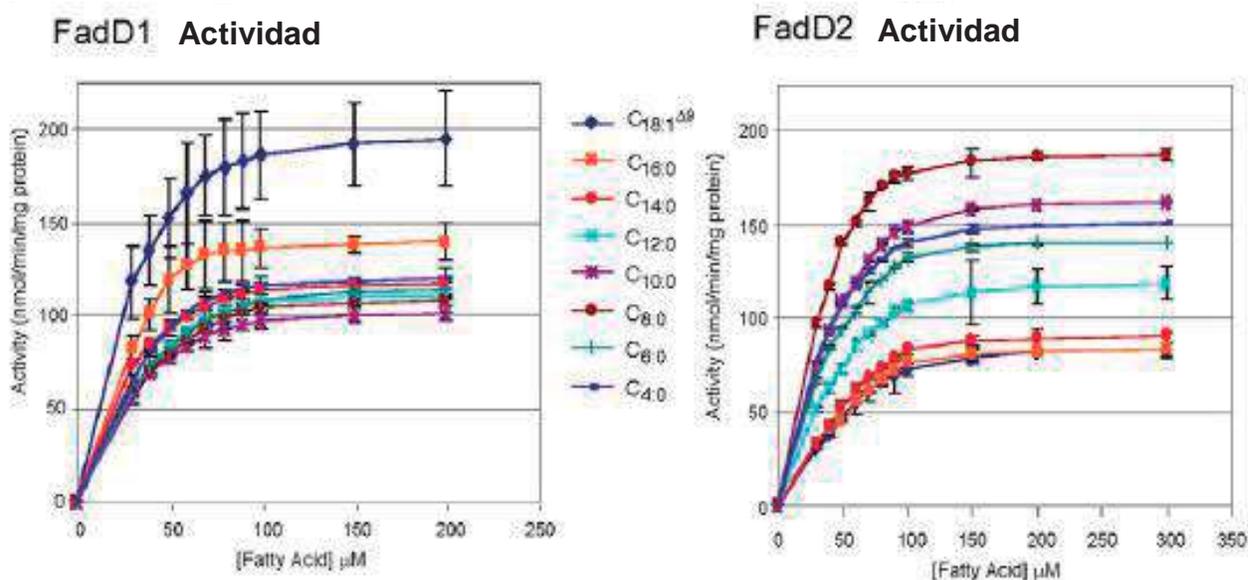


Figura 10. Actividad enzimática de FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa*. Curvas de actividad enzimática de las enzimas FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* PAO1 con ácidos grasos de distinto número de carbonos en las que se muestra que FadD1 presenta una mayor actividad con ácidos grasos de cadena larga y FadD2 muestra una tendencia similar pero con ácidos grasos de cadenas medianas a cortas. Tomada de Kang, *et al.*, 2010.

En la actualidad aun no existen reportes de la participación de las enzimas FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* en la degradación de terpenos, siendo que para la degradación de estos compuestos es necesaria la participación de una acil-CoA sintetasa como se mostró anteriormente. Dentro del genoma de *P. aeruginosa* solo han sido reportadas estas dos enzimas que corresponden a una acil-CoA sintetasa y es por esto que existe la sospecha que alguna de ellas lleve a cabo esta función en el vía de degradación de isoprenoides formando el terpenil-CoA para su posterior degradación hasta la formación del acetil-CoA.

El gen *fadD2* codifica para la enzima FadD2 siendo éste el gen estudiado en este trabajo, se propone que podría llevar a cabo la siguiente reacción en presencia de un compuesto 3-metil ramificado (ácido citronélico) (Fig 11).



Figura 11. Reacción propuesta donde participa la enzima FadD2 de *P. aeruginosa* para la formación del correspondiente terpenil-CoA en la vía de degradación de terpenos, usando como sustrato el ácido citronélico.

3-JUSTIFICACIÓN

Un paso fundamental de la ruta catabólica de los terpenos acíclicos en *Pseudomonas aeruginosa* es su activación, hasta la formación del terpenil-CoA en la vía superior de activación de los terpenos acíclicos, la cual es llevada por una acil-CoA sintetasa. El estudio del gen *fadD2* de *P. aeruginosa* que codifica para una acil-CoA sintetasa (FadD2) contribuirá para entender su posible papel en el catabolismo de terpenos acíclicos y a la cual se ha demostrado su preferencia por sustratos de cadena mediana a corta.

4-OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación del gen *fadD2* de *Pseudomonas aeruginosa* en el catabolismo de los terpenos acíclicos.

Objetivos específicos

- 1) Identificar la participación de FadD2 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en la degradación de compuestos hidrocarbonados y metil ramificados.
- 2) Identificar la expresión de la proteína FadD2 en cultivos celulares.

5- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1- Cepas y plásmidos

Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo.

Cepas	Características	Referencias
<i>E. coli</i> JM 101	Cepa estándar <i>supE, thi, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac⁺Z ΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
PA01SR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 resistente a estreptomycin	Wong y Mekalanos, 2000
PA-33	Mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, mutada por transposición en el ORF PA3300 correspondiente al gen <i>fadD2</i> con número de identificación ID33561, resistente a tetraciclina (60 µg/ml).	Jacobs, <i>et al.</i> , 2003
PA-21	Mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, mutada por transposición en el ORF PA3300 correspondiente al gen <i>fadD2</i> con número de identificación ID21643, resistente a tetraciclina (60 µg/ml).	Jacobs, <i>et al.</i> , 2003
PA-77	Mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, mutada por transposición en el ORF PA3300 correspondiente al gen <i>fadD2</i> con número de identificación ID776, resistente a tetraciclina (60 µg/ml).	Jacobs, <i>et al.</i> , 2003
Plásmidos	Características	Referencias
pGem-FadD2	pGEM-T con un fragmento amplificado por PCR de 1.7 kb correspondiente al gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1SR, al cual se le adicionaron en los extremos 3' y 5' los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III respectivamente.	Aguilar JA, 2010
pTrcHis2A	Plásmido empleado para la sobre expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> . Contiene un cassette de resistencia a ampicilina (100 µg/ml)	Invitrogen

pTrcHis2A- FadD2	Plásmido empleado para la expresión del producto del gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> . Con un fragmento <i>BamHI/HindIII</i> de 1.7 kpb correspondiente al gen <i>fadD2</i>	Este trabajo
-----------------------------	--	--------------

5.2- Medios de cultivo

5.2.1- Caldo Luria-Bertani (CLB)

NaCl-----5 g/l
Peptona de caseína-----10 g/l
Extracto de levadura-----5 g/l
Agua destilada c.b.p.----- 1000 ml

5.2.2- Agar Luria-Bertani (ALB)

Por cada litro de CLB se adicionaron 15 g de Agar bacteriológico.

5.2.3- Medio 2XYT

NaCl-----5 g/l
Peptona de caseína-----16 g/l
Extracto de levadura-----10 g/l
Agua destilada c.b.p.----- 1000 ml

5.2.4- Agar 2XYT

Por cada litro de medio 2XYT se adicionaron 15 g de Agar bacteriológico.

5.2.5- Medio mínimo M9

Se preparó el buffer 20X con las siguientes sales y se corrigió el pH a 7.4

K_2HPO_4 -----120 g/l

KH_2PO_4 -----60 g/l

NaCl-----10 g/l

NH_4Cl -----20 g/l

Agua destilada c.b.p.----- 1000 ml

Por cada 100 ml de medio se mezcló

Buffer de sales 20X-----5 ml

$MgSO_4$ 1M-----200 μ l

$CaCl_2$ 1M-----10 μ l

Trazas de Metales-----5 μ l

Agua destilada c.b.p.----- 100 ml

Las trazas de metales contienen: $MnSO_4 \cdot H_2O$, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, Na_2SeO_4 .

Al medio mínimo M9 que se utilizó para hacer las curvas de crecimiento se le adicionó peptona de caseína a una concentración final del 0.02%, el medio con el cual se crecieron los inóculos contenían como fuente de carbono glucosa al 0.2%

5.3- Métodos

5.3.1- PROCEDIMIENTOS CON *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.1.1- Selección de clonas de las mutantes en el ORF PA3300 de *P. aeruginosa* PAO1 involucradas en la degradación de citronelol, 1-octanol y leucina

Se crecieron por estría cruzada las 3 mutantes en el ORF PA3300 de *P. aeruginosa* PAO1 en placas de agar LB con su marcador de selección (tetraciclina) para obtener 5 colonias aisladas que tuvieran las características fenotípicas de la cepa. Estas 5 colonias se crecieron en una placa de agar M9, de manera que fueran expuestas a 3 diferentes fuentes de carbono por separado, en el caso de citronelol y L-octanol fueron colocados 100 µl del compuesto en un papel filtro en la parte superior de la placa y la leucina se mezcló con el agar a una concentración final del 0.5 %, un 0.005 % de isoleucina y valina, incubándose las placas a 30°C por 72 horas.

5.3.1.2- Curvas de crecimiento de las clonas de las mutantes en el ORF PA3300 de *P. aeruginosa* PAO1.

A las colonias seleccionadas se les hizo una cinética de crecimiento utilizando como fuente de carbono citronelol, leucina, ácido isovalérico y ácidos grasos de palma de la siguiente manera:

- a) Se crecieron las clonas en 3 ml de medio mínimo M9 adicionado con peptona de caseína a una concentración final del 0.02 % y glucosa al 0.2 % como fuente de carbono, incubando los tubos a 30°C por 12 horas en agitación constante.
- b) Se inocularon los matraces de 250 ml que contenían el medio mínimo M9 adicionado con el 0.02 % de peptona de caseína y con su respectivo compuesto, se incubaron a 30°C a 150 rpm y se tomaron

lecturas cada 4 horas durante 36 horas, las muestras fueron leídas en el espectrofotometro Thermo scientific Genesys 20 a 600 nm.

c) En el caso de los ácidos grasos de palma el muestreo se realizó cada hora por 12 horas continuas.

El citronelol se utilizó a una concentración final de 0.075 % al igual que el ácido isovalérico y los ácidos grasos de palma, la leucina se utilizó a una concentración de 0.5 % con isoleucina y valina al 0.005%

Debido a que la mezcla de ácidos grasos de palma era de consistencia sólida se decidió hacer dos cinéticas por separado con ellos, la primera se realizó disolviendo a estos en Triton X-100 al 40%, y una segunda agregándolos solo disueltos con calor.

Los ácidos grasos de palma están compuestos por una mezcla de ácidos grasos de cadena larga, mayores a 14 carbonos, se enlistan enseguida:

- 1) Ácido mirfístico----- máx. 2.0 %
- 2) Ácido palmítico-----26-36 %
- 3) Ácido esteárico-----14-20 %
- 4) Ácido oléico-----35-48 %
- 5) Ácido linoléico-----2-8 %
- 6) Ácido linolénico-----máx. 5.0 %

5.3.1.3- Aislamiento de ADN total (cromosómico) de *P. aeruginosa*

- 1) Se inocularon 3 ml de CLB con la cepa de interés y se creció durante toda la noche a 30°C en agitación constante.
- 2) Las células se cosecharon centrifugando 1 min/12,000 rpm; las células se resuspendieron después en 450 µl de TE 50/20 (Tris 50 mM, pH 8/EDTA 20 mM, pH8).

- 3) Se agregaron: 50 μ L del stock de lisozima 10 mg/ml; se incubó durante 30 min/37°C. Posteriormente se adicionaron 50 μ l del stock de proteinasa K 20 mg/ml; se incubó durante 15 min/37°C. Después se agregaron 50 μ l de SDS al 10% y se incubó por 30 min/ 37°C.
- 4) Posteriormente se adicionaron 100 μ l de NaCl 5 M y se agitó en vortex durante 15 min, para después incubarse 5 min a 65°C.
- 5) Se adicionaron 80 μ l CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio al 10% y NaCl 0.7 M) y se incubó durante 10 min a 65°C.
- 6) La muestra se extrajo con cloroformo (aprox. 250 μ l) agitando de 4-5 min en vortex, se centrifugó por 4-5 min/10,000 rpm.
- 7) Se extrajo 2 veces con 200 μ l de fenol/cloroformo 1:1; posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm/7 min.
- 8) Se adicionaron 500 μ l de etanol/isopropanol (60:40), se incubó a -20°C por 1 min.
- 9) Se lavó la pastilla 3 veces con 500 μ L de etanol al 70%.
- 10) Se resuspendió la partilla en 200 μ L de agua.
- 11) Se agregaron 2 μ l de RNAsa y se incubó 1 hora/37°C.

5.3.2- Procedimientos con células de *Escherichia coli*

El aislamiento de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina de acuerdo al siguiente protocolo adaptado de Sambrook, *et al.*, 1989.

5.3.2.1- Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina

- 1) Se creció 3 ml de cultivo durante toda la noche a 30°C en agitación constante.
- 2) Las células se cosecharon centrifugando a 10,000-13,500 rpm /1 min.
- 3) Se resuspendió la pastilla celular en 150 μ L de STE [sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) 10 mM, pH 8].

- 4) Se adicionaron 250 μL de solución de lisis [NaOH 0.2 N, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %] se mezcló suavemente y se incubó por 10 min a 4°C
- 5) Se adicionaron 150 μL de acetato de sodio 3 M, pH 4.8, se mezcló suavemente y se incubó por 10 min a 4°C
- 6) Se centrifugó a 12,000-13,000 rpm durante 2 min
- 7) Se pasó el sobrenadante a un microtubo nuevo y se le agregó 50 μL de fenol:cloroformo 1:1, se mezcló en vortex por un min y se centrifugó a 12,000-13,000 rpm por 7 min
- 8) El sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se le agregaron 500 μL de EtOH/Isopropanol 60:40 (% vol/vol) y se incubó por 15 min en hielo hasta la precipitación del ADN. Se centrifugó por 2 min.
- 9) Se decantó el sobrenadante, se lavó de 1-3 veces con etanol 70 % y se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm, secando posteriormente la pastilla a 37°C y resuspendiendo en 50 μL de agua destilada estéril. Se agregaron 3 μL de RNAsa (1 mg/ml).
- 10) Se almacenaron las muestras a -20°C o se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa.

5.3.2.2- Electroforesis en geles de agarosa

Al ADN plasmídico se le realizó un corrimiento electroforético en geles de agarosa de la siguiente manera:

- 1) El gel de agarosa se preparó al 1 % en Buffer TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M, pH 8.5).
- 2) El gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal llenada con el buffer TAE.
- 3) Las muestras de plásmido se mezclaron con el buffer de carga (azul de bromofenol 0.0025 % y cianol xileno FF 0.0025 % en solución de glicerol al 30 %) y se colocaron en los pocillos del gel, también en otro pocillo se

cargó un marcador de tamaño molecular de ADN lineal (ADN del fago lambda digerido con la(s) endonucleasa *HindIII* o *EcoRI-HindIII*).

- 4) Se conectó la cámara a la fuente de poder y se realizó el corrimiento electroforético aplicando 130 voltios durante 30 min.
- 5) Se tiñeron los geles con bromuro de etidio (0.001 mg/ml) y se observaron en el transluminador de luz UV de onda corta (Vilber Loumart).

5.3.2.3-Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de fragmentos se llevó a cabo con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega) como se describe a continuación:

Se cortó el fragmento del gel de agarosa donde está ubicado el ADN de interés con un bisturí y se colocó en un tubo eppendorf.

- 1) Se le adicionó la misma cantidad de miligramos que peso la agarosa, en μ l de solución de unión a la membrana y se disolvió a 50-60°C por 10 min.
- 2) Enseguida se colocó una columna en su tubo colector de 2 ml y dentro de la columna se depositó toda la mezcla de agarosa, se centrifugó 1 min/10,000 rpm.
- 3) Se le agregó a la columna 700 μ l de solución de lavado y se centrifugó 1 min/10,000 rpm.
- 4) Posteriormente se le agregó nuevamente a la columna 500 μ l de solución de lavado y se centrifugó 5 min/10,000 rpm y se desechó el contenido del tubo colector.
- 5) Se le dió un pulso de 1 min en la centrifuga a la columna dentro del tubo colector para evaporar la solución de lavado que haya quedado en la columna.
- 6) Se colocó la columna en un tubo eppendorf y se le adicionaron 20-30 μ l de agua libre de nucleasas calentada previamente 70-90°C; se incubó por 2 min/T° ambiente y se centrifuga 2 min/10,000 rpm.

5.3.2.4- Transformación

5.3.2.4.1- Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

- 1) Se inoculó un matraz de un litro conteniendo 250 ml de CLB con un pre-inóculo de 3 ml previamente crecido durante toda la noche.
- 2) Se incubó a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a 600 nm medida en el espectrofotómetro Thermo scientific Genesys 20.
- 3) El cultivo se colocó en hielo durante 10 min, para después cosecharse a 5,500 rpm a 4°C.
- 4) A las células obtenidas se les hicieron 2 lavados, uno con 50 ml y otro con 25 ml de agua destilada, estéril, fría centrifugándolas a 5,500 rpm a 4°C por 10 min.
- 5) Posteriormente se les hizo un lavado con 50 ml de glicerol al 10 % estéril, frío, centrifugándolas a 5,500 rpm a 4°C por 10 min.
- 6) Enseguida se resuspendieron las células en 1 ml de glicerol al 20 % estéril, frío.
- 7) Se hicieron alícuotas de 100 µl de células que posteriormente se guardaron a -80°C.

5.3.2.4.2- Transformación de células electrocompetentes de *E. coli*

- 1) A una alícuota de 100 µl de células se le adicionó 1-5 µl de ADN plasmídico (aprox 50 ng) y se colocó la mezcla entre los electrodos de una celda para electroporación de 0.1 cm en la cámara del electroporador (Micropulser BIO-RAD) y se le dió un pulso de 1.8 KV por 4-6 milisegundos.
- 2) Posteriormente las células fueron transferidas a 1 ml de CLB e incubadas 1 hora a 30 ° C en agitación constante.
- 3) Enseguida se colocaron 200 µl de las células en una placa de ALB con el antibiótico adecuado, incubando la placa a 37°C por 24 hrs.

5.3.3- Procesos enzimáticos

5.3.3.1- Restricción de ADN con enzimas de restricción (endonucleasas)

El ADN fue digerido utilizándose una unidad de endonucleasa por μg de ADN, incubándose por un mínimo de 1 hora a 37°C ; después se sometió la mezcla a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar que se hayan obtenido los fragmentos de ADN esperados.

5.3.3.2- Ligación de ADN

Los fragmentos de ADN fueron ligados de la siguiente manera: 200 ng de fragmento de ADN (*fadD2*), 30 ng de pTrcHis2A, 2 μl de buffer 10X T4 DNA ligasa, 0.5 μl de T4 ADN ligasa y se llevó a un volumen de 20 μl con agua destilada estéril; se incubó a $4^\circ\text{C}/12$ horas, después 2 μl de la reacción de ligación se transformó en 100 μl de células electrocompetentes para su posterior selección.

5.3.3.3- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen *fadD2* se utilizó el oligo FadD2-B (5' AGG ATC CCA TGC AAC CTG AAT TCT GGA AC 3') que le proporcionó el sitio de restricción *Bam*HI, y el oligo FadD2-A (5' GAA GCT TGG CGA TTT CGC GCA GCT CAC G 3') que le proporcionó el sitio de restricción *Hind*III, lo cuales son subrayados en las secuencias de los oligos, produciendo un fragmento de 1.7 kb.

Para la reacción de amplificación se utilizó ADN plasmídico de PGEM-*fadD2* (50 ng), buffer de reacción 10X (5 μl), MgSO_4 1 mM (1 μl), dNTPs 10 mM (1.5 μl), 30 picomoles del oligo FadD2-A, 30 picomoles del oligo FadD2-B, Enhancer (1 μl) y ADN polimerasa Platinum *Pfx* (0.4 μl), se llevó a un volumen de 50 μl y se sometió a un ciclo de $94^\circ\text{C}/2$ min, posteriormente se sometió a 35 ciclos de $94^\circ\text{C}/40$ seg, $55^\circ\text{C}/40$ seg y $68^\circ\text{C}/2$ min, finalmente se sometió a un ciclo de

68°C/5 min. Ya finalizada la reacción se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar que se haya logrado amplificar el gen *fadD2*.

La reacción de amplificación de las mutantes en el ORF PA3300 de *P. aeruginosa* se llevó a cabo utilizando ADN cromosomal de PA-33 y PA-21 (200ng), buffer de reacción 10X (5 µl); MgSO₄ 1 mM (1 µl); dNTPs 10 mM (1.5 µl); 30 picomoles del oligo FadD2-A; 30 picomoles del oligo FadD2-B; enhancer (1 µl) y ADN polimerasa Platinum Pfx (0.4 µl); se llevó a un volumen de 50 µl, la cepa mutante de PA-33 se sometió a un ciclo de 94°C/5 min, posteriormente se sometió a 35 ciclos de 94°C/40 seg, 58°C/40 seg y 68°C/7 min, finalmente se sometió a un ciclo de 68°C/5 min; la cepa mutante PA-21 se sometió a un ciclo de 94°C/5 min, posteriormente se sometió a 35 ciclos de 94°C/40 seg, 58°C/40 seg y 68°C/8 min, finalmente se sometió a un ciclo de 68°C/5 min. Ya finalizadas las reacciones se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar que se haya logrado amplificar el gen *fadD2* interrumpido con el respectivo transposón.

5.3.4- Procedimientos con proteínas

5.3.4.1- Obtención de extractos celulares

Se crecieron en tubos 3 ml de CLB adicionado con ampicilina 50 µg/ml con 6 transformantes con el plásmido pTrcHis2A-*fadD2*, adicionado también con IPTG (isopropil tio-β-galactósido) 1 mM y crecidos en agitación constantes a 30°C por 14 horas. Las células fueron cosechadas a 12,000 rpm por 2 min y resuspendidas en 100 µl de buffer Tris/NaCl (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0). Se lisaron las células por sonicación y enseguida se analizaron las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Al obtener el lisado de la transformante número 6 se tomó una fracción que se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. Se separó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 300 µl de buffer Tris/NaCl para resuspenderlo; éstas dos muestras también fueron analizadas en el mismo gel de poliacrilamida.

5.3.4.2- Western-blot

Se realizó para la detección del epítipo de histidinas que le proporciona el plásmido pTrcHis2A a la proteína que se fusionó (FadD2) de la siguiente manera:

- a) Los extractos celulares se corrieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).
- b) Se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa humedecida con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %) y con el uso de una cámara de transferencia (Trans-Blot SD Semi-Dry), la transferencia se llevó a cabo por 45 min a 15 Volts.
- c) Se bloqueó la membrana con leche al 1% en TBS (Tris base 10mM, NaCl 0.9%, pH 7.8) por 2 h en agitación constante a 4°C, enseguida se realizó un lavado de la membrana con TBS.
- d) A la membrana se le agregó el reactivo HisRP disuelto en una solución de leche al 0.3% en TBS a una concentración de 1:2000. Se mantuvo en agitación constante por 14 h a 4°C, enseguida se lavó la membrana 4 veces por lapsos de 45 min con TBS-T (TBS adicionado con Tween-20 al 0.1%).
- e) En completa obscuridad se colocó la membrana en una solución 1:1 de luminol / peróxido de hidrógeno por 1 min.
- f) Se colocó la membrana en contacto con una placa radiográfica por 5 min y se siguió con el revelado de la placa.
 - 1) Se sumergió la placa en solución de revelado por 1 min.
 - 2) Se sumergió en solución fijadora por 3 min.

5.3.4.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se hicieron los geles de poliacrilamida al 14% ensamblando los vidrios y preparándolo de la siguiente manera:

5.3.4.3.1- Gel separador al 14%:

Se mezcló 1.536 ml de agua destilada, 2.324 ml de una mezcla de Acrilamida-Bisacrilamida (29:1 %), 1.26 ml de Buffer Tris-Base 1.5 M, pH 8.8; 50.4 µl de SDS al 10%, 25.6 µl de Persulfato de amonio (PSA) al 10% y 4.5 µl de N,N,N',N'-Tetrametil-Etilendiamina (TEMED). Se mezcló muy bien y se depositó entre los dos vidrios, enseguida se colocó una capa de agua tratando de no mezclar y se dejó polimerizar por 15 min.

5.3.4.3.2- Gel concentrador al 4%:

Se preparó mezclando 1.22 ml de agua destilada, 0.27 ml de una mezcla de Acrilamida-Bisacrilamida (29:1 %), 0.5 ml de Buffer tris-Base 0.5 M, pH 6.8; 19.8 µl de SDS al 10%, 10.8 µl de PSA al 10% y 2.7 µl de TEMED. Se mezcló de manera rápida y se depositó sobre el gel separados entre los vidrios, se colocó el peine y se dejó polimerizar por 15 min.

Cuando ya polimerizó el gel, se ensambló en la cámara de electroforesis, se llenó el tanque superior e inferior con Buffer de corrida Tris-Glicina y se cargó el gel con las muestras mezcladas con buffer de carga en cada carril, la cámara se conectó en la fuente de poder y se corrió a 120 voltios por 90 min. Después de que se corrió el gel, se desensambló la cámara y se removió el gel, este fue teñido con solución de Azul de Coomassie.

5.3.4.3.3- Buffer de carga

Para preparar 9.5 ml de buffer de carga se mezclaron:

Agua destilada-----3.55 ml

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8-----1.25 ml

Glicerol-----2.5 ml

SDS 10%-----2 ml

Azul bromofenol 0.5%-----0.2 ml

Se hicieron alícuotas de 950 μ l y se guardaron a -20°C ; cuando una alícuota se usó se le agregaron 50 μ l de β -mercaptoetanol.

Para cargar un gel previamente se mezcló la muestra con 15 μ l de buffer de carga y se calentaron a $95-100^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Como marcador de peso molecular se usó el marcador Bench Marck (Invitrogen) .

5.3.4.3.4- Tinción del gel SDS-PAGE

- Se depositó el volumen necesario de solución de tinte de Azul de Coomassie para que el gel de poliacrilamida quedara totalmente cubierto y se dejó en agitación constante durante 30 min.
- Se recuperó la solución de tinte y se lavó el gel con agua destilada.
- Se le agregó ahora al gel solución de destinte y se destintó por lo menos 2 horas.

-Solución de tinte Azul de Coomassie

Metanol-----125 ml

Ácido acético-----25 ml

Azul brillante de Coomassie-----0.1375 g

Agua destilada-----125 ml

-Solución de destinte Metanol:Ácido acético 40:7

Metanol-----200 ml
Ácido acético-----35 ml
Agua destilada-----265 ml

5.3.4.3.5- Buffer de corrida Tris-Glicina

Para preparar 2 litros de buffer de corrida se mezclaron:

Tris-Base-----6.05 g
Glicina-----28.8 g
SDS-----2 g
Agua destilada cbp-----2 L

6- RESULTADOS

6.1- Selección de clonas de las mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 en el gen *fadD2*

Jacobs y col., en el 2003 crearon una biblioteca de mutantes por transposición de *P. aeruginosa* PAO1, obteniendo 30,100 mutantes por inserción de dos distintos transposones (Fig. 12).

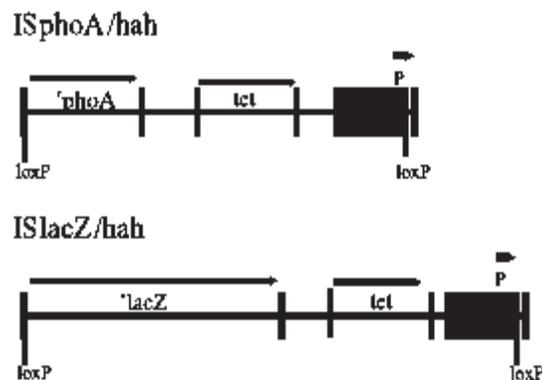


Figura 12. Transposones usados para mutagénesis por inserción en *P. aeruginosa* PAO1. Transposón ISphoA/hah de 4.83 Kpb e ISlacZ/hah de 6.16 Kpb. Tomada de Jacobs, *et al.*, 2003.

En ésta biblioteca existen 3 mutantes distintas en el ORF PA3300 que corresponde al gen *fadD2*, el cual será estudiado a lo largo de este trabajo. Las mutantes tienen número de identificación ID33562, ID21643 y ID776, la diferencia entre ellas es el transposón que poseen y la localización de la mutación dentro del gen *fadD2*.

Las 3 mutantes en el gen *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 identificadas [ID33561 (PA33), ID21643 (PA21) Y ID776 (PA77)] fueron crecidas en placas de ALB para la selección de 5 colonias aisladas de cada mutantes y crecidas posteriormente en placas de agar M9 teniendo como única fuente de carbono citronelol, 1-octanol y leucina, con lo cual se determinaría si es que la inserción del transposón en el gen *fadD2* de *P. aeruginosa* afectaba la degradación de terpenos acíclicos, esperando que las clonas no crecieran al tener como única fuente de carbono el citronelol.

Se utilizó el citronelol por ser un compuesto usado como modelo de estudio en la degradación de alcanos 3-metil ramificados; el octanol por ser un compuesto de cadena lineal que permite verificar si las mutantes son capaces de degradar este tipo de compuestos, degradados principalmente por la oxidación- β y por último, la leucina se utilizaría como un compuesto control por converger con la vía de degradación de terpenos en el 3-metilcrotonil-CoA que es una vía distinta en la cual no se utiliza una acil-CoA sintetasa para que se lleve a cabo la degradación de ésta.

Las placas de M9 se incubaron durante 72 h, tomándose lectura de ellas cada 24 h, marcando en cruces el nivel de crecimiento que alcanzaban en los diferentes compuestos. Como control del experimento se usó la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1SR.

Los resultados se muestran en la tabla 3, presentando solo 2 colonias representativas al azar del experimento por cada mutante, y la lectura a las 72 horas, siendo este el tiempo máximo de crecimiento y en el cual se observó más claro el fenotipo que mostraron las mutantes.

Tabla 3. Crecimiento de las cepas mutantes en agar M9 adicionado con citronelol, 1-octanol o leucina a las 72 hrs.

	Citronelol	1-Octanol	Leucina
PAO1SR	++++	+++++	+++++
PA33-1	+	+++++	+
PA33-2	+	+++++	+ \cancel{y}
PA21-1	++++	+++++	+++++
PA21-2	+ \cancel{y}	+++++	+
PA77-1	+++++	+++++	+++++
PA77-2	+++++	+++++	+++++

El crecimiento está representado en cruces, (+) crecimiento visible, (\cancel{y}) aparente, (-) sin crecimiento.

Se observó que la mutante PA77 no tuvo mayor diferencia en crecimiento en comparación con la cepa silvestre PAO1; pero en la mutante PA21 se logró observar que una de las colonias seleccionadas tuvo un menor crecimiento en el citronelol y leucina, y un muy buen crecimiento en el 1-octanol; patrón repetido pero con todas las colonias correspondientes con la mutante PA33 la cual mostró las mismas características. Esto debido a que solo lograron utilizar el 1-octanol como única fuente de carbono, contrariamente con los otros dos compuestos (cit y leu) que crecieron en menor proporción.

Por lo anterior se eligieron la mutante PA33 y la mutante PA21, descartando la mutante PA77 por no mostrar el fenotipo esperado y seleccionando específicamente las clonas de las mutantes marcadas con los números PA33-1 y PA21-2 que fueron las que mostraron más claro el fenotipo esperado, se les realizó una amplificación por PCR del gen *fadD2* para verificar la inserción del transposón dentro del gen.

6.2- Comprobación de la inserción del transposón en las mutantes en *fadD2* PA33 y PA21

Para verificar que las clonas de las mutantes seleccionadas si tuvieran el inserto del transposón indicado en la base de datos de *P. aeruginosa* (Winsor, *et al.*, 2010) se les realizó una amplificación por PCR. Se utilizaron el par de oligos *fadD2A* y *fadD2B* (materiales y métodos). Se obtuvo del PCR de la mutante PA33 un fragmento de tamaño esperado de 6.53 kpb, correspondiente al gen *fadD2* que tiene insertado el transposón *IS_{phoA}/hah* con un tamaño de 4.83 kpb, y de la mutante PA21 el fragmento fue de 7.86 kpb, del tamaño esperado, que correspondería al gen *fadD2* que tiene inserto el transposón *IS_{lacZ}/hah* con un tamaño de 6.16 kpb (Fig. 13). En ambos PCR's se amplificaron más fragmentos, lo cual podría deberse a que los primeros nucleótidos que contienen los oligos reconozcan más de un sitio en el genoma de la bacteria aunado a esto las condiciones en que fueron corridos las reacciones.

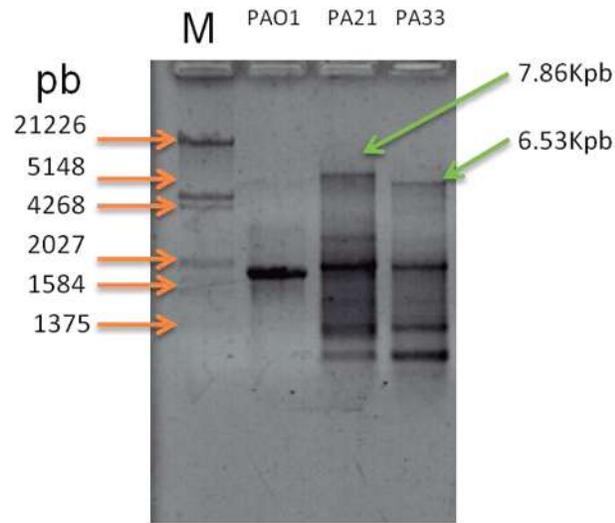


Figura 13. PCR de *P. aeruginosa* PAO1 y las mutantes por transposición en el gen *fadD2* de *P. aeruginosa*. Imagen del gel de agarosa al 1% donde se muestra el corrimiento de los fragmentos amplificados por PCR de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1SR y las mutantes en *fadD2* seleccionadas con los oligos que amplifican a *fadD2*. M= marcador de tamaño molecular.

Ya comprobado que las mutantes si correspondían con el transposón reportando en la base de datos de *P. aeruginosa* se decidió hacer una cinética de crecimiento con las mutantes PA21 y PA33. La cinética se llevó a cabo en medio mínimo M9 adicionado con citronelol, leucina, ácidos grasos de palma o ácido isovalérico como única fuente de carbono (materiales y métodos); utilizando la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1SR como control positivo del experimento.

Se utilizó para este experimento el citronelol y la leucina pero se agregó también el ácido isovalérico por ser un compuesto que se degrada por la vía de leucina/isovalerato LIU convergiendo en el 3-metilcrotonil-CoA en la vía de degradación de terpenos, y con el cual se podría determinar si la enzima tiene preferencia por compuestos metil ramificados ya que para su degradación es necesaria también una acil-CoA sintetasa. También se agregó una mezcla de ácidos grasos de palma, compuesta por 6 ácidos grasos con cadenas superiores a 14 carbonos; esta mezcla ayudarían a verificar si la activación de los ácidos

grasos de palma está llevándose a cabo de manera exitosa, lo cual indicaría qué papel tiene esta enzima en la activación de los ácidos grasos de cadena larga. Recordando que Kang, et al., en el 2010 al caracterizar *fadD2* mostró que esta enzima tenía preferencia por ácidos grasos de cadenas medianas a cortas por lo cual se esperaba que la mutantes en el gen *fadD2* tuvieran un crecimiento a la par con la cepa silvestre por tener intacto el gen *fadD1* que según Kang y col. mostraron que fuera el que tuviera preferencia por cadenas largas de ácidos grasos.

6.3-Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes en *fadD2*

Las clonas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 previamente seleccionadas fueron crecidas en medio mínimo M9 adicionado con citrónelol como única fuente de carbono incubándose en agitación a 30°C, se tomaron muestras del cultivo cada 4 horas por 36 horas seguidas y se leyó a 600nm. Estas mostraron un menor crecimiento con respecto a la cepa silvestre ya que se observó una diferencia significativa entre las clonas y la cepa silvestre desde las 4 horas de crecimiento, y así durante todo el experimento lo cual indicaría que FadD2 si podría estar involucrada en la degradación de compuestos 3-metil ramificados ya que al no sintetizarse impide que las mutantes degraden el citrónelol al mismo nivel que lo hace PAO1. (Fig 14)

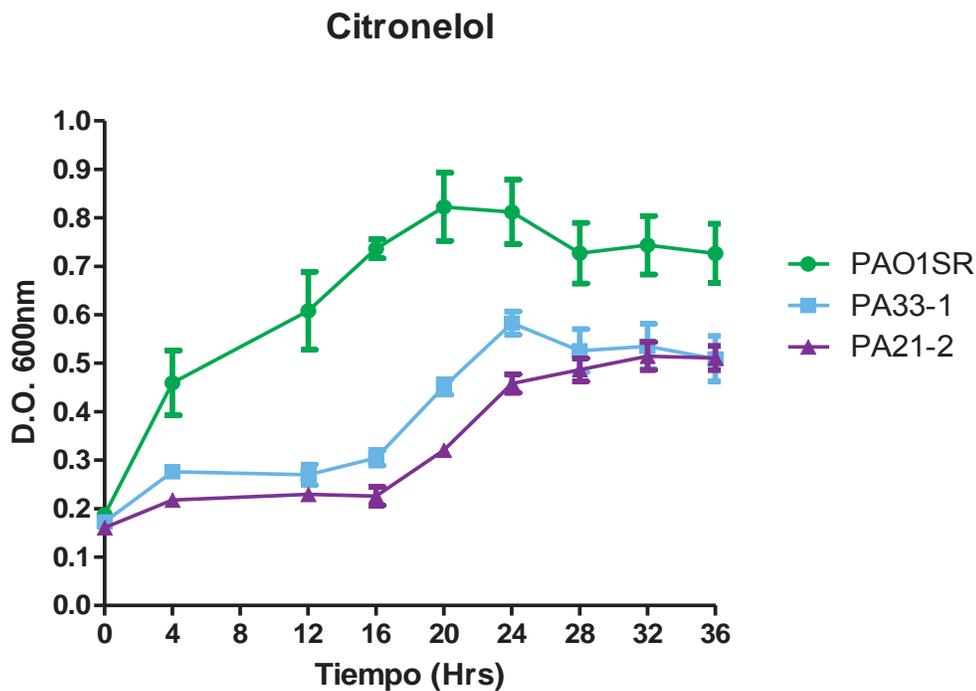


Figura 14. Cinética de crecimiento de la clonas mutantes en *fadD2* y la cepa silvestre PAO1SR en citrónelol. Medio mínimo M9 adicionado con citrónelol al 0.075% en agitación constante a 30°C. n=2, por duplicado.

Se realizó una cinética de crecimiento de las clonas en medio mínimo M9 adicionado con leucina como única fuente de carbono (Fig. 15), mostrando las clonas un crecimiento similar al de la cepa silvestre, lo cual indica que FadD2 podría no intervenir en la degradación de la leucina.

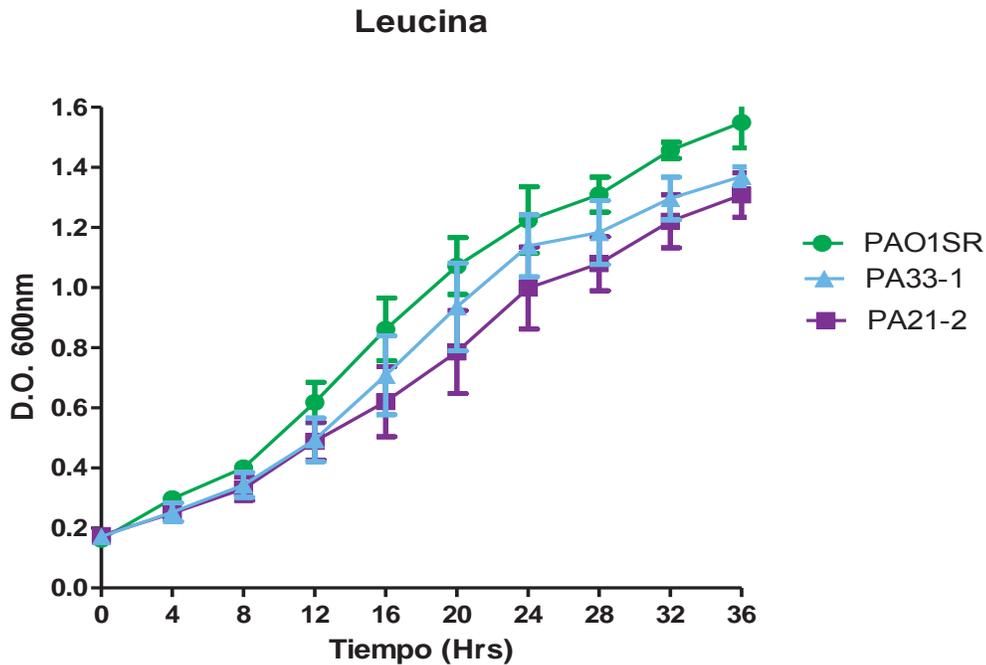


Figura 15. Cinética de crecimiento de la clonas mutantes en *fadD2* y la cepa silvestre PAO1SR en leucina. Medio mínimo M9 adicionado con leucina al 0.5% en agitación constante a 30°C. n=3.

En la degradación del isovalerato se requiere una acil-CoA sintetasa para que se forme el isovaleril-CoA (Campos-García, 2010). Al crecer la cepas mutantes con ácido isovalérico mostraron un crecimiento a la par con la cepa silvestre (Fig. 16), lo cual indica que FadD2 no está involucrada en la degradación de este compuesto. Esto podría deberse a que esta enzima no interviene en la vía LIU o a que *P. aeruginosa* PAO1 posee otro gen que codifique esta función.

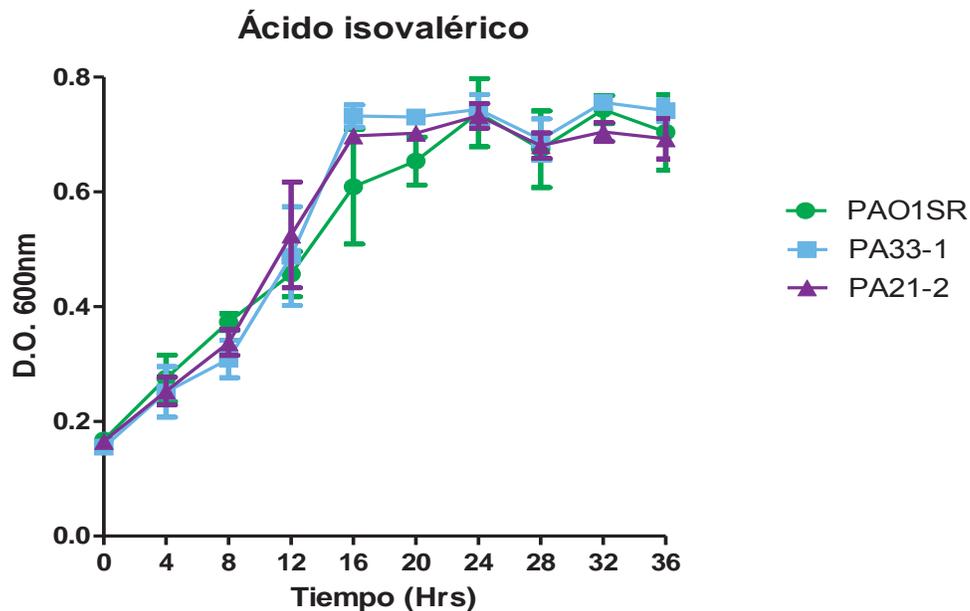


Figura 16. Cinética de crecimiento de la clonas mutantes en *fadD2* y la cepa silvestre PA01SR en ácido isovalérico. Medio mínimo M9 adicionado con ácido isovalérico al 0.075% en agitación constante a 30°C. n=3

Los ácidos grasos son degradados directamente en la oxidación- β , activados previamente por una acil-CoA sintetasa. Se crecieron las mutantes en una mezcla de 6 ácidos grasos de palma, con cadenas mayores a 14 carbonos. Debido a que la mezcla de ácidos grasos era sólida, se decidió hacer la cinética de crecimiento disolviendo la mezcla en un detergente (Triton X-100) y una segunda cinética alterna agregando directamente los ácidos grasos disueltos sólo con calor. Como se puede observar en las Figuras 17 y 18 existen diferencias en el crecimiento. Se observó un crecimiento a la par de las mutantes con la cepa silvestre al colocar los ácidos grasos disueltos con el detergente, así como también se observó que hubo un mayor crecimiento (Fig. 17), destacando que se realizó alternamente una cinética de crecimiento de la cepa silvestre agregando el detergente como única fuente de carbono, sirvió para descartar que fuera el detergente lo que estuviera degradando la cepa y no los ácidos grasos ya que no mostró crecimiento. Al ser crecidas con los ácidos grasos sólo disueltos con calor hubo una diferencia significativa en crecimiento de las mutantes contra la cepa

silvestre a partir de la muestra de las 6 horas, mostrando las mutantes un menor crecimiento (Fig. 18). Se puede decir que FadD2 no interviene en la activación de ácidos grasos de cadenas largas por lo mostrado en la fig. 17, pero también mostraron las clonas un menor crecimiento con respecto a la cepa silvestre al ser colocados en el medio los ácidos grasos disueltos con calor (Fig. 18), esto podría haberse debido a que al colocar los ácidos grasos disueltos con un detergente quedan más expuestos a la degradación y ahí es donde no interviene la FadD2 debido a que *P. aeruginosa* posee a FadD1 que anteriormente había sido caracterizada como la enzima que tiene preferencia por ácidos grasos de cadenas largas, pero al colocar los ácidos grasos disueltos solamente con calor es más complicado para *P. aeruginosa* degradarlos ya que también se forman grumos en el medio que complican aún más su degradación, y es debido a esto que las clonas mostraron un menor crecimiento ya que la silvestre tiene las enzimas FadD1 y FadD2 intactas.

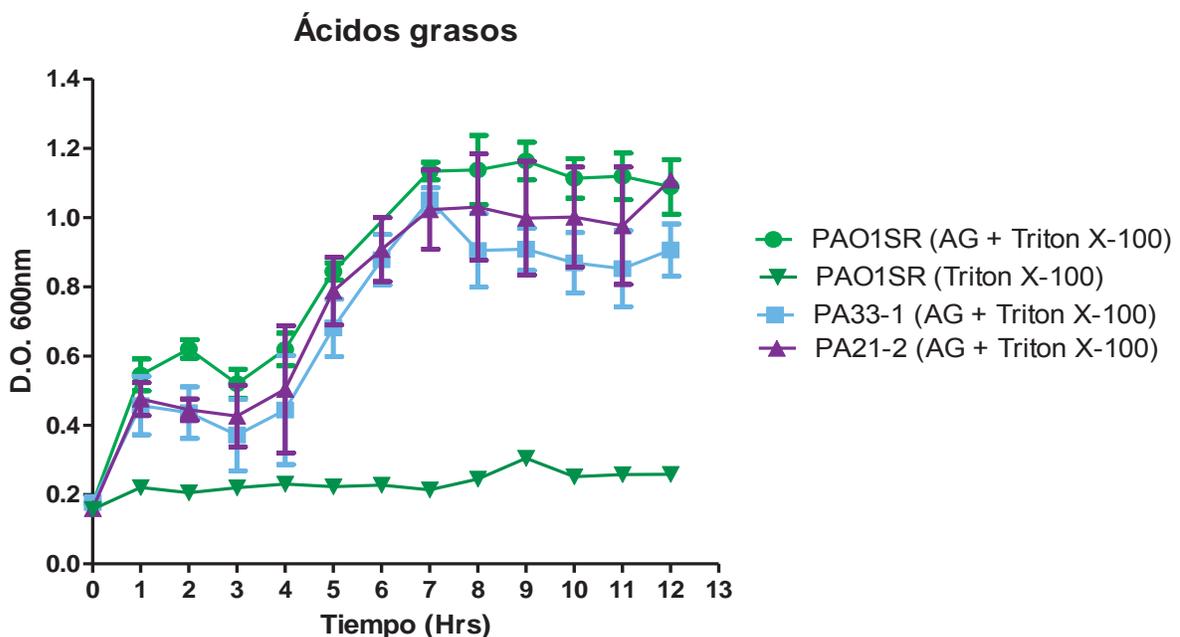


Figura 17. Cinética de crecimiento de las clonas mutantes en *fadD2* y la cepa silvestre PAO1SR en ácidos grasos de palma disueltos en triton X-100. Medio mínimo M9 adicionado con ácidos grasos de palma al 0.075% disueltos en triton X-100 al 40%, en agitación constante a 30°C. n=3.

Ácidos grasos

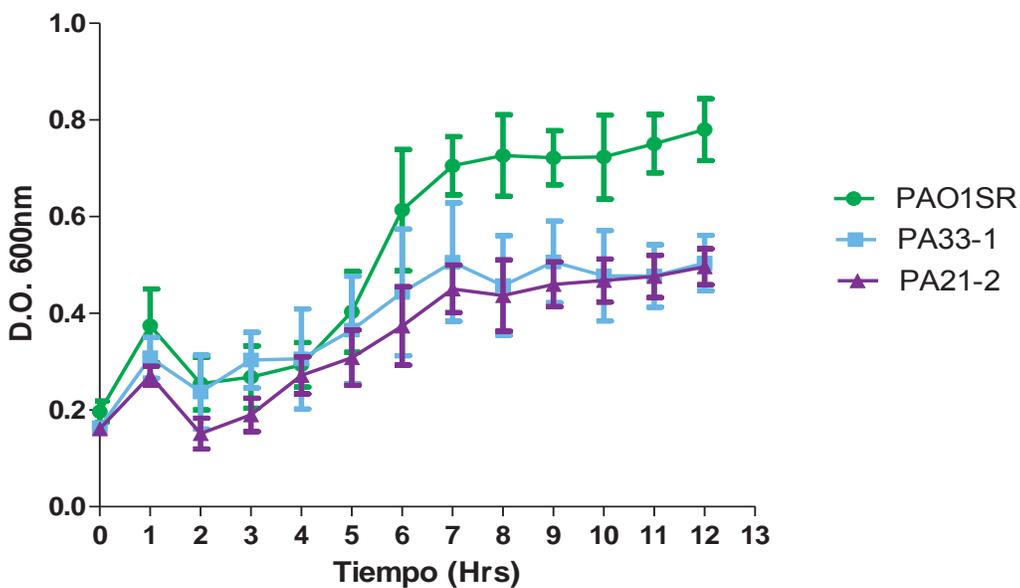


Figura 18. Cinética de crecimiento de la clonas mutantes en *fadD2* y la cepa silvestre PAO1SR en ácidos grasos disueltos con calor. Medio mínimo M9 adicionado con ácidos grasos de palma al 0.075% disueltos con calor, en agitación constante a 30°C. n=3.

6.4- Obtención del gen *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 de pGEM T Easy

El gen *fadD2* había sido amplificado por PCR utilizando ADN cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1SR y clonado en el plásmido pGEM T Easy por Aguilar-López, en el 2010. Los oligos utilizados para amplificar el gen *fadD2* (materiales y métodos) le adicionaron en el extremo 5' del gen un sitio de corte para la enzima *Bam*HI y en el extremo 3' un sitio para la enzima *Hind*III (Fig. 19).

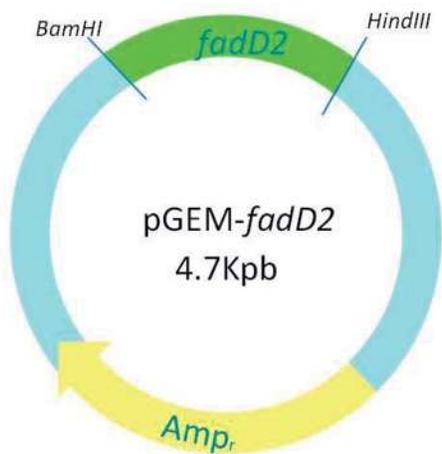


Figura 19. Plásmido pGEM-*fadD2*. Diagrama del plásmido pGEM T Easy con el gen *fadD2* clonado; Amp^r, cassette de resistencia a ampicilina.

Debido al tiempo que tenía el plásmido en el laboratorio se tuvieron que volver a transformar mediante electroporación células electrocompetentes de *E. coli* JM101 con el plásmido (mat y met), para después hacer selección de colonias resistentes a ampicilina y realizarles aislamiento de ADN plasmídico. (Fig. 20).

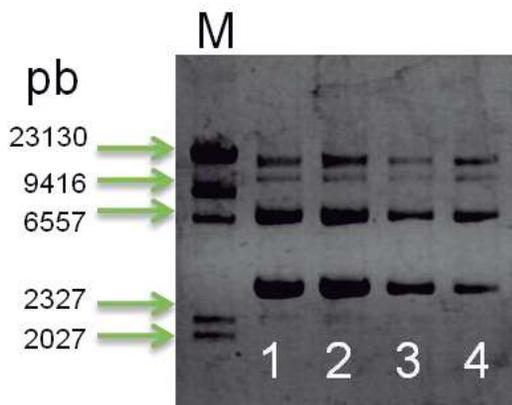


Figura 20. Aislamientos de pGEM-*fadD2*. Imagen del gel de agarosa al 1% en el que se muestra el corrimiento electroforético de los plásmidos pGEM-*fadD2* (1-4), obtenidos mediante lisis alcalina. M= marcador de tamaño molecular.

6.5- PCR del gen *fadD2* en pGEM-*fadD2*

Antes de realizar las reacciones de restricción para la obtención del fragmento de 1700 pb correspondiente al gen *fadD2* se verificó que si correspondiera al gen clonado en el plásmido pGEM-*fadD2* y por lo que se decidió realizar un PCR con el uso de los oligos y las condiciones descritas para la amplificación de *fadD2* (Fig. 21) en materiales y métodos, utilizando ADN plasmídico de pGEM-*fadD2* como molde.

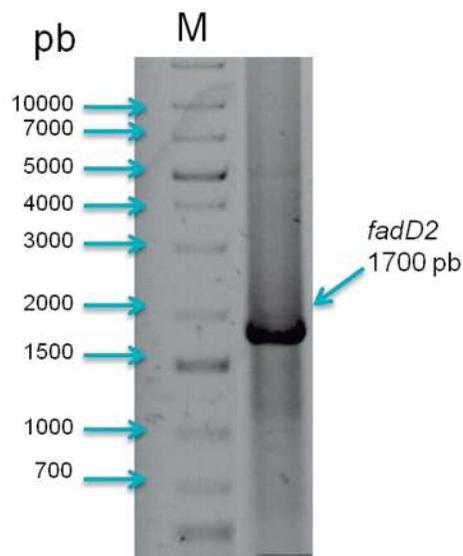


Figura 21. PCR del gen *fadD2* del plásmido pGEM-*fadD2*. Imagen del gel de agarosa al 1% en el que muestra el fragmento de 1700 pb amplificado por PCR a partir del plásmido pGEM-*fadD2* correspondiente al gen *fadD2*. M= marcador de tamaño molecular.

Se logró amplificar una banda de 1700 pb aproximadamente correspondiente con el tamaño del gen *fadD2*, por lo que se decidió seguir adelante en los siguientes procedimientos.

Posteriormente se realizaron reacciones de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III al ADN plasmídico de pGEM-*fadD2* para poder liberar el fragmento correspondiente al gen *fadD2* con un tamaño de 1700 pb (Fig. 22).

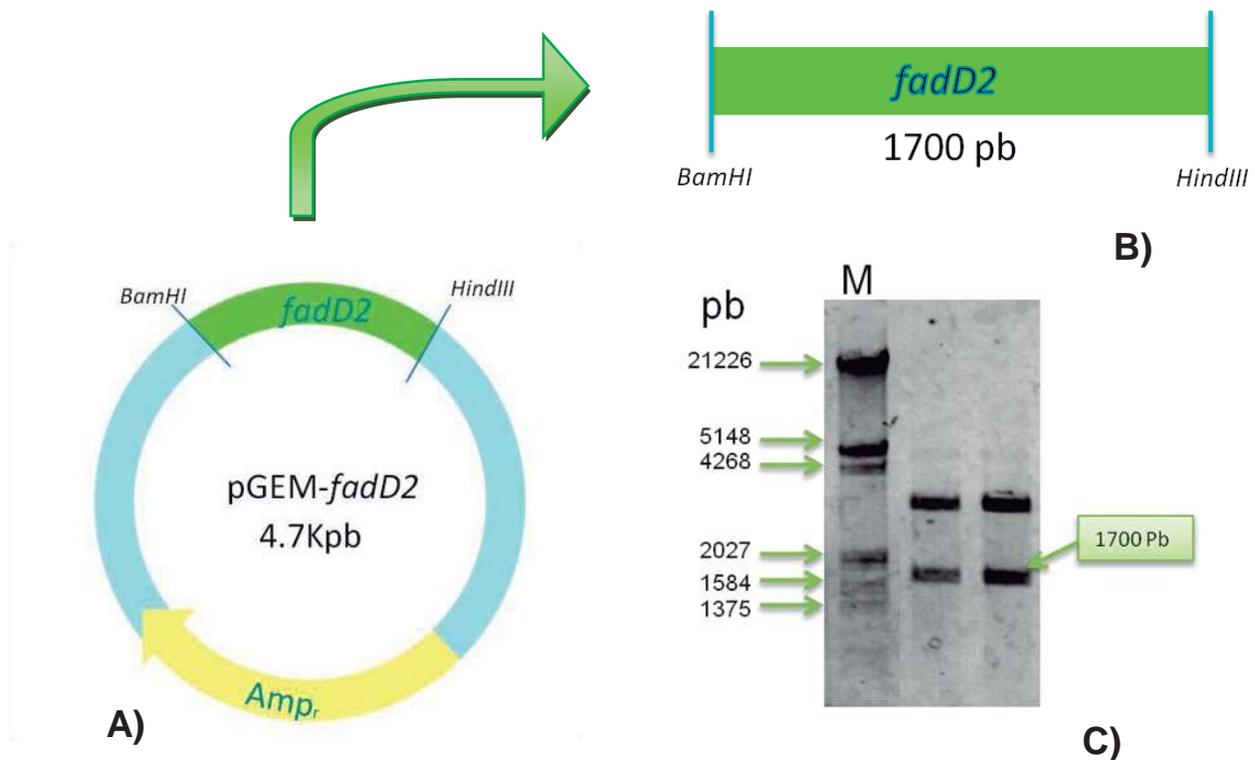


Figura 22. Liberación del gen *fadD2* del plásmido pGEM-*fadD2* para su purificación. A) Diagrama del plásmido pGEM-*fadD2*. B) Fragmento de 1700 pb correspondiente al gen *fadD2* liberado del plásmido pGEM-*fadD2* mediante las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. C) Imagen del gel de agarosa al 1% que muestra el corrimiento electroforético de las reacciones del plásmido pGEM-*fadD2* con las enzimas que liberan el fragmento que corresponde al gen *fadD2* de 1700 pb. M= marcador de tamaño molecular. Amp, cassette de resistencia a ampicilina.

Subsecuentemente se llevó a cabo la purificación del fragmento como se explica en materiales y métodos.

6.6- Subclonación del gen *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 en pTrcHis2A

Enseguida se realizó la clonación del gen *fadD2* en el plásmido de expresión pTrcHis2A mediante una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa. Mediante electroporación se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* JM 101 con el plásmido. Este plásmido le proporciona a la proteína que se está expresando una etiqueta de 6 histidinas utilizada para la purificación y detección de la proteína mediante el uso de anticuerpos específicos. Se seleccionaron varias colonias y se les realizó lisis alcalina con la cual se verificó la transformación de las células con el plásmido (Fig. 23).

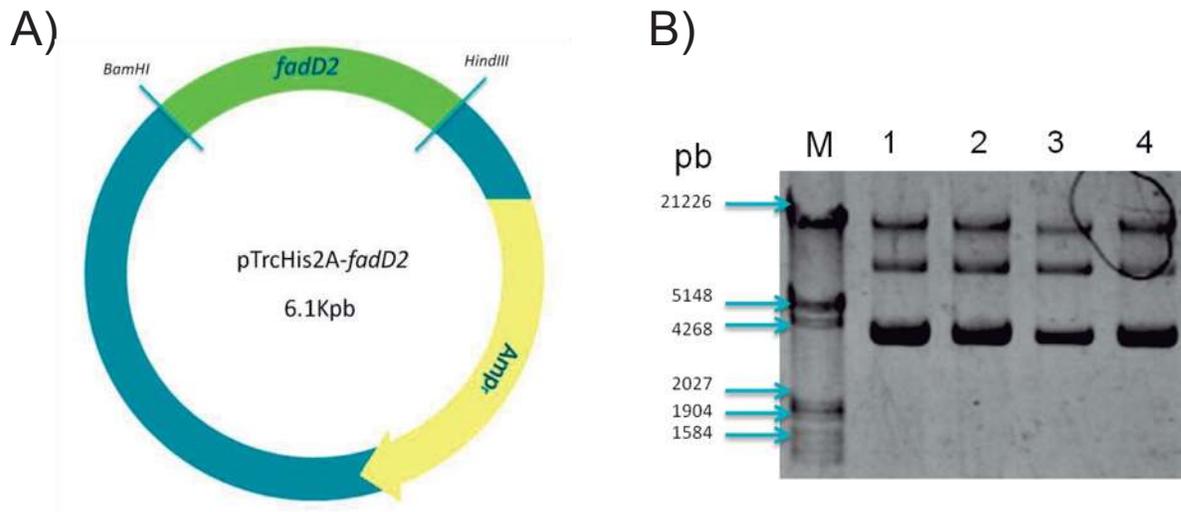


Figura 23. Plásmido pTrcHis2A-*fadD2*. A) Diagrama del plásmido pTrcHis2A-*fadD2*. B) Imagen del gel de agarosa al 1% que muestra el corrimiento electroforético del ADN plasmídico de pTrcHis2A-*fadD2* (1-4). M= marcador de tamaño molecular. Amp^r, cassette de resistencia a ampicilina.

Debido a que se tuvieron problemas con la transformación de las células de *E. coli* JM101 con el plásmido y que se obtuvieron varias clonas que resultaron ser falsas positivas se realizó al plásmido aislado de una clona elegida al azar un conjunto de restricciones con endonucleasas que permitieron fragmentar el plásmido y el gen, lo cual ayudó a la verificación de la correcta construcción del plásmido. Se realizó un análisis de la secuencia del plásmido y el gen, se obtuvieron algunas enzimas que estratégicamente lograron hacer cortes y en total se realizaron 5 reacciones de restricción que ayudaron a la verificación de la construcción del plásmido (Fig. 24).

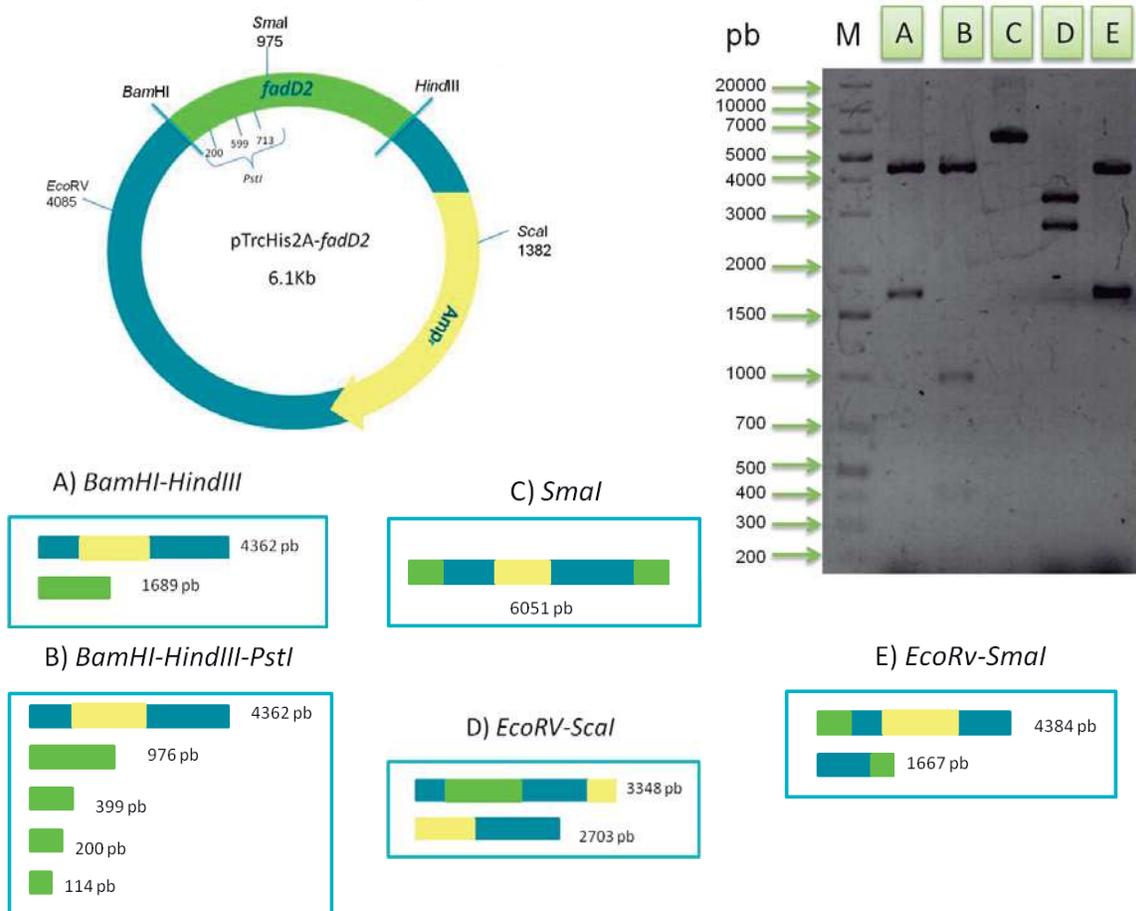


Figura 24. Serie de restricciones con enzimas que permitieron verificar la construcción del plásmido pTrcHis2A-*fadD2*. M= marcador de tamaño molecular. A) Liberación del fragmento de 1700 pb. B) Liberación del fragmento de 1700 pb y la fragmentación de éste con *PstI*. C) Linearización del plásmido. D) Corte con una enzima que corta en el sitio 4085 del plásmido y en el sitio 1382 del mismo. E) Corte con una enzima que corta en el plásmido y una enzima que corta dentro del gen.

6.7- Inducción y detección de la proteína recombinante FadD2

En total se obtuvieron 24 transformantes de *E. coli* JM101 que contenían el plásmido pTrcHis2A-*fadD2* ya verificado, de estas se eligieron 6 al azar para verificar si expresaban la proteína FadD2. Estas 6 transformantes se indujeron durante 12-14 horas con IPTG 1 mM, a 30°C en agitación constante, posteriormente se cosecharon y se rompieron las células con sonicación (mat y met). Debido a que no se sabía si la proteína se encontraba en la fracción soluble de la célula o se anclaba a la membrana se decidió usar una fracción de una clona al azar y centrifugarla, recuperándose el sobrenadante (clarificado), y el precipitado resuspendiéndolo como se describe en materiales y métodos. Enseguida se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se tiñó con solución de tinte y se destiñó por lapsos de 15 min con solución de desteñido (materiales y métodos) (Fig. 25).

Se esperaba observar una banda sobreexpresante de aproximadamente 63KDa, ya que según la secuencia que se obtuvo de la base de datos de *P. aeruginosa* PAO1 (Winsor, *et al.*, 2010) la proteína que sintetiza el gen *fadD2* tiene un peso molecular teórico de 61.737 KDa y aparte sumándole el peso molecular de las 6 histidinas extras que tiene la proteína recombinante. Sin embargo en el gel no se logró ver en ninguno de los carriles alguna banda sobreexpresante que correspondiera al peso molecular de FadD2. Debido a esto se decidió realizar un western-blot mediante el cual se detectaría la proteína por la etiqueta de 6 histidinas que ya le donó el plásmido.

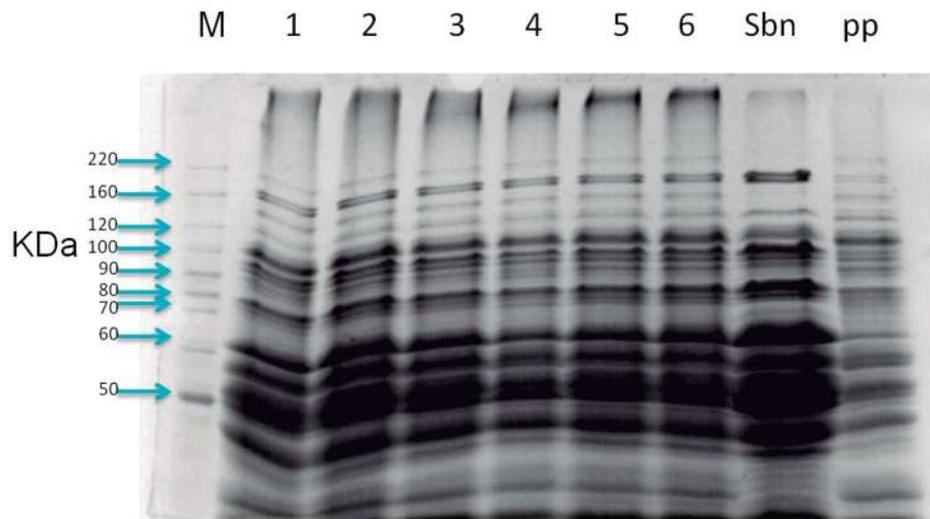


Figura 25. Imagen del gel de acrilamida SDS-PAGE al 14% de la verificación de la sobreexpresión de la proteína FadD2. (1-6) Muestras de extractos crudos de las transformantes con el plásmido pTrcHis2A-*fadD2*. (Sbn) clarificado de la muestra 6. (pp) precipitado de la misma muestra resuspendida en buffer Tris/NaCl.

Se corrió un duplicado del gen anterior con las mismas muestras y en el mismo orden para realizar el western-blot (la manera en que se realizo se describe en materiales y métodos). La imagen de la placa radiográfica del western-blot se muestra en la Fig. 26.



Figura 26. Imagen de la placa radiográfica del western-blot expuesta por 5 min con la membrana de nitrocelulosa. M= marcador de Peso Molecular (1-6) Muestras de extractos crudos de las transformantes con el plásmido pTrcHis2A-*fadD2*. (Sbn) clarificado de la muestra 6. (pp) precipitado de la misma muestra resuspendida en buffer Tris/NaCl.

El análisis western-blot reveló que en los carriles donde se corrieron sólo los extractos crudos se lograron observar dos bandas en forma de un doblete, una de la bandas corresponde al peso teórico de la proteína FadD2 (63 KDa), la banda de mayor peso (68 KDa) podría deberse a una modificación postraduccional de la proteína. Algo relevante que ocurrió en este experimento es que en el carril donde se corrió el clarificado se observa totalmente limpio, contrariamente al carril donde se corrió el precipitado de la muestra, que es donde se observa también el doblete, por lo cual se puede deducir que la proteína recombinante expresada se podría estar integrando a la membrana o bien en cuerpos de inclusión.

7- DISCUSIÓN

El estudio del gen *fadD2* de *P. aeruginosa* se realizó con el uso de mutantes por transposición en este gen, por lo que se realizó un PCR de las cepas mutantes en *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 con lo cual se corroboró la correcta mutación por transposición reportada por Jacobs y colaboradores en el 2003. Al correr el gel de agarosa con el producto de los PCR's se lograron observar las bandas que correspondían a los fragmentos esperados (7.86 Kpb y 6.53 Kpb), pero también se observaron bandas que no correspondían y de distintos tamaños, esto podría haberse debido a las condiciones en que fueron amplificados y a la falta de especificidad de los oligos utilizados, y es que debido al tamaño tan grande de los fragmentos hubo un aumento en las temperaturas de corrida que dieron pie a la amplificación de más de un fragmento de ADN como lo muestra el gel. (Fig 16).

Con éstas mutantes en el gen *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 se realizaron cinéticas de crecimiento que mostraron la probable participación de FadD2 en la degradación de compuestos 3 metil ramificados, esto debido a que las mutantes mostraron un impedimento en crecimiento al tener como única fuente de carbono el citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol), compuesto degradado en la vía superior de degradación de terpenos isoprenoides (Campos-García, 2010), mostrando la cepa silvestre un crecimiento muy por encima de las mutantes en FadD2. Ya que el citronelol es un compuesto que costa su cadena de 8 carbonos coincide con lo demostrado por Kang y colaboradores en el 2010 que al caracterizar a FadD2 en *P. aeruginosa* mostraron que tiene preferencia por ácidos grasos de cadenas medianas, mostrando FadD2 mayor actividad enzimática con ácidos grasos de 8 carbonos.

Sin embargo las mutantes si lograron utilizar el ácido isovalérico y la leucina como única fuente de carbono ya que mostraron un crecimiento a la par de la cepa silvestre, por lo cual se descarto la participación de FadD2 en la activación de compuestos que son degradados en la vía LIU de la ruta de degradación de terpenos/isoprenoides como lo mostró Campos-García en el 2010.

En las cinéticas de crecimiento en presencia de ácidos grasos de palma como única fuente de carbono se observó un comportamiento extraño en las mutantes; esta mezcla está conformada por 6 ácidos grasos de cadenas mayores a 14 carbonos y por lo descrito por Kang y col. en el 2010 se esperaba que tuvieran un crecimiento a la par de la cepa silvestre ya que tienen intacta a FadD1, pero al crecerlas con los ácidos grasos solo disueltos con calor mostraron las mutantes un crecimiento por debajo de la cepa silvestre, por lo cual se realizó una cinética alterna pero disolviendo la mezcla de ácidos grasos en un detergente, lo cual nos mostro algo muy distinto ya que las cepas mutantes si crecieron a la par con la cepa silvestre. Esto podría indicar que al disolver los ácidos grasos con un detergente quedan más expuestos a la degradación y por lo tanto es más fácil para las mutantes degradarlos, sin embargo al colocar la mezcla solo disuelta con calor forma grumos en el medio que impiden a las mutantes degradarlos en su totalidad. Lo cual coincide con los resultados de Kang y colaboradores en el 2010 que mostraron la preferencia de sustratos de FadD2 por ácidos grasos de cadenas medianas a cortas y de FadD1 por ácidos grasos de cadenas largas, lo cual indicaría que FadD1 es la enzima que está llevando a cabo la degradación de éstos ácidos grasos siendo esta la enzima que tienen intacta las mutantes usadas en el experimento.

Alternamente se realizó la construcción del plásmido pTrcHis2A-*fadD2* el cual posee una región de 18 nucleótidos que codifica para 6 histidinas y que al sintetizarse la proteína se unen a ella, lo cual ayuda a su detección y purificación. El gen *fadD2* fue extraído del plásmido pGEM-*fadD2*, al cual se le realizó un PCR para amplificar a *fadD2* a manera de corroborar al gen logrando amplificar una banda de 1700pb correspondiente con el tamaño del gen *fadD2* con lo quedo verificado. Ya con el uso de pTrcHis2A-*fadD2* fue posible detectar mediante un western-blot la proteína recombinante FadD2. Se observaron en la placa un doblete de bandas que corresponderían a FadD2, se observa una banda de 63 KDa correspondiente con el peso teórico reportado, sin embargo se observó también una banda de aproximadamente 68KDa que podría deberse a una

probable modificación postraducciona de FadD2; de mayor relevancia es que es detectada solamente en la parte insoluble de la célula, lo cual no coincide con lo reportado por Kang y colaboradores en el 2010 ya que ellos reportaron su detección en la parte soluble de la célula y una sola banda de 61.737 KDa. Debido a que FadD2 es detectada en la parte insoluble de la célula, es posible que al sintetizarse se redirija a la membrana de la célula o que esté formando cuerpos de inclusión que provoquen que no sea detectada a FadD2 en la parte soluble de la célula.

Este trabajo es de relevancia ya que en la actualidad aún no existe el reporte de que FadD1 o FadD2 tengan participación en la activación de compuestos 3-metil ramificados y este trabajo da un indicio a que en efecto, FadD2 si participe activando este tipo de compuestos.

8- CONCLUSIONES

- El producto del gen *fadD2* de *P. aeruginosa* PAO1 que codifica para una acil-CoA sintetasa participa en el catabolismo de compuestos 3-metil ramificados.
- Se logró la detección de la proteína FadD2 (63 KDa) y mostrando que probablemente se dirige a membrana y que sufre una probable modificación postraduccional.

9- REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Aguilar CL, Moreira MR y De Castro HF.** Alcoholysis of citronellyl butyrate catalyzed by lipase to produce citronellol. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*. 2001; 3:134-139.
- **Aguilar-Barajas ME.** Análisis funcional de homólogos bacterianos de la súper familia CHR [tesis doctoral]. Morelia: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas; 2010.
- **Aguilar JA, Zavala AN, Díaz-Pérez C, Cervantes C, Díaz-Pérez AL, Campos-García J.** The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 2070–2079.
- **Aguilar JA, Díaz-Pérez C, Díaz-Pérez AL, Rodríguez-Zavala JS, Nikolau BJ, Campos-García J.** Substrate specificity of the 3-methylcrotonyl Coenzyme A (CoA) and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2008; 190: 4888–4893.
- **Aguilar JA.** 2010. Doctor en Ciencias Biológicas. (Comunicación personal, 10 de octubre de 2010).
- **Black PN, DiRusso CC, Metzger AK, Heimert TL.** Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 25513-25520.
- **Campos-García J.** Metabolism of Acyclic Terpenes by *Pseudomonas*. En: Ramos JL, Filloux A, Editores. *Pseudomonas*. Dordrecht, Holanda. Edit. Springer; 2010. p. 235-253.
- **Cantwell SG, Lau EP, Watt DS, Fall RR.** Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology*. 1978; 135:324-333.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Chavez-Aviles M, Diaz-Perez AL, Reyes-de la Cruz H, Campos-Garcia J.** The *Pseudomonas aeruginosa liuE* gene encodes the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase, involved in leucine and acyclic terpenes catabolism. *FEMS Microbiology Letters*. 2009; 296:117–123.
- **Chavez-Aviles M, Díaz-Pérez AL, campos-García J.** The bifunctional role of LiuE from *Pseudomonas aeruginosa*, displays additionally HIHG-CoA lyase enzymatic activity. *Molecular Biology Reports*. 2010; 37:1787-1791.
- **Cox MM, Nelson DL.** *Lehninger: principios de bioquímica*. 5ta ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2009.
- **Díaz-Pérez AL, Zavala-Hernández AN, Cervantes C, Campos-García J.** The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70:5102-5110.
- **Fall RR, Brown JL, Schaeffer TL.** Enzyme Recruitment Allows the Biodegradation of Recalcitrant Branched Hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1979; 38:715-722.
- **Jacobs M A, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, et al.** Comprehensive transposón mutant library of *pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100:14339–14344.
- **Kang Y, Zarzycki-Siek J, Walton CB, Horris MH, Hoang TT.** Multiple FadD acyl-Coa synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. 2010; 5:1-17.
- **Korchak HM, Kane LH, Rossi MW, Corkey BE.** Long chain acyl coenzyme A and signaling in neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 30281-30287.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Madigan MT, Martinko JM, Parker J.** Brock Biología de los microorganismos. 10ma ed. Madrid: Prentice Hall; 2004.
- **Peña A, Arroyo A, Gómez A, Tapia R.** Los lípidos. En: Peña A, Arroyo A, Gómez A, Tapia R, editores. Bioquímica. 2da ed. México D.F. Limusa; 2004. p. 105-124.
- **Pirnik, M. P., R. M. Atlas y R. Bartha.** Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. Journal of Bacteriology. 1974; 119:868-878.
- **Pirnik, M. P. y E. J. McKenna.** Microbial oxidation of methyl branched alkanes. Critical Reviews in Microbiology. 1977; 413-422.
- **Ruth K, Guy de Roo, Egli T, Ren Q.** Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. Biomacromolecules. 2008; 9:2811-2818.
- **Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y. 1989.
- **Seubert, W.** Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. Journal of Bacteriology. 1959; 79: 426–434.
- **Sikkema J, M. de Bont JA, Poolman B.** Mechanisms of membrane Toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews. 1995; 59: 201-222.
- **Rojo F.** Degradation of alkanes by bacteria. Environmental Microbiology. 2009; 11: 2477-2490.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Solanas AM.** La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Estudios en la Zona no Saturada del Suelo. 2009; 9: 1-8.
- **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, P. Warrenner, M. J. Hickey, et al.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000; 406: 959-964.
- **Tozoni D, Zacaria J, Vanderlinde R, Longaray AP, Echeverrigaray S.** Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. Electronic Journal of Biotechnology. 2010; 13:1-7.
- **Voet D, Voet JG, Pratt CW.** Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular. 2da ed. Buenos Aires: Panamericana; 2007.
- **Winsor GL, Dam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, et al.** *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. Nucleic Acids Research. 2010; 39: D596-D600.
- **Wong SM y Mekalanos JJ.** Genetic footprinting with *mariner*-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97:10191-10196.
- **Yanish-Perron C, Vieira J y Messing Y.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13 pUC18 and pUC19 vectors. Gene 1985; 33:103-109.