



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO – BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

**“Identificación de la isoprenoil-CoA sintetasa de *Pseudomonas
aeruginosa* PAO1 involucrada en la degradación de isoprenoides
acíclicos”**

TESIS

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

**ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
I.BQ. PERLA GUADALUPE MENDOZA PRECIADO**

**ASESOR:
D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA**

MORELIA, MICHOACÁN, MAYO 2013

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA Y EL APOYO TÉCNICO DE LA M.C. ALMA LAURA DÍAZ PÉREZ.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al D.C. Jesús Campos García por su asesoría y paciencia durante la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial: D.C. Carlos Cervantes Vega, D.C. Eduardo Valencia Cantero, D.C. Gustavo Santoyo Pinzano y D. C. Mauro Manuel Martínez Pacheco por sus aportaciones a este proyecto.

A la M.C. Alma Laura Díaz Pérez por su contribución durante el trabajo experimental.

**RECUERDA QUE CUALQUIER MOMENTO ES BUENO PARA COMENZAR
Y QUE NINGUNO ES TAN TERRIBLE PARA CLAUDICAR.**

**NO OLVIDES QUE TU PRESENTE ES TU PASADO, ASÍ COMO LA CAUSA
DE TU FUTURO SERÁ TU PRESENTE.**

**APRENDE DE LOS AUDACES, DE LOS FUERTES, DE QUIEN NO ACEPTA
SITUACIONES, DE QUIEN VIVIRÁ A PESAR DE TODO.**

**PIENSA MENOS EN TUS PROBLEMAS Y MÁS EN TU TRABAJO Y TUS
PROBLEMAS SIN ALIMENTARLOS MORIRÁN.**

**APRENDE A NACER DESDE EL DOLOR Y A SER MÁS GRANDE QUE EL
MÁS GRANDE DE LOS OBSTÁCULOS.**

PABLO NERUDA

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a las personas que han inspirado mi vida, a mi madre y a la memoria de mi padre y hermano.

RESUMEN

El citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) es un hidrocarburo β -metil ramificado, compuestos considerados persistentes a los mecanismos degradativos de origen bacteriano y ha sido usado como compuesto modelo para el estudio de la degradación de isoprenoides acíclicos. El catabolismo de isoprenoides acíclicos se ha dilucidado en detalle en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, cuyos genes involucrados se han identificado en los operones *atuRABCDEFGH* y *liuRABCDE* (Díaz-Pérez *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2006; 2008). Un paso crítico en esta vía degradativa corresponde a la activación del sustrato acilado precursor, el cual es llevado a cabo por la citronelil-CoA sintetasa. Recientemente se identificaron y caracterizaron las acil-CoA sintetasas FadD1 y FadD2 involucradas en el catabolismo de ácidos grasos en *P.aeruginosa* (Kang *et al.*, 2010). Sin embargo, no se describió si las enzimas FadD1 y FadD2 son capaces de utilizar como sustrato a los precursores de la vía catabólica de isoprenoides acíclicos (ácidos citronélico y geránico). Este estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar la isoprenoil-CoA sintetasa de *P. aeruginosa* involucrada en el catabolismo de isoprenoides acíclicos. Los genes *fadD1*, *fadD2* y el ORF PA1617, denominado *fadD3* se propusieron como genes que participan en la degradación de isoprenoides acíclicos mediante análisis bioinformático con las secuencias de aminoácidos de la acil-CoA sintetasa de *Escherichia coli* y acil-CoA sintetasas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* incluyendo la acil-CoA sintetasa capaz de activar isoprenoides acíclicos. La proteína FadD3 mostró los motivos de unión a ATP/AMP y de unión a ácidos grasos, motivos característicos de las acil-CoA sintetasas. Al realizar crecimiento en placa y cinéticas de crecimiento utilizando isoprenoides acíclicos como única fuente de carbono y energía de las mutantes simples en los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3*, y mutantes dobles en los genes *fadD1-fadD3*, *fadD2-fadD3* y *fadD1-fadD2* se encontró que éstas afectaron la capacidad de utilizar isoprenoides acíclicos. Sin embargo, las mutantes dobles *fadD1-fadD3*, *fadD2-fadD3* y la mutante *fadD3* se encontró que éstas fueron incapaces de asimilar los isoprenoides acíclicos como fuentes de carbono y energía.

El gen *fadD3* fue clonado en un vector de expresión y la expresión de la enzima se detectó mediante western blot. La actividad enzimática de FadD3 fue determinada en extractos crudos, la enzima FadD3 fue activa con sustrato ácido citrónico, ácido geránico, ácido isovalérico y ácidos grasos. Los resultados obtenidos permiten concluir que los productos proteicos de los genes *fadD1*, *fadD2* y del ORF PA1617 nombrado como el gen *fadD3*, participan en la activación de ácidos isoprenoicos de la vía degradativa de isoprenoides acíclicos, siendo el gen *fadD3* esencial en dicha vía ya que codifica una isoprenoil-CoA sintetasa.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	6
2.1 Vía catabólica general de isoprenoides acíclicos de <i>P. aeruginosa</i>	9
2.1.1 Vía superior de oxidación-activación	11
2.2 Acil-CoA sintetasas	12
2.2.1 Clasificación de las acil-CoA sintetasas por la longitud de la cadena hidrocarbonada del sustrato preferente	14
2.3 Motivo de unión a ATP/AMP de la acil-CoA sintetasa de <i>E. coli</i>	14
2.4 Motivo de unión a ácidos grasos de la acil-CoA sintetasa de <i>E. coli</i>	16
2.5 Identificación y caracterización de FadD1 y FadD2 en <i>P. aeruginosa</i>	19
2.6 Identificación y caracterización de acil-CoA sintetasas en <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Cepas y plásmidos	26
6.1.1 Mapas de los plásmidos	29
6.2 Medios de cultivo	34
6.3 Procedimientos con DNA	35
6.3.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina.....	35
6.3.2 Electroforesis en geles de agarosa.....	36
6.3.3 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	36

6.3.4 Aislamiento de ADN total (cromosómico) de <i>P. aeruginosa</i>	37
6.3.5 Transformación por electroporación	38
6.3.5.1 Preparación de células electrocompetentes	38
6.3.5.2 Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	38
6.4 Procesos enzimáticos	39
6.4.1 Restricción de ADN con endonucleasas	39
6.4.2 Ligación de ADN	39
6.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
6.5 Procedimientos para la generación y caracterización de mutantes	40
6.5.1 Conjugación triparental en <i>P. aeruginosa</i>	40
6.5.2 Crecimiento de las mutantes en diferentes fuentes de carbono	41
6.5.3 Cinéticas de crecimiento de las mutantes en diferentes fuentes de carbono	41
6.6 Procedimientos para la caracterización de FadD3-His	42
6.6.1 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford	42
6.6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	42
6.6.3 Inmunodetección de la proteína FadD3-His	43
6.6.3.1 Revelado	44
6.6.4 Rastreo del tiempo de inducción de la proteína FadD3-His	44
6.6.5 Obtención de extractos crudos libres de células	45
6.6.6 Purificación de la proteína FadD3-His por cromatografía de afinidad	45
6.6.7 Determinación de la actividad enzimática	46
6.6.7.1 Curva de calibración con acetato de etilo	47
6.6.7.2 Método de revelado	47
6.6.7.3 Ensayo enzimático	47
6.7 Procedimientos bioinformáticos	48
6.7.1 Análisis BLAST	48
6.7.2 Alineamientos de secuencias	48
6.7.3 Identificación de región promotora	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Identificación del gen que codifica la proteína FadD3 mediante análisis bioinformático ...	49
7.1.1 Contexto genómico del ORF PA1617 en el genoma de <i>P. aeruginosa</i>	53

7.2 Determinación de la participación de los genes <i>fadD1</i>, <i>fadD2</i> y <i>fadD3</i> en el metabolismo de isoprenoides acídicos mediante mutantes simples y dobles	55
7.2.1 Obtención de las mutantes <i>fadD3</i> R, <i>fadD1-fadD3</i> y <i>fadD2-fadD3</i> por recombinación homóloga	56
7.2.2 Obtención de la doble mutante <i>fadD1-fadD2</i> por recombinación homóloga	62
7.2.3 Crecimiento de las mutantes en los genes <i>fadD3</i> , <i>fadD2</i> y <i>fadD1</i> en diferentes fuentes de carbono	68
7.2.4 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en los genes <i>fadD</i>	70
7.2.4.1 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en los genes <i>fadD</i> en citronelol	70
7.2.4.2 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en los genes <i>fadD</i> en ácido citronélico	71
7.2.4.3 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en los genes <i>fadD</i> en ácido isovalérico	73
7.2.4.4 Parámetros de crecimiento de las mutantes que utilizaron como fuente de carbono y energía citronelol, ácido citronélico y ácido isovalérico	74
7.2.4.5 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en los genes <i>fadD</i> en ácidos grasos de aceite de aguacate	75
7.2.4.6 Parámetros de crecimiento de las mutantes que utilizaron como fuente de carbono y energía aceite de aguacate.....	76
7.3 Expresión de la proteína FadD3 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	77
7.3.1 Clonación de <i>fadD3</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	77
7.3.2 Subclonación del gen <i>fadD3</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	78
7.3.3 Determinación del tiempo de inducción de la proteína FadD3-His	82
7.4 Determinación de la actividad de la proteína FadD3-His.....	85
7.4.1 Purificación de FadD3-His mediante cromatografía de afinidad.....	85
7.4.2 Determinación de la actividad de la proteína FadD3-His	86
8. DISCUSIÓN	89
9. CONCLUSIONES	99
10. REFERENCIAS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía aerobia de degradación de <i>n</i> -alcanos.....	3
Figura 2. Estructura del citronelol.....	4
Figura 3. Vía para la degradación de isoprenoides acíclicos con C ₁₀ en <i>P. citronellolis</i>	7
Figura 4 Operones homólogos <i>atu</i> y <i>liu</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	8
Figura 5 Etapas generales que comprende la vía catabólica de isoprenoides acíclicos en especies de <i>Pseudomonas</i>	10
Figura 6 Reacciones y enzimas propuestas de la vía superior de oxidación-activación de isoprenoides acíclicos.....	11
Figura 7. Mecanismo de reacción de las acil-CoA sintetetas.....	13
Figura 8. Alineamiento del motivo unión ATP/AMP de miembros de la superfamilia formadora de adenilatos..	15
Figura 9. Alineamiento del motivo unión a ácidos grasos de acil-CoA sintetetas de ácidos grasos y enzimas formadoras de adenilatos.....	17
Figura 10. Actividad de las mutantes de acil-CoA sintetetas.....	18
Figura 11. Alineamientos de los motivos de unión a ATP/AMP y de unión a ácidos grasos de FadD1, FadD2 de <i>P. aeruginosa</i> y de FadD de <i>E. coli</i>	19
Figura 12. Vía de degradación de ácidos grasos en <i>P. aeruginosa</i> basados en el modelo de oxidación β en <i>E. coli</i>	20
Figura 13 Caracterización bioquímica de las FadD1 y FadD2 de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figura 14. Diagrama del vector pGEM-T-Easy utilizado para la clonación del gen <i>fadD3</i>	29
Figura 15. Diagrama del vector pTrcHis2A utilizado para la subclonación del gen <i>fadD3</i>	30
Figura 16. Diagrama del vector pCFDuet utilizado para la subclonación del gen <i>fadD3</i>	31
Figura 17. Diagrama del plásmido virtual pBS141..	32
Figura 18 Diagrama del vector pKOK4 utilizado para la clonación de <i>fadD3::Gm^R</i> en <i>E. coli</i>	33
Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las acil-CoA sintetetas de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (Acs2), el producto del ORF PA1617, FadD1 y FadD2 de <i>P. aeruginosa</i>	53
Figura 20. Contexto genómico del ORF PA1617.....	54
Figura 21. Secuencia de la región intergénica entre los ORFs PA1616 y PA1617 de <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 22. Ubicación del transposón en las mutantes en los genes <i>fadD1</i> , <i>fadD2</i> y <i>fadD3</i> de <i>P. aeruginosa</i>	56
Figura 23. Estrategia experimental para la obtención del plásmido pGEM-T Easy- <i>fadD3::Gm^R</i> ..	57
Figura 24. Análisis de restricción del plásmido pGEM-T Easy- <i>fadD3::Gm^R</i>	58
Figura 25. Estrategia experimental para la obtención del plásmido pKOK4- <i>fadD3::Gm^R</i>	59
Figura 26. Análisis de restricción del plásmido pKOK4- <i>fadD3::Gm^R</i>	60

Figura 27. Verificación de la interrupción con el cassette de resistencia a gentamicina en el gen <i>fadD3</i> mediante PCR.....	62
Figura 28. Estrategia experimental para la obtención del plásmido pTrcHis2- <i>fadD2</i> ::Gm ^R	64
Figura 29. Análisis de restricción pTrcHis2A- <i>fadD2</i> ::Gm ^R . <i>mHI</i> e <i>HindIII</i>	64
Figura 30. Esquema de la estrategia experimental para la obtención del plásmido pKOK4- <i>fadD2</i> ::Gm ^R	66
Figura 31. Análisis de restricción pKOK4- <i>fadD2</i> ::Gm ^R	67
Figura 32. Verificación de la interrupción en el gen <i>fadD2</i> con el cassette de Gm ^R mediante PCR.....	68
Figura 33. Cinéticas de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en los genes <i>fadD</i> en citronelol.....	71
Figura 34. Cinética de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en ácido citronélico.	72
Figura 35. Cinética de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en ácido isovalérico.....	73
Figura 36. Cinética de crecimiento de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en aceite de aguacate.....	75
Figura 37. Amplificación y clonación del gen <i>fadD3</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	78
Figura 38. Subclonación del gen <i>fadD3</i> en pTrcHis2A para la sobre-expresión de la proteína FadD3.....	80
Figura 39. Subclonación del gen <i>fadD3</i> en pCFDuet para la sobre-expresión de la proteína FadD3.....	81
Figura 40. Rastreo de proteína FadD3 del cultivo de <i>E. coli</i> transformada con el plásmido pTrcHis2A- <i>fadD3</i>	83
Figura 41. Rastreo de proteína FadD3 del cultivo de <i>E. coli</i> transformada con el plásmido pCFDuet- <i>fadD3</i>	84
Figura 42. Purificación de la enzima FadD3-His de <i>P. aeruginosa</i> expresada en <i>E. coli</i> transformada con pTrcHis2A- <i>fadD3</i>	85
Figura 43. Curva de calibración para la determinación de ésteres.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Compuestos orgánicos que pueden ser degradados por bacterias	2
Tabla II. Expresión y actividad de mutantes de acil-CoA sintetasas	16
Tabla III. Propiedades cinéticas de FadD1 y FadD2 de <i>P. aeruginosa</i> con varios sustratos	22
Tabla IV. Acil-CoA sintetasas de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	23
Tabla V. Cepas empleadas en el presente trabajo	26
Tabla VI. Plásmidos utilizados en el presente trabajo	27
Tabla VII. Curva estándar de BSA.....	42
Tabla VIII. Acil-CoA sintetasas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 homólogas a FadD de <i>E. coli</i>	50
Tabla IX. Comparación de posibles acil-CoA sintetasas de <i>P. aeruginosa</i> con las acil-CoA sintetasas de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	51
Tabla X. Crecimiento de mutantes de <i>P. aeruginosa</i> con diferentes fuentes de carbono	69
Tabla XI. V_{max} y T_D de las cinéticas de crecimiento de mutantes en citronelol, ácido citronélico y ácido isovalérico	74
Tabla XII. V_{max} y T_D de las cinéticas de crecimiento de mutantes en aceite de aguacate.....	76
Tabla XIII. Actividad enzimática con los extractos crudos de las cepas de <i>E. coli</i> sobre-expresantes de FadD3-His	87
Tabla XIV. Actividad enzimática con extractos crudos de la cepa de <i>E. coli</i> transformada con pCFDuet- <i>fadD3</i>	88

1.- INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por átomos de carbono e hidrógeno, no polares; en consecuencia, son casi completamente insolubles en agua, pero se disuelven fácilmente en disolventes no polares. Además, los hidrocarburos tienden a ser menos volátiles al aumentar su peso molecular, debido a las interacciones débiles dipolo-dipolo. Los compuestos hidrocarbonados son clasificados, de acuerdo a su estructura, en alifáticos y aromáticos. Los hidrocarburos alifáticos de acuerdo al tipo de enlace, son clasificados en alcanos, alquenos y alquinos, los cuales a su vez pueden ser lineales, cíclicos o ramificados (Brown *et al.*, 1993; Chang y College, 2003).

Las bacterias de metabolismo versátil son capaces de utilizar alcanos como fuente de carbono, además de otros compuestos, sin embargo, los alcanos no son la fuente de carbono preferencial de estos microorganismos. Por otro lado, existen bacterias altamente especializadas en la degradación de hidrocarburos, las cuales son llamadas bacterias hidrocarbonoclásticas; ejemplos son encontrados en los géneros *Alcanivorax*, *Thalassolituus*, *Oleiphilus* y *Oleispira*. De particular interés ha sido *Alcanivorax borkumensis*, una bacteria que puede asimilar alcanos lineales y ramificados, pero es incapaz de metabolizar hidrocarburos aromáticos, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y otras fuentes de carbono comunes. En la Tabla I, se muestran ejemplos de bacterias que tienen la capacidad de utilizar como fuente de carbono y energía compuestos hidrocarbonados, incluyendo compuestos alifáticos y aromáticos, además de una variedad de derivados de hidrocarburos.

Tabla I Compuestos orgánicos que pueden ser degradados por bacterias

Compuesto	Bacteria degradadora	Referencia
Pristano	<i>Brevibacterium erythrogenes</i>	Pirnik <i>et al.</i> , 1974
n-octanol	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Witholt <i>et al.</i> , 1990
Naftaleno	<i>Pseudomonas putida</i> G7	Grimm y Harwood, 1999
Dodecilbenceno sulfonato ramificado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> W51D	Campos-García <i>et al.</i> , 1999
β -mirceno	<i>Pseudomonas</i> sp. M1	Iurescia <i>et al.</i> , 1999
Ácidos n-alcanoicos y fenilacanoicos	<i>Pseudomonas putida</i> U	Olivera <i>et al.</i> , 2000
Alcanos	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Schneiker <i>et al.</i> , 2006
Ácido fitánico	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Holtzapple y Schmidt-Dannert, 2007

Un ejemplo de la vía de degradación aerobia de n-alcanos se muestra en la Figura 1. La oxidación inicia usualmente en el grupo metilo terminal para producir el alcohol primario, el cual es oxidado al aldehído y finalmente es convertido a un ácido carboxílico; finalmente éste será activado mediante una acil-CoA sintetasa e incorporado a oxidación β .

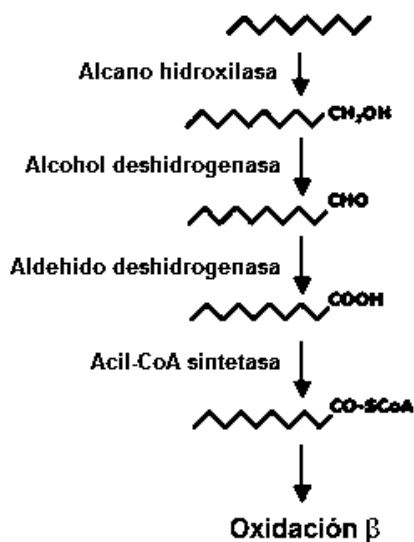


Figura 1. Vía aerobia de degradación de *n*-alcanos. Los compuestos hidrocarbonados son degradados por los sistemas biológicos predominantemente vía la oxidación inicial de un grupo metilo terminal hasta un ácido carboxílico y posteriormente incorporado a oxidación β , la cual es la ruta responsable de de la asimilación de ácidos grasos y es encontrada en un gran número de organismos (modificado de Rojo, 2009).

Los alcanos β -metil ramificados son menos susceptibles de ser biodegradados y ciertas ramificaciones alquilo pueden causar persistencia de estos compuestos en el ambiente. Generalmente si la alquil ramificación está localizada cerca del extremo terminal disminuye la biodegradabilidad, lo cual podría deberse a la inhibición estérica de las enzimas oxidantes. En los alcanos β -metil ramificados esta substitución evita su incorporación a la oxidación β (Schaeffer *et al.*, 1979). En contraste, los alcanos 2-metil ramificados no presentan este impedimento y por lo tanto pueden ser metabolizados mediante esta vía (Díaz-Pérez y Campos-García, 2012).

Ejemplos de alcanos β metil ramificados son encontrados en la familia de compuestos denominada isoprenoides. Los isoprenoides son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos formado por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo ramificado de cinco átomos de carbono. Los isoprenoides se dividen en terpenos y terpenoides; los primeros están formados por carbono e hidrógeno, mientras que los segundos contiene un grupo funcional adicional que contiene oxígeno (Díaz-Pérez y Campos-García, 2012). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y proceden principalmente de las plantas, donde tienen un papel funcional y estructural que se ve reflejado en importantes funciones fisiológicas y ecológicas. Los terpenos se sintetizan a través de la vía del mevalonato y de la vía plastídica del 2-C-metil-D-eritrio-4-fosfato (MEP), (Díaz-Pérez y Campos-García, 2012).

Los isoprenoides β metil ramificados son comúnmente tóxicos para los microorganismos por tener fácil entrada e intercalación en la membrana citoplasmática, causando modificaciones en sus propiedades, inestabilizándola y causando lisis celular (Pedrotta y Witholt, 1999; Campos-García, 2010). El citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) está compuesto de

dos unidades de isopreno (Figura 2). Los isoprenoides del tipo del citronelol son clasificados dentro del grupo de los alquenos 3-metil ramificados, caracterizados por su baja biodegradabilidad causada por la incapacidad de las enzimas de la oxidación β para reconocer como sustratos compuestos con el grupo metilo sobre el carbono β (radical 3-metilo). Por ésta razón el citronelol se ha utilizado como modelo para el estudio del catabolismo de este tipo de compuestos. El catabolismo del citronelol por microorganismos capaces de degradar isoprenoides puede guiar a la degradación de hidrocarburos recalcitrantes, debido a la 3-metil ramificación presente en este compuesto. El geraniol (3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) es un compuesto estructuralmente relacionado al citronelol, difiere solo por la presencia de un doble enlace adicional en el carbono α . La degradación del citronelol ocurre en ciertas especies del género *Pseudomonas*, incluyendo *Pseudomonas citronellolis*, *P. mendocina* y *P. aeruginosa* (Cantwell *et al.*, 1978).

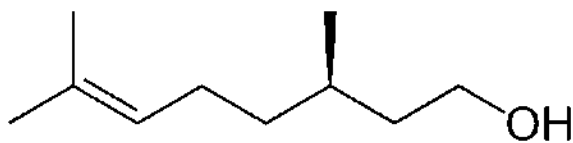


Figura 2. Estructura del citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol). El citronelol es un alcohol insaturado que tiene una ramificación sobre el carbono β , es un líquido aceitoso, altamente volátil, poco soluble en agua y miscible en alcohol y éter.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa, aeróbica con motilidad unipolar pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*; orden Pseudomonadales; clase, Gamma Proteobacteria; filo, Proteobacteria. Esta bacteria presenta una gran versatilidad bioquímica y es considerada ubicua ya que se ha encontrado en suelo, en pantanos, en hábitats marinos, en tejidos animales y vegetales. La secuencia del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 se completó en el 2000, cuenta con 6.3 millones de pares de bases, su contenido de G+C es de 66.6% y posee 5,570 marcos abiertos de lectura (ORFs por sus siglas en inglés, open reading frames), de los cuales 89.4% son regiones codificantes. Entre los genomas secuenciados es considerado como un genoma de procariontes de tamaño grande comparado con, por ejemplo, *Mycoplasma genitalium*, 0.6 Mpb; *Borrelia burgdorferi*, 1 Mpb; *Escherichia coli*, 4.6 Mpb. Aunque es de

tamaño similar a *Pseudomonas putida* KT2440, 6.18 Mpb y *Pseudomonas fluorescens* F113 6.85 Mpb; y de menor tamaño que *Streptomyces coelicolor*, 8.3 Mpb y *Myxococcus xanthus*, 9.4 Mpb. El gran tamaño del genoma y la complejidad genética de *P. aeruginosa* refleja la capacidad de adaptación evolutiva que le ha permitido a esta especie bacteriana prosperar en diversos nichos ecológicos. Esta característica sugiere que *P. aeruginosa* posee una gran diversidad génica y consecuentemente metabólica. Respecto a otras bacterias, *P. aeruginosa* PAO1 presentó 468 genes con motivos característicos de reguladores transcripcionales o sensores ambientales; esto implica que 8.4% de los genes de esta bacteria están implicados en la regulación, lo que le permite a este organismo responder y adaptarse eficientemente a cambios del ambiente. Consistente con su variabilidad ambiental, *P. aeruginosa* tiene cerca de 300 sistemas transportadores localizados en la membrana citoplasmática, de los cuales cerca de dos terceras partes parecen estar involucrados en la importación de nutrientes. Además de las vías y enzimas oxidativas conocidas, fueron encontrados 25 genes que codifican para probables acil-CoA deshidrogenasas y 16 genes más que codificarían para enoil-CoA hidratasas/isomerasas. Ambas clases de enzimas podrían formar parte de la oxidación β ; en comparación, *E. coli* sólo tiene 4 genes para acil-CoA deshidrogenasas y 7 para enoil-CoA hidratasas/isomerasas (Stover *et al.*, 2000).

Por otro lado, *P. aeruginosa* ha sido estudiada por ser un patógeno oportunista de humanos responsable de numerosas infecciones incluyendo bacteremia grave y neumonía nosocomial, además de ser la principal causa de morbilidad y mortalidad entre pacientes con fibrosis quística entre los 18 y 24 años de edad (Kang *et al.*, 2010). La secreción de numerosos compuestos tóxicos y enzimas hidrolíticas se han correlacionado con su patogenicidad, estos exoproductos incluyen diferentes proteasas, fosfolipasa C, exotoxina A, piocianina y ramnolípidos (Campos-García *et al.*, 1998). Además esta bacteria, ha sido objeto de estudio por aplicación en procesos de biorremediación, ya sea mineralizando o biotransformando compuestos contaminantes (Campos-García *et al.*, 1999; Díaz-Pérez *et al.*, 2004).

2.- ANTECEDENTES

El estudio de la vía de degradación del citronelol inició en 1960 cuando Werner Seubert aisló de muestras de suelo un microorganismo, al cual clasificó dentro del género *Pseudomonas* y lo nombró *P. citronellolis*, por su capacidad de utilizar citronelol como única fuente de carbono y energía. Esta bacteria también fue capaz de crecer en otros compuestos relacionados tales como farnesol, ácido citronélico, ácido geránico y ácido isovalérico, entre otros (Seubert, 1960). Muchos de los detalles de la vía catabólica del citronelol fueron dilucidados por Seubert y colaboradores (Figura 3), sin embargo, las reacciones intermedias quedaron sin resolver. La vía involucra al menos dos enzimas: la geranyl-CoA carboxilasa, una enzima análoga a la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (la cual participa en el catabolismo de la leucina) actuando como un activador del grupo metilo de la posición β del sustrato vía carboxilación, y la 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA (HIHG-CoA) liasa la cual catalizaría la remoción del grupo β -carboximetilo activado, generándose un sustrato viable para oxidación β (Cantwell *et al.*, 1978).

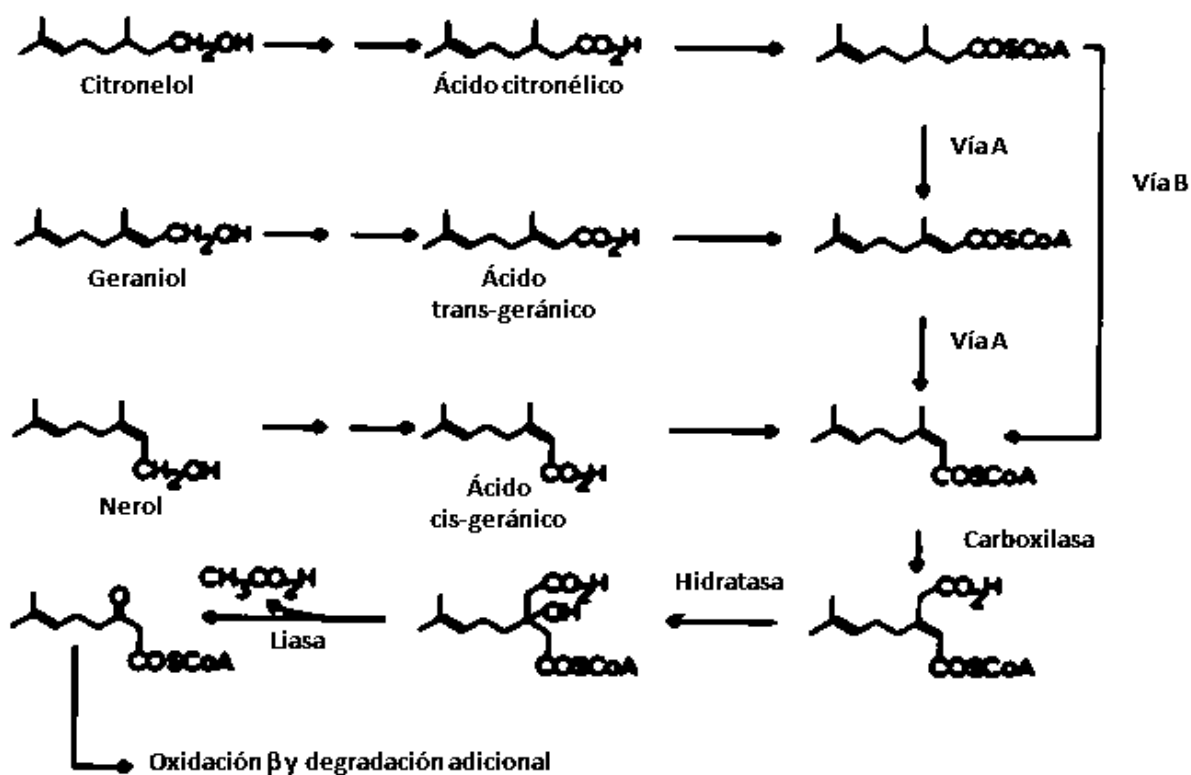


Figura 3. Vía para la degradación de isoprenoides acíclicos con C₁₀ en *P. citronellolis*. La vía muestra los pasos enzimáticos representativos, basados en el trabajo de Seubert *et al.*, (1964) y Cantwell *et al.*, (1978). El citronelol e isoprenoides estructuralmente parecidos, son oxidados hasta sus correspondientes ácidos carboxílicos, para coincidir en el intermediario geraniol-CoA, que es sustrato de la carboxilasa correspondiente, la cual incorpora una molécula de CO₂ sobre la ramificación del carbono β. Entonces, una hidratasa introduce un grupo hidroxilo sobre el mismo carbono y una liasa elimina la ramificación mediante la formación de una molécula de acetato y un intermediario asimilable por la oxidación β. Las enzimas nombradas se caracterizaron parcialmente, pasos enzimáticos no etiquetados representan reacciones análogas a aquellas involucradas en la oxidación de alcanos y ácidos alcanicos. Los pasos marcados como vía A y B representan incertidumbres en dichas vías catabólicas.

Cantwell y colaboradores (1978) examinaron el crecimiento de seis especies de *Pseudomonas* de la subdivisión fluorescentes en geraniol y citronelol como única fuente de carbono y energía, encontrando que además de *P. citronellolis*, *P. mendocina* y *P. aeruginosa* son capaces de crecer con estas fuentes de carbono mientras que *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. syringae*, no lo hacen. Esto sugiere que esta vía catabólica no se encuentra ampliamente distribuida en la subdivisión fluorescentes.

En 1979, Fall y colaboradores generaron cepas de *Pseudomonas* capaces de degradar ciertos hidrocarburos ramificados recalcitrantes a través de la combinación de las rutas degradativas de alcanos y citronelol. En este trabajo se reportó que la cepa *P. citronellolis* F1 fue incapaz de degradar 2,6-dimetil-2-octeno como única fuente de carbono. El microorganismo fue capaz utilizar *n*-alcanos de 12 a 16 carbonos pero no alcanos de cadena más corta. El plásmido OCT que le permite a *P. putida* crecer en *n*-alcanos de 6 a 10 carbonos fue transferido a *P. citronellolis*. Las cepas de *P. citronellolis* con el plásmido OCT fueron capaces de crecer en alcanos de 6, 8, 10, 11, 12, 14 y 16 carbonos pero no en 2,6-dimetil-2-octeno, un hidrocarburo ramificado. Por otro lado, las mutantes de *P. citronellolis* capaces de crecer *n*-decano, también fueron capaces de crecer en 2,6-dimetil-2-octeno (Fall *et al.*, 1979). Vandenberg y Wright (1983) identificaron una cepa de *P. putida* capaz de crecer en citronelol y geraniol como única fuente de carbono y energía, asociando esta capacidad al plásmido transmisible pSRQ50.

A pesar de que se había elucidado parte de la vía catabólica de terpenos/isoprenoides, no se habían identificado y caracterizado algunas de las enzimas involucradas, así como plásmidos relacionados a la ruta de degradación. Los genes de la vía catabólica fueron identificados en el 2004 por Díaz-Pérez y colaboradores, mediante una biblioteca de mutantes generada con el transposón *Himar1* en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1. De esta forma se identificó el operón *gny* (por el metabolismo de geranyl-CoA) correspondiente a los ORFs PA2010 a PA2016; este operón fue posteriormente renombrado como operón *liu*, por la utilización de leucina e isovalerato (Díaz-Pérez *et al.*, 2004). Posteriormente, Aguilar y colaboradores en el 2006 identificaron un operón homólogo llamado operón *atu* (por utilización de terpenos acíclicos) (Aguilar *et al.*, 2006; Förster-Fromme *et al.*, 2006) (Figura 4).

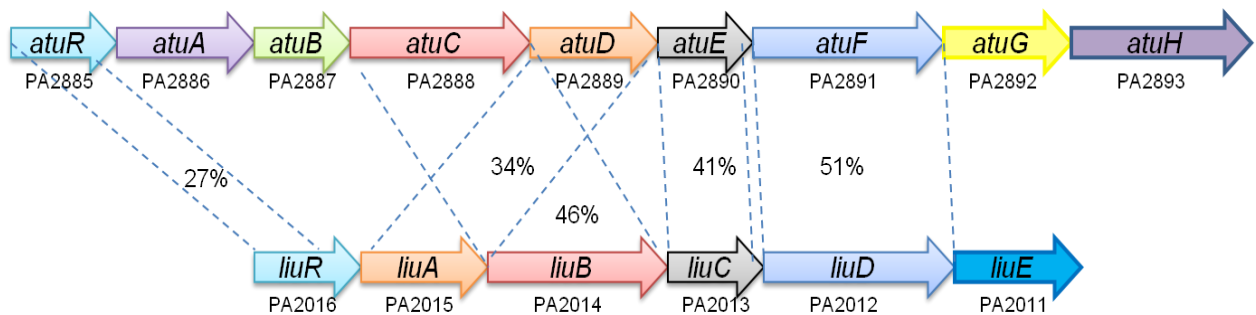


Figura 4 Operones homólogos *atu* y *liu* de *P. aeruginosa* PAO1. Se ha propuesto, que los genes de estos operones codifican para las enzimas involucradas en el catabolismo de terpenos acíclicos y leucina. Los ORFs y la dirección de la transcripción son mostradas con flechas. El número bajo la flecha indica el número de ORF asignado en la secuencia del genoma. El gen se indica dentro de la flecha. Las proteínas homólogas se muestra del mismo color; azul, *AtuR* y *LiuR*; rojo *AtuC* y *LiuB*; naranja, *AtuD* y *LiuA*; negro, *AtuE* y *LiuC*; azul, *AtuF* y *LiuD*. La identidad entre estas proteínas se indica en porcentaje; (Aguilar *et al.*, 2006; Campos-García, 2010).

2.1 Vía catabólica general de isoprenoides acíclicos de *P. aeruginosa*

La vía catabólica general de isoprenoides acíclicos está dividida en 5 etapas (Figura 5): vía superior de oxidación-activación, vía central de terpenos acíclicos, oxidación β , vía de leucina/isovalerato y la vía inferior que puede ser el ciclo del glioxilato o ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT). En la vía de oxidación activación, el citronelol es transformado a citronelil-CoA, el cual ingresa a la vía central de terpenos acíclicos donde el 7-metil-8-oxo-6-octenil-CoA es el metabolito final; éste es incorporado en la vía de oxidación β . En la oxidación β el producto es el 3-metil-crotonil-CoA, metabolito que converge en la vía de leucina/isovalerato, los productos finales de esta etapa son el acetoacetato y acetil-CoA. Posteriormente, el acetil-CoA puede ser utilizado en el ciclo del glioxilato o en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Figura 5).

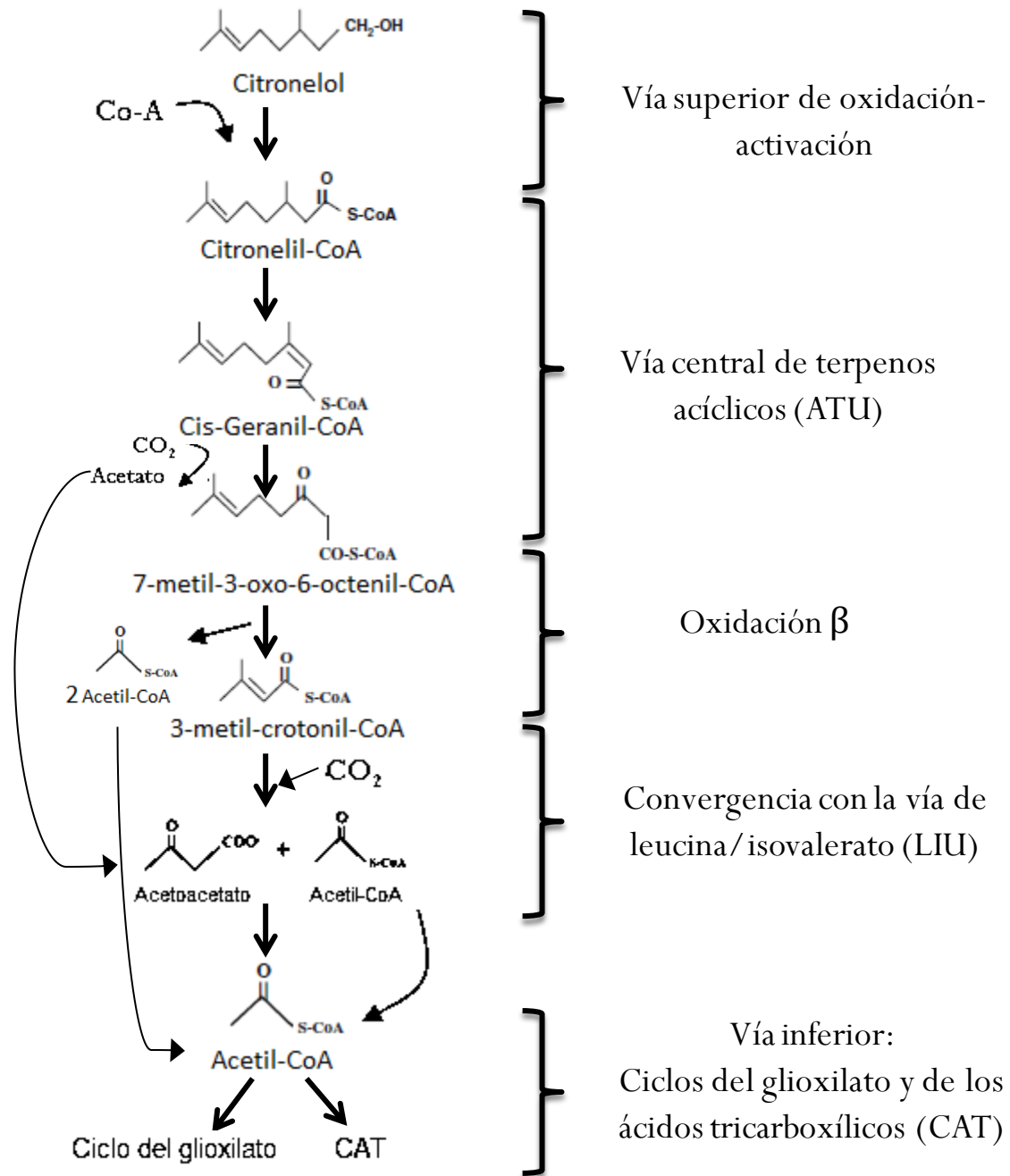


Figura 5 Etapas generales que comprende la vía catabólica de isoprenoides acíclicos en especies de *Pseudomonas*. En el esquema se muestra el nombre y la estructura química de los compuestos iniciales y finales en cada etapa. Las 5 etapas son señaladas mediante llaves. Las flechas con puntas abiertas indican el sentido de las reacciones y las flechas con puntas cerradas la entrada y salida de compuestos entre las etapas (modificado de Campos-García, 2010).

2.1.1 Vía superior de oxidación-activación

La vía superior de oxidación-activación de la vía catabólica de terpenos acíclicos inicia con la oxidación y posterior activación de citronelol, geraniol o nerol. En este paso, el terpenol es oxidado a su correspondiente terpenal y al ácido terpenóico (Figura 6). Se ha sugerido en estos pasos la participación de deshidrogenasas para la oxidación de citronelol a citronelal y de citronelal a ácido citronélico, aunque las actividades enzimáticas se han identificado, los genes y sus productos no ha sido dilucidados. En *P. aeruginosa*, se ha sugerido que la citronelol y citronelal deshidrogenasas son probablemente codificadas por los genes *atuB* o *atuG*; las proteínas codificadas por estos genes muestran homología con deshidrogenasas de cadena corta. En *P. aeruginosa*, la oxidación del geraniol a ácido geránico es un paso dependiente de molibdeno, las enzimas que catalizan estas reacciones son diferentes a las utilizadas en la oxidación del citronelol. El ácido citronélico o ácido geránico producido de los pasos de deshidrogenación es posteriormente activado por una acil-CoA sintetasa, produciendo citronelil-CoA o geranil-CoA, respectivamente (Figura 6). En este paso de activación no existe evidencia experimental que demuestre que genes están involucrados (Campos-García, 2010).

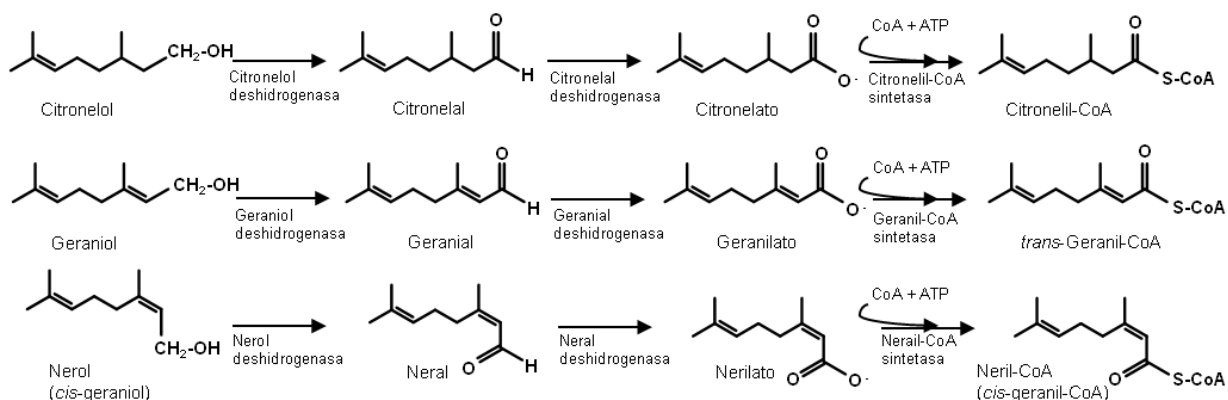


Figura 6 Reacciones y enzimas propuestas de la vía superior de oxidación-activación de isoprenoides acíclicos. Esta vía comprende la oxidación del terpenol (citronelol, geraniol o nerol) por deshidrogenasas al correspondiente terpenal y ácido terpenóico, y la activación por una reacción que involucra a una acil-CoA sintetasa, produciendo el terpenil-CoA (Díaz Pérez y Campos-García, 2012).

2.2 Acil-CoA sintetasas

Las acil coenzima A sintetasas (FACS por sus siglas en inglés, fatty acid CoA ligases; EC 6.2.1.3) son enzimas dependientes de ATP, CoA y Mg^{2+} , que activan ácidos carboxílicos a ésteres de CoA para su ingreso a oxidación β . Las FACS están ampliamente distribuidas en organismos procariontes y eucariontes y presentan promiscuidad por el sustrato. Las enzimas del tipo FadD, denominadas de esta manera por ser acil-CoA sintetasas involucradas en la degradación de ácidos grasos, son FACS asociadas a membrana citoplasmática, con un tamaño de 47 a 62 kDa (Hume *et al.*, 2009). Esta clase de enzimas activa un amplio rango de compuestos incluyendo ácidos grasos de cadena corta, media y larga, ácidos dicarboxílicos, ácidos aromáticos, los cuales son oxidados como fuente de carbono y energía o son usados en reacciones de biosíntesis de otras moléculas. Estas enzimas catalizan la conversión de ácido orgánico a un tioéster acil-CoA mediante un mecanismo de “ping-pong”. El mecanismo de reacción se lleva a cabo en dos pasos (Figura 7); se produce en primer lugar la activación del grupo carboxilo por el ATP para producir un acil-adenilato, con la liberación simultánea de pirofosfato; posteriormente el grupo carboxilo activado es atacado por el grupo tiol de la CoA, con lo que desplaza al AMP y forma el derivado acil-CoA. La formación del acil-CoA se ve favorecida por la hidrólisis del pirofosfato liberado en la reacción de activación, por acción de una pirofosfatasa. Esto hace que la reacción total resulte irreversible, puesto que se consumen 2 enlaces de alta energía, mientras que se forma uno.

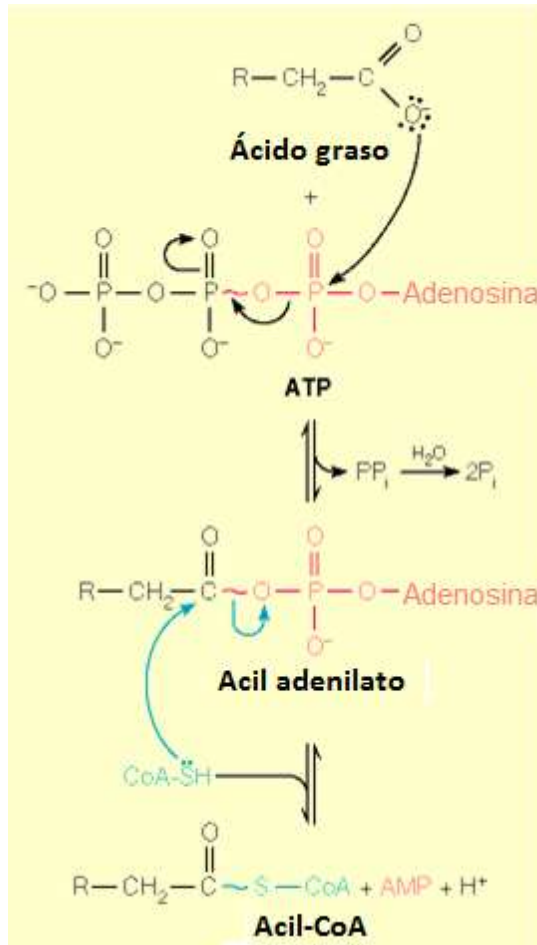


Figura 7. Mecanismo de reacción de las acil-CoA sintetasas. En la figura se muestra la formación reversible del acil adenilato activado, el ataque nucleófilo por el azufre tiólico de la CoA-SH sobre el grupo carboxilo activado, y la reacción de pirofosfatasa casi irreversible, que desplaza la reacción global hacia la acil-CoA (modificado de Mathews *et al.*, 2002).

La subfamilia de las acil-CoA sintetasas pertenece a la superfamilia de formación de adenilatos donde se incluyen además a las subfamilias: aril-CoA sintetasas, dominios de adenilación de las péptido sintetasas no ribosomales y las luciferasas. El tamaño promedio de estas enzimas es de 500 a 700 aminoácidos. La estructura de varias familias muestra que las enzimas contienen un dominio amino terminal largo, de 400 a 550 residuos, y un dominio carboxilo terminal pequeño, de aproximadamente 130 residuos (Reger *et al.*, 2007). El sitio activo de la acil-CoA sintetasas está localizado en la interface de los aproximadamente 400 aminoácidos del dominio amino terminal y aproximadamente 100 aminoácidos dominio

carboxilo terminal. El dominio carboxilo terminal rota aproximadamente 140° durante los dos pasos de la reacción, por lo cual la enzima exhibe una conformación durante la reacción de ATP con el ácido orgánico (conformación de adenilación) y una segunda conformación durante la formación del producto acil-CoA. Una corta región de unión conecta los dos dominios, y la mayor parte de la rotación durante el cambio conformacional ocurre en un residuo conservado de bisagra, comúnmente es un ácido aspártico o una lisina (Crosby *et al.*, 2012).

2.2.1 Clasificación de las acil-CoA sintetasas por la longitud de la cadena hidrocarbonada del sustrato preferente

Los ácidos grasos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de enlace en ácidos grasos saturados o insaturados, y por la longitud de la cadena hidrocarbonada en ácidos grasos de cadena corta (1-6 carbonos), ácidos grasos de cadena media (6-12 carbonos); ácidos grasos de cadena larga (13 y 21 carbonos) y ácidos grasos de cadena muy larga (mayor a 22 carbonos). Sin embargo, de acuerdo al autor puede haber variaciones en base a este criterio, por ejemplo, Beermann *et al.*, (2003) considera ácidos grasos de cadena larga aquellos ≥ 16 carbonos y ácidos grasos de cadena media aquellos entre los 8-14 carbonos. Las acil-CoA sintetasas son clasificadas como acetil-CoA sintetasas (2 carbonos), acil-CoA sintetasas de cadena corta, de cadena media, de cadena larga y de cadena muy larga (Watkins, 1997).

2.3 Motivo de unión a ATP/AMP de la acil-CoA sintetasa de *E. coli*

Una de las principales características del mecanismo catalítico de las FACS es la formación de un intermediario adenilado. Se han comparado secuencias de enzimas que comparten esta propiedad catalítica, identificando dos regiones altamente conservadas que comprenden el motivo de unión ATP/AMP (Figura 8).

	I	II
Acil-CoA sintetasas		
FadD ECOLI....	(213) YTG ^I GGTTGVA ^I KGA(224)....	(356) GYGLTE(361)
FadD BACSU....	(215) YTG ^I GGTTGAP ^I KG ^I V(226)....	(354) GYGLSE(359)
FadD HAEIN....	(213) YTG ^I GGTTGVA ^I KGA(224)....	(358) GYGMTE(363)
FAA1 YEAST....	(269) YTS ^I GS ^I STGEP ^I KG ^I V(280)....	(455) GYGLTE(460)
FAA4 YEAST....	(269) YTS ^I GS ^I STGTP ^I KG ^I V(280)....	(451) GYGLTE(456)
FAA2 YEAST....	(304) FTS ^I GS ^I TTGLP ^I KG ^I V(315)....	(490) GYGLTE(495)
FAA3 YEAST....	(267) YTS ^I GS ^I SISAP ^I KG ^I V(278)....	(451) GYGLTE(456)
ACSA HUMAN....	(275) FTS ^I GS ^I TTGNP ^I KGA(286)....	(457) GYGQTE(462)
ACSB HUMAN....	(275) FTS ^I GS ^I TTGNP ^I KGA(286)....	(457) GYGQTE(462)
ACSB MOUSE....	(276) FTS ^I GS ^I TTGNP ^I KGA(287)....	(453) GYGQTE(463)
ACSA RAT.....	(275) FTS ^I GS ^I TTGNP ^I KGA(286)....	(456) GYGQTE(461)
ACSB RAT.....	(276) FTS ^I GS ^I TTGNP ^I KGA(287)....	(457) GYGQTE(462)
Luciferasa		
LUCI PHOPY....	(197) NSS ^I GS ^I STGLP ^I KG ^I V(208)....	(338) GYGLTE(343)
Coumarato-CoA ligasas		
4CL1 PETCR....	(189) YSS ^I GS ^I TTGLP ^I KG ^I V(200)....	(333) GYGMTE(338)
4CBL ARTHRO...	(160) YTS ^I GS ^I TTGLP ^I KG ^I V(171)....	(301) IYGTTE(306)
Otras enzimas formadoras de adenilatos		
ENTE ECOLI....	(189) LSG ^I GGTTGTP ^I PKLI(200)....	(331) VFGMAE(336)
AAS ECOLI....	(372) FTS ^I GS ^I SEGHP ^I KG ^I V(383)....	(511) GYGVTE(516)
GRSA BACBR....	(189) YTS ^I GS ^I TTGNP ^I KGT(200)....	(322) AYG ^I PTE(327)
TYCA BACBR....	(177) YTS ^I GS ^I TTGK ^I PKGT(188)....	(309) AYG ^I PTE(314)
DLTA BACSU....	(150) YTS ^I GS ^I STGNP ^I KG ^I V(161)....	(292) TYG ^I PTE(297)
ALKK PSEOL....	(184) YTS ^I GS ^I TTGNP ^I KG ^I V(195)....	(325) AWGMTE(330)
Secuencia consenso del motivo de unión ATP/AMP		
ConsensoYTS ^I GS ^I TTGXP ^I KG ^I V.....GYGXTE
Alelos mutados	** * * *	*

Figura 8. Alineamiento del motivo unión ATP/AMP de miembros de la superfamilia formadora de adenilatos. En la figura se muestra miembros de diferentes familias de proteínas, el nombre abreviado, organismo y en números arábigos la posición de los aminoácidos. Las dos regiones se indican en número romano. Se indica la secuencia consenso donde los aminoácidos marcados con asterisco fueron sustituidos por alaninas en la FadD de *E. coli* (modificado de Weimar *et al.*, 2002).

En aminoácidos de las dos regiones del motivo de unión ATP/AMP se realizó mutagenesis sitio dirigida para determinar si estos aminoácidos participaban en la unión del ATP y en la catálisis. La expresión de las proteínas mutantes FadD fueron iguales a la proteína silvestre, lo cual se determinó mediante western blots. La actividad enzimática fue determinada en extractos celulares usando como sustrato ácido oléico (C_{18:1}) y ácido decanoico (C_{10:0}). Las

mutantes generadas fueron *fadD*^{Y213A}, *fadD*^{T214A}, *fadD*^{G216A}, *fadD*^{T217A}, *fadD*^{G219A} y *fadD*^{K222A} (primera región) y *fadD*^{E361A} (segunda región). La actividad enzimática fue disminuida entre 25-45% respecto al tipo silvestre en las mutantes *fadD*^{G216A}, *fadD*^{T217A}, *fadD*^{G219A} y *fadD*^{K222A}. En las mutantes *fadD*^{Y213A}, *fadD*^{T214A} y *fadD*^{E361A} la actividad disminuyó a un 10% o menos respecto la cepa silvestre. Lo cual indica que estos aminoácidos son esenciales para la actividad catalítica (Tabla II). Además se determinaron las constantes cinéticas V_{max} , K_m , y k_{cat} de las mutantes como función de la concentración de ATP. Las mutantes *fadD*^{T217A} y *fadD*^{K222A} tuvieron valores de k_{cat} reducidos aproximadamente 4 veces y los valores de K_m se incrementaron al compararse con la cepa silvestre, por lo que se concluyó que estos residuos contribuyen a la unión del ATP.

Tabla II. Expresión y actividad de mutantes de acil-CoA sintetasas

Alelo <i>fadD</i>	Expresión ^a	Actividad de Acil-CoA sintetasas, utilizando como sustratos ácidos grasos	
		C10:0	C18:1
		nmol/min/mg de proteína (\pm E.E.) ^b	
Tipo silvestre	+	17.33 (1.02)	31.70 (0.85)
$\Delta fadD$	-	0.05 (0.03)	0.12 (0.05)
<i>fadD</i> ^{Y213A}	+	0.04 (0.03)	0.47 (0.03)
<i>fadD</i> ^{T214A}	+	0.08 (0.02)	1.62 (0.26)
<i>fadD</i> ^{G216A}	+	7.55 (0.75)	8.22 (0.78)
<i>fadD</i> ^{T217A}	+	2.17 (0.33)	10.52 (2.29)
<i>fadD</i> ^{G219A}	+	5.91 (0.79)	8.52 (0.95)
<i>fadD</i> ^{K222A}	+	1.96 (0.81)	8.52 (0.95)
<i>fadD</i> ^{E361A}	+	0.01 (0.03)	0.23 (0.27)

^aLa detección de FadD y de las mutantes fue realizada mediante Western blot; + niveles detectables a la tipo silvestre en extractos celulares y fracciones solubles; -, FadD no detectada. ^bConcentración de proteína en la mezcla de reacción entre 36 y 50 μ g/ml. E.E., error estándar; n=4, (modificado de Weimar *et al.*, 2002).

2.4 Motivo de unión a ácidos grasos de la acil-CoA sintetasa de *E. coli*

Un segundo motivo característico en las acil-CoA sintetasas es el motivo de unión a ácidos grasos. Mediante la comparación de secuencias de enzimas formadoras de adenilato, Black y colaboradores (1997) identificaron un segundo segmento de 25 aminoácidos altamente

conservado, éste segmento es común para las acil-CoA sintetetasas (Figura 9). En base a esto se propuso una segunda secuencia consenso, un motivo común para las acil-CoA sintetetasas de ácidos grasos (motivo de FACS).

Microorganismo/Tejido	SECUENCIA CONSENSO	1	D	G	W	L	H	T	G	D	I	G	X	W	X	P	X	G	X	L	K	I	I	D	R	K	K	25
			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
<i>E. coli</i>	BCACS	431	N	G	W	L	H	T	G	D	I	A	V	M	D	E	E	G	F	L	R	I	V	D	R	K	K	455
<i>H. influenzae</i>	HTACS	433	D	G	W	M	A	T	G	D	I	V	I	M	D	E	S	Y	S	L	R	I	V	D	R	K	K	457
<i>P. oleovarans</i>	POACS	410	D	G	W	F	S	T	G	D	V	A	T	I	D	S	D	G	F	M	T	I	C	D	R	A	K	434
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FAA1	527	D	G	W	F	K	T	G	D	I	G	E	W	E	A	N	G	H	L	K	I	I	D	R	K	K	551
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FAA2	531	D	G	W	F	S	T	G	D	V	A	F	I	D	G	K	G	R	I	S	V	I	D	R	V	K	555
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FAA3	567	D	G	W	F	R	T	G	D	I	V	E	W	T	P	K	Q	L	K	I	I	D	R	R	K	591	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FAA4	527	D	G	W	F	R	T	G	D	I	A	E	W	T	P	K	Q	V	K	I	I	D	R	K	K	551	
Adipositos de ratón	MIACS	534	D	G	W	L	H	T	G	D	I	G	K	W	L	P	N	G	T	L	K	I	I	D	R	K	K	558
Isoenzima de hígado de rata	RIACS	534	D	G	W	L	H	T	G	D	I	G	K	W	L	P	N	G	T	L	K	I	I	D	R	K	K	558
Isoenzima de cerebro de rata	R2ACS	533	D	G	W	L	H	T	G	D	I	G	K	W	L	P	E	G	T	L	K	I	I	D	R	K	K	557
Isoenzima de hígado de humano	HLACS	534	D	G	W	L	H	T	G	D	I	G	K	W	L	P	N	G	T	L	K	I	I	D	R	K	K	558
Isoenzima de cerebro de humano	H2ACS	533	D	G	W	L	H	T	G	D	I	G	K	W	L	P	N	G	T	L	K	I	I	D	R	K	K	557

Figura 9. Alineamiento del motivo unión a ácidos grasos de acil-CoA sintetetasas de ácidos grasos y enzimas formadoras de adenilatos. Se muestra el nombre del microorganismo o tejido donde es encontrada la proteína, nombre abreviado de la proteína y los números indican la posición del motivo. En la secuencia consenso los aminoácidos marcados con asterisco fueron sustituidos por alaninas en la FadD de *E. coli* (modificado de Black *et al.*, 1997).

El papel de este motivo se evaluó mediante mutagénesis sitio dirigida en la acil-CoA sintetasa de *E. coli* y se generaron las mutantes *fadD*^{N431A}, *fadD*^{G432A}, *fadD*^{W433A}, *fadD*^{L434A}, *fadD*^{H435A}, *fadD*^{T436A}, *fadD*^{G437A}, *fadD*^{D438A}, *fadD*^{I439A}, *fadD*^{G446A}, *fadD*^{L448A}, *fadD*^{R449A}, *fadD*^{I450A}, *fadD*^{V451A}, *fadD*^{D452A}, *fadD*^{R453A}, *fadD*^{K454A} y *fadD*^{K455A}. La actividad fue determinada en extractos crudos usando ácido decanoico (C10:0), ácido mirístico (C14:0) y ácido oléico (C18:1). En las mutantes *fadD*^{G432A}, *fadD*^{H435A}, *fadD*^{G437A} y *fadD*^{I450A}, la actividad disminuyó entre el 30 y 50%, pero no hubo cambios en la especificidad de la longitud de la cadena del ácido graso. La actividad de las mutantes *fadD*^{W433A}, *fadD*^{T436A} y *fadD*^{R453A} fue prácticamente nula. Los cambios en las posiciones 434, 438 y 446 fue cercanamente nula la actividad de decanoil-CoA y oleil-CoA sintetasa pero fue detectable la actividad de miristoil-CoA sintetasa (Figura 10). Estos resultados sugieren que estos aminoácidos son esenciales para la actividad de la enzima o que su sustitución modifica la estructura de la proteína de tal manera que las formas mutantes de la enzima resultan disfuncionales o cercanamente disfuncionales. Las mutantes *fadD*^{I439A}, *fadD*^{L448A} y *fadD*^{R449A} disminuyeron la actividad enzimática para los tres sustratos, pero no hubo

cambios en la especificidad (Figura 10). Estas mutantes presentan una alta actividad de oleil-CoA sintetasa en relación a la actividad de decanoil-CoA sintetasa. Caso contrario ocurre para *fadD*^{V451A}, *fadD*^{D452A}, *fadD*^{K454A} y *fadD*^{K455A}, las cuales tienen una alta actividad de decanoil-CoA sintetasa en relación con la actividad de oleil-CoA sintetasa (Figura 10). Las sustituciones en estos aminoácidos modifican la especificidad por el sustrato, lo que demuestra que este motivo de la enzima está directamente involucrado en la unión del ácido graso (Black *et al.*, 1997).

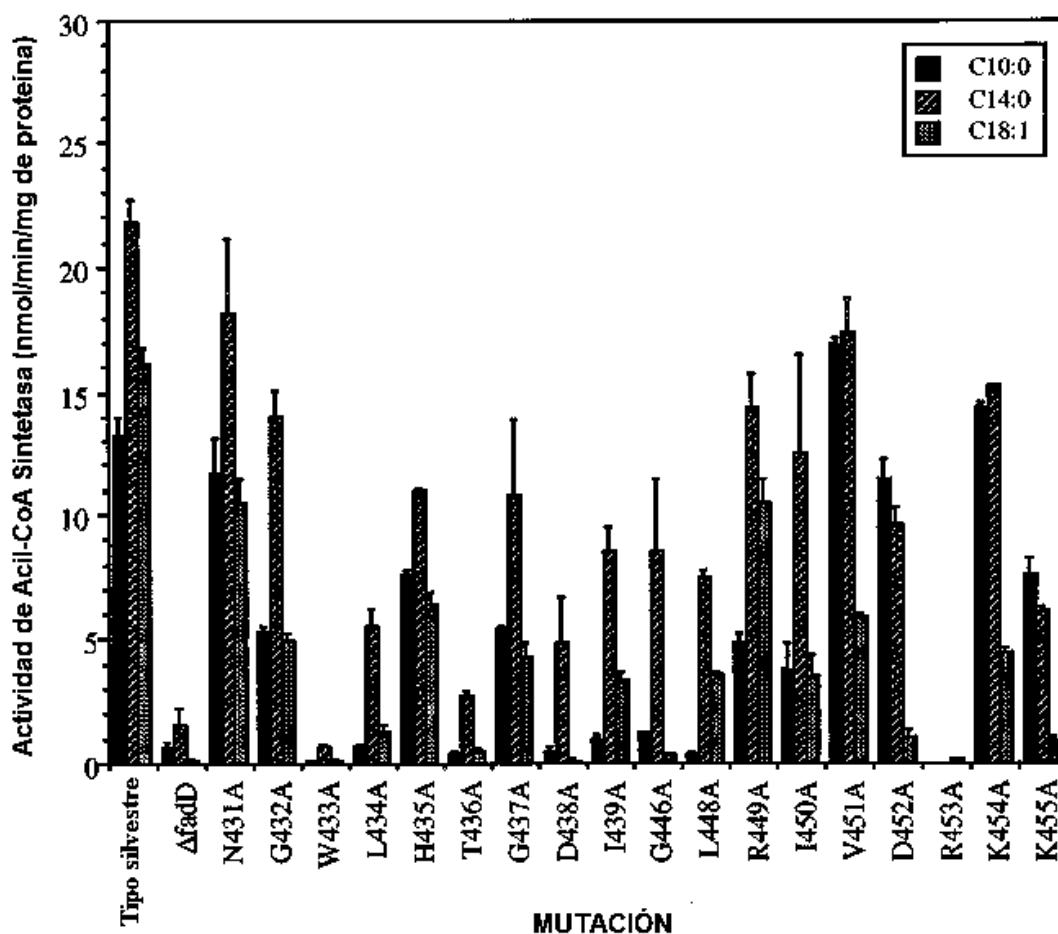


Figura 10. Actividad de las mutantes de acil-CoA sintetasas. Los sustratos utilizados fueron [³H] oleato (C_{18:1}), [³H] miristato (C₁₄) y [¹⁴C] decanoato (C₁₀). La cantidad de oleoil-CoA, miristoil-CoA y decanoil-CoA se determinó por recuento de centelleo. Las barras representan el error estándar de n=4 (modificado de Black *et al.*, 1997).

2.5 Identificación y caracterización de FadD1 y FadD2 en *P. aeruginosa*

La expresión de *fadD1* y *fadD2* de *P. aeruginosa* se demostró mediante microarreglos de muestras de pulmones de pacientes con fibrosis quística y RT-PCR en tiempo real (Son *et al.*, 2007). La proteína FadD1 (correspondiente al ORF PA3299) es 54% idéntica y 72% similar a la FadD de *E.coli* y FadD2 (ORF PA3300) es 53% idéntica y 72% similar; mientras que las proteínas FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* son entre si 60% idénticas y 76% similares. Además, *fadD1* y *fadD2* son genes adyacentes, separados por 234 pb. Convincentemente, el motivo de unión a ATP/AMP y el motivo de unión a ácidos grasos descritos para la FadD de *E. coli* se encuentran altamente conservados en FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* (Figura 11) (Kang *et al.*, 2010).

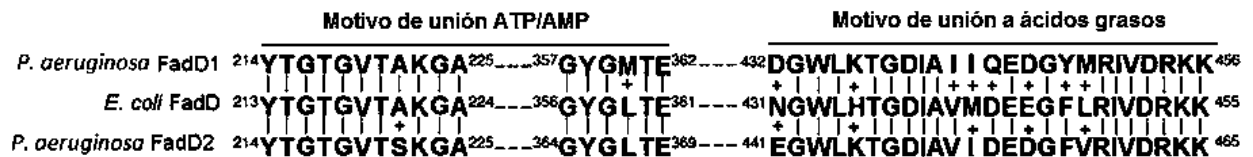


Figura 11. Alineamientos de los motivos de unión a ATP/AMP y de unión a ácidos grasos de FadD1, FadD2 de *P. aeruginosa* y de FadD de *E. coli*. Se muestra el nombre del organismo, nombre de la proteína y los números indican la posición del motivo en la secuencia de la proteína, se indica con una | aminoácidos idénticos y con una + aminoácidos diferentes entre ambos motivos (modificado de Kang *et al.*, 2010).

La degradación de ácidos grasos (Fad por sus siglas en inglés Fatty acid degradation) en el modelo microbiano de *E.coli*, emplea enzimas de la vía Fad codificadas por el regulón *fad*. La importación del ácido graso exógeno a través de la membrana externa es mediante una proteína denominada FadL y un proceso de transportación desconocido en la membrana interna. La proteína FadD produce el acil-CoA, una molécula que es degradada por el ciclo de oxidación β o ejerce regulación transcripcional en el regulón *fad* de *E. coli* por interacción con el regulador FadDR que desreprime los genes *fad*. Sin embargo, en *P. aeruginosa* algunos genes *fad* son inducidos, no por acil-CoA, sino por ácidos grasos de cadena larga (AGCL). El ciclo de oxidación β ha sido parcialmente caracterizado respecto a FadBAs en *P. aeruginosa* (Figura 12).

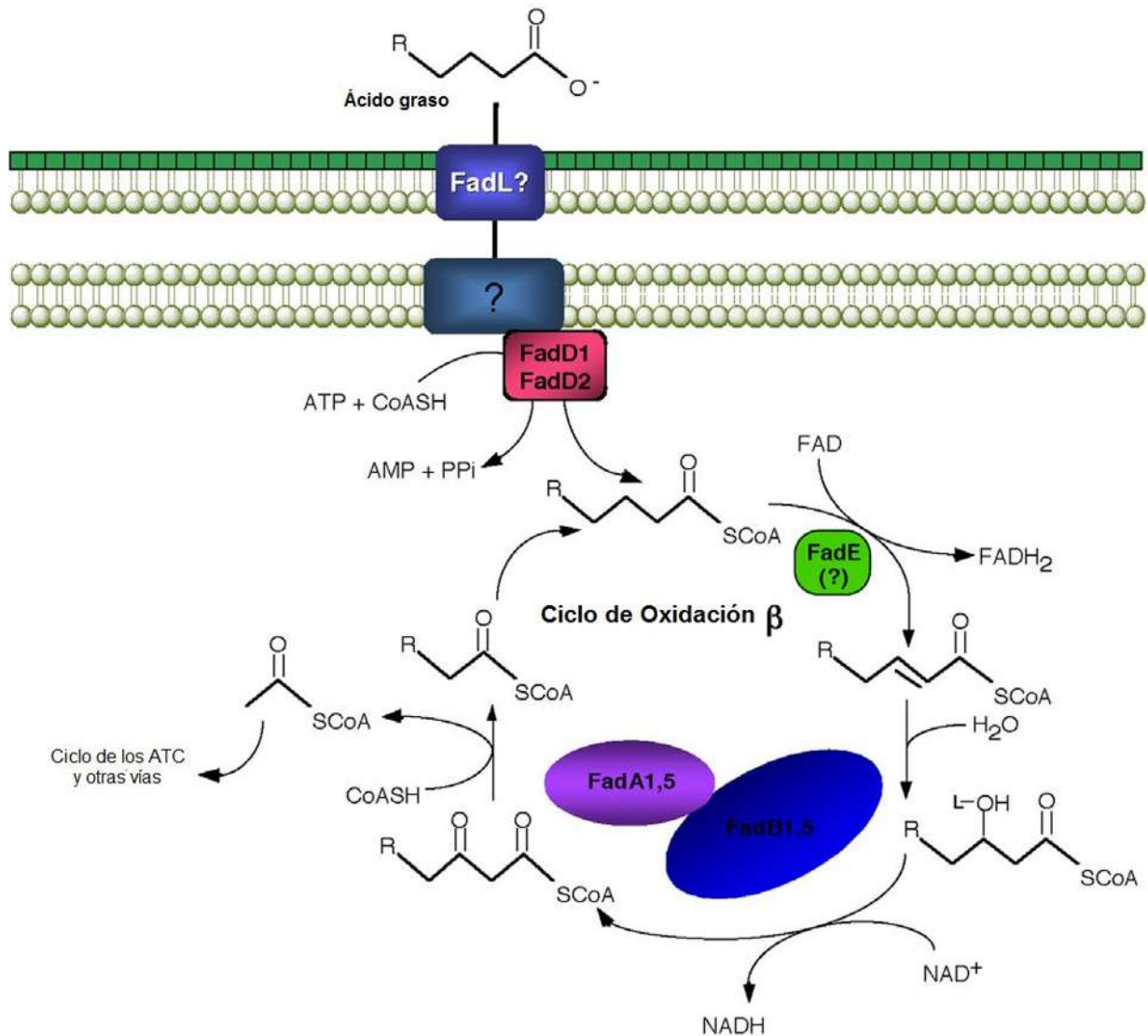


Figura 12. Vía de degradación de ácidos grasos en *P. aeruginosa* basados en el modelo de oxidación β en *E. coli*. Los ácidos grasos son transportados a través de la membrana externa por una proteína no identificada denominada FadL en *P. aeruginosa*. En *E. coli*, se ha propuesto que los ácidos grasos son transportados a través de la membrana interna por un mecanismo desconocido acoplado a una proteína FadD periférica de membrana. Sin embargo, *P. aeruginosa* tiene al menos dos FadDs. Aunque hay más de una docena de proteínas homólogas FadE en el genoma de *P. aeruginosa* la enzima específica que cataliza esta reacción no ha sido identificada. FadB cataliza los dos pasos siguientes seguidos por una ruptura del 3-ceto-acyl-CoA por la enzima FadA. Dos operones *fadBA* (*fadBA1* y *fadBA5*) han sido identificados en *P. aeruginosa* (modificado de Kang *et al.*, 2010).

Para determinar la especificidad por el sustrato de cada FadD y para aclarar la razón de por qué *P. aeruginosa* tiene múltiples homólogos de *fadD*, ambas proteínas fueron purificadas cercanas a homogeneidad de una cepa de *E. coli fadD* para asegurar que la actividad de la acil-CoA sintetasa fuera solo de la proteína recombinante FadD1 y FadD2 purificada. Los resultados de actividad enzimática mostraron que la enzima FadD1 de *P. aeruginosa* tiene preferencia por AGCL, lo cual se observa en valores altos de V_{max} y bajos valores de K_m cuando se tiene como sustrato ácidos grasos de cadenas de $C_{18:1}^{\Delta 9}$ y $C_{16:0}$. Lo contrario ocurre en FadD2, donde la enzima tiene valores altos de V_{max} y bajos valores de K_m para ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos grasos de cadena media (AGCM) (Figura 13 y Tabla III). La eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de FadD1 fue significativamente alta para AGCL ($C_{18:1}^{\Delta 9}$, $C_{16:0}$ y $C_{14:0}$) que para AGCM ($C_{12:0}$ y $C_{8:0}$) o AGCC ($C_{6:0}$ y $C_{4:0}$), mientras la eficiencia catalítica de FadD2 fue alta para AGCM y AGCC que para AGCL (Tabla III).

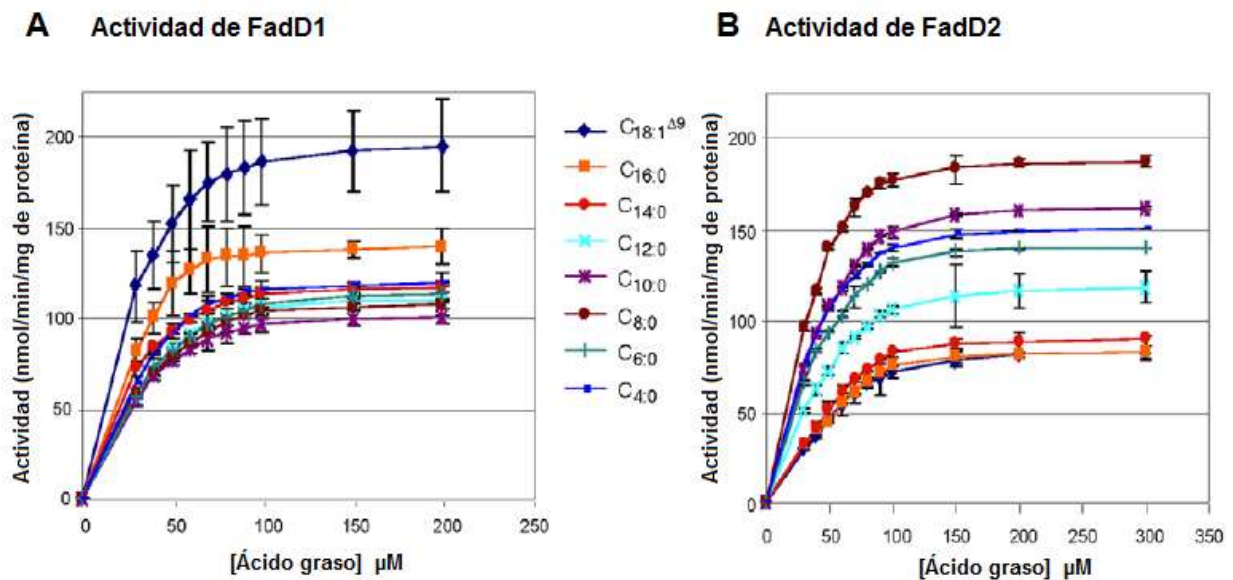


Figura 13 Caracterización bioquímica de las FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa*. **A)** La actividad de FadD1 fue alta para AGCL ($C_{18:1}^{\Delta 9} > C_{16:0}$), mientras que FadD2. **B)** tiene actividades altas para AGCC ($C_{8:0} > C_{10:0} > C_{4:0} > C_{6:0}$) (modificado de Kang *et al.*, 2010).

Tabla III. Propiedades cinéticas de FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* con varios sustratos

Sustratos	Parámetros cinéticos de FadD1 ^a				Parámetros cinéticos de FadD2 ^a			
	V_{max}^b	k_{cat}^c	K_m^d	k_{cat}/K_m^e	V_{max}^b	k_{cat}^c	K_m^d	k_{cat}/K_m^e
ATP	213	0.219	10.6	20.7	182	0.187	10.9	17.2
C _{4:0}	137	0.141	27.4	5.1	167	0.172	33.3	5.2
C _{6:0}	133	0.137	26.7	5.1	159	0.164	31.8	5.2
C _{8:0}	125	0.128	25.0	5.1	204	0.210	20.4	10.3
C _{10:0}	116	0.119	23.3	5.1	182	0.187	36.4	5.1
C _{12:0}	130	0.134	26.0	5.1	137	0.141	41.1	3.4
C _{14:0}	130	0.134	13.0	10.3	109	0.112	43.5	2.6
C _{16:0}	154	0.158	15.4	10.3	99	0.102	49.5	2.1
C _{18:1} ^{Δ9}	217	0.223	21.7	10.3	101	0.104	50.5	2.1

^aConstantes cinéticas (V_{max} y K_m). ^bnmoles de acil-CoA formado/min/mg de proteína. ^cs⁻¹; determinada usando las masas moleculares de FadD1 y FadD2. ^dmM de ATP o ácidos grasos. ^emM¹s⁻¹. (Modificado de Kang *et al.*, 2010).

2.6 Identificación y caracterización de acil-CoA sintetasas en *M. hydrocarbonoclasticus*

Marinobacter hydrocarbonoclasticus es una bacteria gran negativa, aerobia, de origen marino, capaz de degradar hidrocarburos, pertenece al filo Protobacteria de la clase Gamma. Interesantemente, análisis filogenéticos de la secuencia de 16S de ARNr muestra que es el antecesor más cercano de *P. aeruginosa* (Gauthier *et al.*, 1992). Holtzapple y Schmidt-Dannert (2007) identificaron y caracterizaron acil-CoA sintetasas de *M. hydrocarbonoclasticus*. Dichas enzimas están involucradas en la activación de isoprenos para la biosíntesis de ésteres cerosos como compuestos de reserva. Los ésteres cerosos de isoprenos han sido identificados como compuestos de almacenamiento de energía en especies de *Marinobacter*, las cuales crecen en sedimentos marinos donde abundan alcoholes, isoprenoides aciclícos recalcitrantes como son el farnesol y el fitol, ambos provenientes de la degradación de la clorofila. Se ha demostrado que *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 sintetiza ésteres cerosos de isoprenos cuando crece en fitol como fuente de carbono y condiciones limitantes de nitrógeno. En base a la secuencia de una sintasa de ceras/aciltransferasa de diacilgliceroles identificada en *Acinetobacter baylei* ADP1 que activa ácidos grasos y alcoholes de ácidos grasos para sintetizar ceras de ácidos

grasos como compuestos de reserva, se realizó una búsqueda BLAST en el genoma de *Marinobacter aquaeolei* VT8 (análisis de secuencia del gen 16S rRNA muestra un 99.4% de identidad con *M. hydrocarbonoclasticus*), encontrando 4 acil-CoA sintetasas (Tabla IV). Para determinar la especificidad del sustrato y si alguna de las acil-CoA sintetasas puede catalizar la activación de ácidos isoprenóicos, se purificaron las enzimas recombinantes (Acs1, Acs2, Acs3 y Acs4) y se realizaron ensayos enzimáticos teniendo como sustratos ácidos grasos saturados de diferentes longitudes de cadena (C₁₀, C₁₂, C₁₆, C₁₈ y C₂₀), así como ácido fitánico (ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico). El análisis de HPLC de los productos de reacción demostró que Acs1 es una acil-CoA sintetasa de cadena media que acepta ácidos grasos de C₁₀ a C₁₆, mientras que Acs2, Acs3 y Acs4 son acil-CoA sintetasas de cadena larga, las cuales son capaces de aceptar ácidos grasos de C₁₂ a C₂₀. Las Acs2, Acs3 y Acs4 muestran mayor actividad con ácido palmítico (C₁₆) como sustrato. La Acs2 fue la única capaz de convertir ácido fitánico en fitanoil-CoA, lo cual fue confirmado por HPLC-MS.

Tabla IV. Acil-CoA sintetasas de *M. hydrocarbonoclasticus*

Enzima	Longitud (aminoácidos)	Número de acceso al GenBank	Número de ORF en la cepa VT8 (%ID) ^a	Identidad con enzimas relacionadas	
				% ID	Cepa (número de acceso al GenBank)
Acs1	544	EF219372	438 (99)	62	<i>P. putida</i> AlkK (AJ245436)
Acs2	558	EF219373	1593 (99)	64	<i>P. putida</i> FadD
Acs3	555	EF219374	1090 (99)	55	<i>P. aeruginosa</i> FadD (ABJ10798.1)
Acs4	560	EF219375	2888 (97)	51	<i>P. aeruginosa</i> FadD (ABJ10798.1)

^aORFs homólogos en genoma de *M. aquaeolei* VT8 y el porcentaje de identidad que corresponde a las enzimas de *M. hydrocarbonoclasticus* DSM 8798 (modificado de Holtzaple y Schmidt-Dannert, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha caracterizado parte de la vía catabólica de isoprenoides acíclicos (proteínas codificadas por los operones *atu* y *liu*). Sin embargo, una parte importante para entender de forma global la ruta catabólica, es describir la vía superior, la cual comprende la oxidación del citronelol a ácido citrónico y la activación a citronelil-CoA. Por lo cual la identificación del gen que codifica la isoprenoil-CoA sintetasa contribuirá a comprender la ruta catabólica de isoprenoides acíclicos en *P. aeruginosa*.

Se ha caracterizado parte de la vía catabólica de isoprenoides acíclicos, proteínas codificadas por los operones *atu* y *liu*. Sin embargo, una parte importante para su entendimiento de forma global es describir la vía superior, la cual comprende la oxidación del citronelol a ácido citrónico y la activación a citronelil-CoA. Por lo cual la identificación del gen que que codifica la isoprenoil-CoA sintetasa y su caracterización contribuirá a comprender la vía catabólica de isoprenoides acíclicos en *P. aeruginosa*.

4. HIPÓTESIS

Pseudomonas aeruginosa tiene una isoprenoil-CoA sintetasa involucrada en la activación de isoprenoides acíclicos.

5. OBJETIVOS

Objetivo general.

Identificar y caracterizar la isoprenoil-CoA sintetasa de *Pseudomonas aeruginosa* involucrada en el catabolismo de isoprenoides acíclicos.

Objetivos específicos.

1. Identificar el gen que codifica a la isoprenoil-CoA sintetasa de *P. aeruginosa*.
2. Analizar la participación de la isoprenoil-CoA sintetasa en el catabolismo de isoprenoides acíclicos.
3. Expresar la enzima y determinar la actividad de la isoprenoil-CoA sintetasa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y plásmidos

Las cepas y los plásmidos que se utilizaron para la realización de este trabajo se enlistan en las Tablas V y VI, respectivamente.

Tabla V. Cepas empleadas en el presente trabajo

Cepas	Características	Referencia/Fuente
<i>Escherichia coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio <i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^fZ</i> Δ M15].	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> S17-1	Cepa conjugativa <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, Tra ⁺ , T _p ^R , Sm ^R .	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli-fadD3a</i>	JM101 transformada con el plásmido pGEM-T Easy – <i>fadD3</i> .	Este trabajo
<i>E. coli-fadD3b</i>	JM101 transformada con el plásmido pTrcHis2A – <i>fadD3</i> .	Este trabajo
<i>E. coli-fadD3c</i>	JM101 transformada con el plásmido pCDFDuet-1- <i>fadD3</i> .	Este trabajo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 SR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 resistente a estreptomycinina.	Wong y Mekalanos, 2000.
<i>P. aeruginosa</i> PW6545*	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> , por transposición en el ORF PA3300 correspondiente al gen <i>fadD2</i> con número de identificación 34186, Tc ^R . Contiene el transposón <i>ISphoA/hah</i> .	Jacobs <i>et al.</i> , 2003.
<i>P. aeruginosa</i> PW6542*	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> , por transposición en el ORF PA3299 correspondiente al gen <i>fadD1</i> con número de identificación 1212, Tc ^R . Contiene el transposón <i>ISlacZ/hah</i> .	Jacobs <i>et al.</i> , 2003.
<i>P. aeruginosa</i> PW3887*	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> , por transposición en el ORF PA1617, llamado <i>fadD3</i> , con número de identificación 21221, Tc ^R . Contiene el transposón <i>ISlacZ/hah</i> .	Jacobs <i>et al.</i> , 2003.
Mut. <i>fadD3</i> R	Mutante de <i>P. aeruginosa</i> obtenida por recombinación, mediante la interrupción del gen <i>fadD3</i> con un cassette de Gm ^R .	Este trabajo
Mut. <i>fadD1-fadD3</i>	Doble mutante, la mutante PW6542 se mutó en el gen <i>fadD3</i> mediante la inserción de un cassette de Gm ^R .	Este trabajo

Mut. <i>fadD2-fadD3</i>	Doble mutante, la mutante PW6545 se mutó en el gen <i>fadD3</i> mediante la inserción de un cassette de Gm ^R .	Este trabajo
Mut. <i>fadD1-fadD2</i>	Doble mutante, la mutante PW6542 se mutó en el gen <i>fadD2</i> mediante la inserción de un cassette de Gm ^R .	Este trabajo

*Las mutantes en los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* de la biblioteca del Genome Center of Washington University se generaron por la interrupción con el transposón *ISphoA/hah* (4.83 kpb) o con el transposón *ISlacZ/hah* (6.16 kpb). En el extremo 3' del transposón contiene un cassette de resistencia a tetraciclina y el promotor de neomicina fosfotransferasa, el cual reduce los efectos polares en la expresión de genes río abajo.

Tabla VI. Plásmidos utilizados en el presente trabajo

Plásmidos	Características	Referencias/Fuente
pGEM-T Easy	Empleado para la clonación de productos de PCR; Amp ^R .	Promega
pTrcHis2A	Empleado para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> . Amp ^R . Le añade a la proteína recombinante una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal.	Invitrogen
pCDFDuet-1	Empleado para la coexpresión de proteínas en <i>E. coli</i> , contiene dos sitios múltiples de clonación. Sm ^R . El sitio múltiple de clonación 1 le añade a la proteína recombinante una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal.	Novagen
pBSL141	Contiene un cassette de Gm ^R flanqueado por dos sitios múltiples de clonación.	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pKOK4	Plásmido <i>mob</i> ⁺ derivado de pBR325; Tc ^R , Amp ^R , Cm ^R .	Kokotek y Lotz, 1991.
pRK2013	Plásmido auxiliar para conjugación; <i>tra</i> , ColE1, Km ^R .	Figurski y Helinski, 1979.
pGEM-T Easy- <i>fadD3</i>	pGEM-T Easy con el ORF PA1617 de <i>P. aeruginosa</i> .	Este trabajo
pTrcHis2A- <i>fadD3</i>	pTrcHis2A con el ORF PA1617 de <i>P. aeruginosa</i> .	Este trabajo
pCDFDuet-1- <i>fadD3</i>	pCDFDuet-1 con el ORF PA1617 de <i>P. aeruginosa</i> .	Este trabajo

pGEM-T Easy- <i>fadD3</i> ::Gm ^R	pGEM-T Easy con el ORF PA1617 de <i>P. aeruginosa</i> interrumpido con un cassette de Gm ^R .	Este trabajo
pKOK4- <i>fadD3</i> ::Gm ^R	pKOK4 con el ORF PA1617 de <i>P. aeruginosa</i> interrumpido con un cassette de Gm ^R	Este trabajo
pTrcHis2A- <i>fadD2</i> ::Gm ^R	pTrcHis2A con el gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> interrumpido con un cassette de Gm ^R .	Este trabajo
pKOK4- <i>fadD2</i> ::Gm ^R	pKOK4 con el gen <i>fadD2</i> de <i>P. aeruginosa</i> interrumpido con un cassette de Gm ^R	Este trabajo

6.1.1 Mapas de los plásmidos

En este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos.

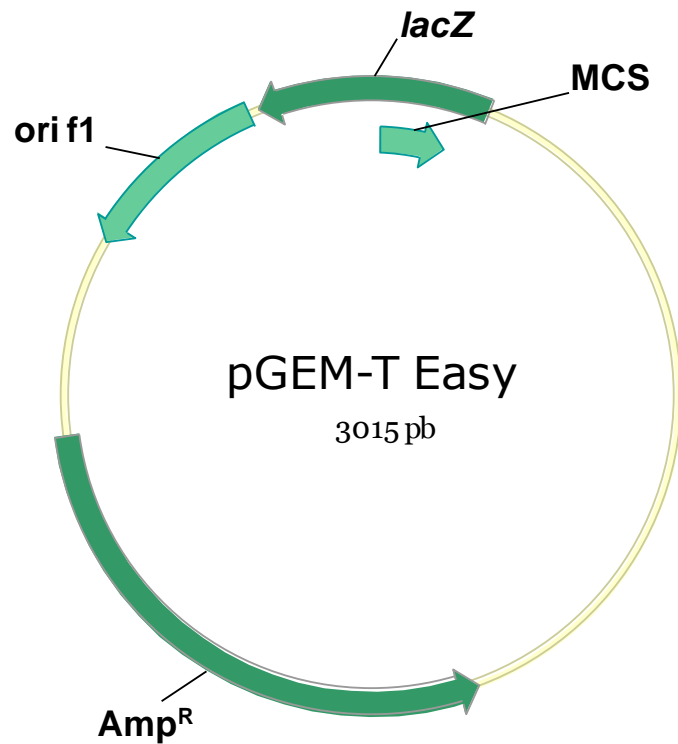


Figura 14. Diagrama del vector pGEM-T-Easy utilizado para la clonación del gen *fadD3*. Plásmido replicable en *E. coli*; *ori f1*, origen de replicación del fago filamentososo f1; *lacZ*, gen que codifica para la β -galactosidasa; MCS, sitio múltiple de clonación; *Amp^R*, gen de resistencia a ampicilina.

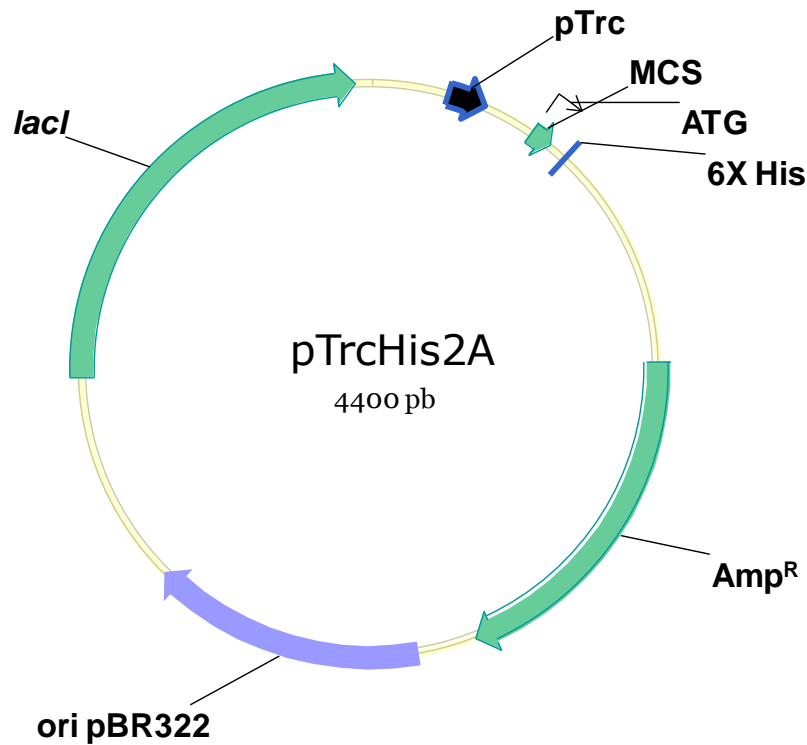


Figura 15. Diagrama del vector pTrcHis2A utilizado para la subclonación del gen *fadD3*, agrega una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal. Ori pBR322, origen de replicación en *E. coli* de bajo número de copias; represor *lacI*, el represor de Lac puede unirse al DNA y reprimir la transcripción no esta presente la lactosa, cuando esta el disacárido, el represor es inactivo y los genes se expresan, el sistema es inducido con IPTG, análogo no hidrolizable de la alolactosa; pTrc, promotor de altos niveles de expresión; ATG, sitio de iniciación de la traducción; MCS, sitio múltiple de clonación; 6X His, etiqueta de histidinas; Amp^R, gen de resistencia a ampicilina.

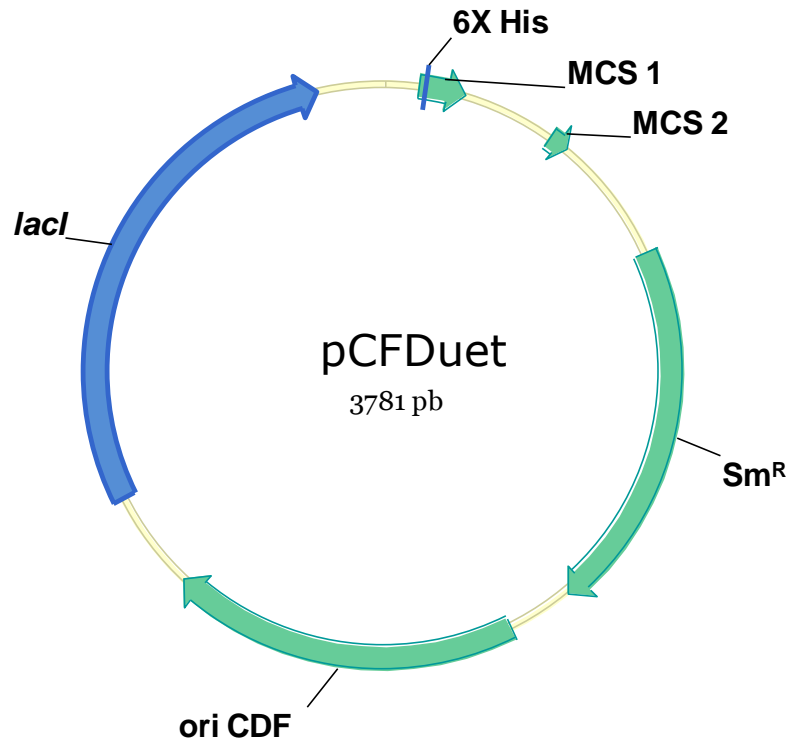


Figura 16. Diagrama del vector pCFDuet utilizado para la subclonación del gen *fadD3*, agrega una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal. Ori CDF, origen de replicación en *E. coli*; represor *lacl*; cuenta con dos sitios múltiples de clonación, MCS 1 y MCS 2; Sm^R, gen de resistencia a estreptomicina.

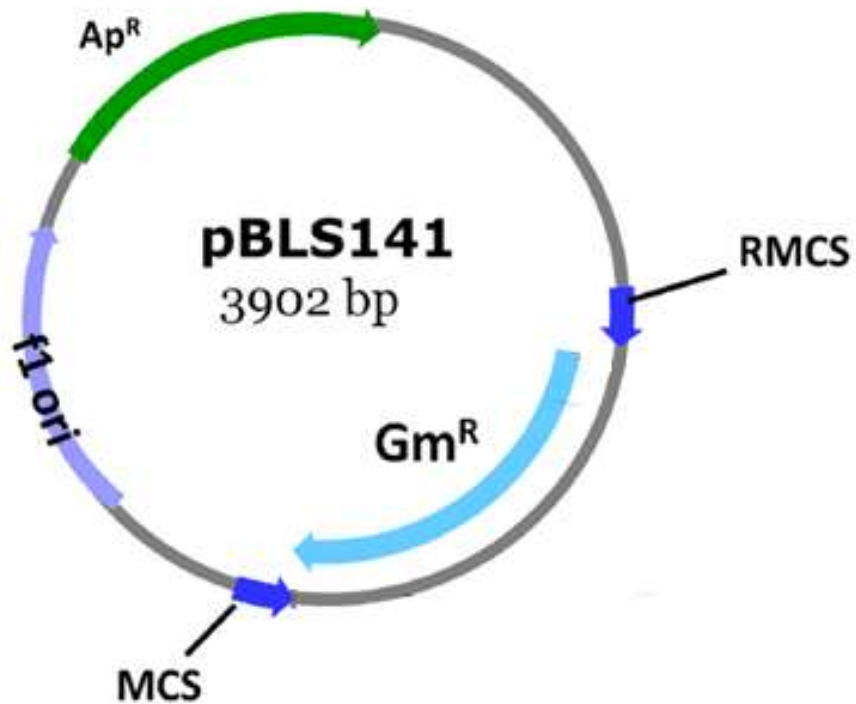


Figura 17. Diagrama del plásmido virtual pBS141. Plásmido replicable en *E. coli*; f1 ori, origen de replicación del fago filamentosos f1; el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina y cassette de resistencia a gentamicina. Este plásmido fue utilizado para extraer el cassette de resistencia a gentamicina, el cual está flanqueado por dos sitios de policlonación; MCS y RMCS.

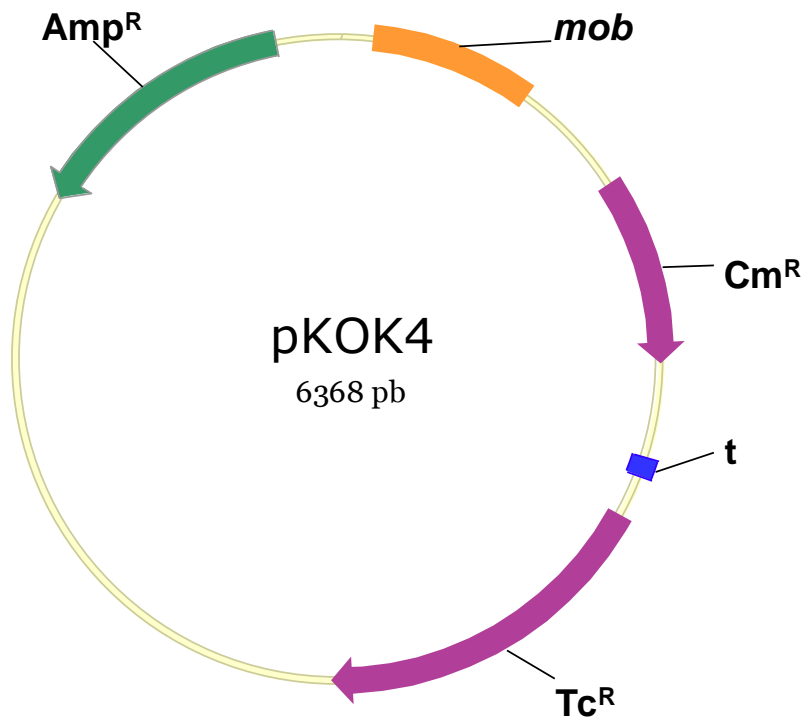


Figura 18 Diagrama del vector pKOK4 utilizado para la clonación de *fadD3::Gm^R* en *E. coli*. Amp^R, gen de resistencia a ampicilina; Tc^R, gen de resistencia a tetraciclina; Cm^R, gen de resistencia a cloranfenicol; *mob*, región necesaria para la movilización del plásmido; t, terminador del gen de resistencia a Cm.

6.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados se prepararon de la siguiente manera:

Caldo Luria-Bertani modificado (CLB)

- Peptona de caseína: 10 gramos por litro (g/l)
- NaCl: 5 g/l
- Extracto de Levadura: 5 g/l

Agar Luria-Bertani (ALB)

- CLB adicionado con 15 g/l de agar bacteriológico.

Medio Mínimo M9

Se preparó el buffer de sales 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

Para preparar el Medio Mínimo M9 se mezclaron:

- Buffer de sales 20X: 5%
- $CaCl_2$: 0.1 mM
- $MgSO_4$: 2.0 mM

El medio mínimo se complementó con 0.5 ml/l de disolución de trazas de metales: 2 g/l $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.8 g/l $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, 0.2 g/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 g/l $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 g/l $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.02 g/l $NaSeO_4$, 0.02 g/l $NaWO_4$.

Medio Mínimo M9 adicionado con peptona

- M9 adicionado con 0.02% de peptona de caseína.

Agar Medio Mínimo M9

- M9 adicionado con 15 g/l de agar bacteriológico.

Compuestos utilizados como fuentes de carbono:

Citronelol, n-octanol (Merck, Co.), ácido citronélico, geraniol, ácido geránico, ácido isovalérico y leucina (Aldrich Chem., Co).

6.3 Procedimientos con DNA

6.3.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina

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

1. Se incubaron 3 ml de cultivo de CLB con la cepa de interés y se creció durante toda la noche a 30 °C en agitación constante.
2. El cultivo se cosechó, centrifugando 1 min a 12,000 rpm; se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 150 µl del amortiguador STE [sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, ácido etilen-diamin-tetracético (EDTA) 10 mM, pH 8].
3. Se adicionaron 250 µl de solución de lisis [NaOH 0.2 N, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%] se mezcló suavemente y se incubó por 10 minutos a 4 °C.
4. 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.
5. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min.
6. Se pasó el sobrenadante a un microtubo nuevo y se le agregó 50 µl de fenol:cloroformo 1:1, se mezcló en vortex por 1 min y se centrifugó a 12,000 rpm por 7 min.

7. El sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se le agregaron 500 μ l de etanol/isopropanol 60:40 (% vol/vol) y se incubó por 20 min a -20°C o hasta la precipitación del ADN. Se centrifugó por 2 min a 12 000 rpm.
8. Se decantó el sobrenadante, y la pastilla se lavó 3 veces con etanol 70% y se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, posteriormente se secó la pastilla a 36°C y se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril. Se agregaron 3 μ l de RNAsa (1 mg/ml) y se incubó a 36°C durante 30 min.
9. Se almacenaron las muestras a -20°C o se realizó corrimiento electroforético en geles de agarosa.

6.3.2 Electroforesis en geles de agarosa

1. El gel de agarosa se preparó al 1% en buffer TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001M, pH 8.5).
2. El gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal, la cual contiene buffer TAE1X.
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, se cargó además, un marcador de tamaño molecular de ADN lineal (ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* o digerido con *HindIII* y *EcoRI*).
4. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se realizó el corrimiento electroforético aplicando de 100 a 130 voltios durante 30 min.
5. Se tiñeron los geles con bromuro de etidio (0.001 mg/ml) y se observaron en el transiluminador de luz UV de onda corta.
6. Los geles se fotografiaron en el fotodocumentador BioCaptMw Vilbert Lourmat.

6.3.3 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 posteriormente se describe.

1. Se cortó el fragmento de interés del gel de agarosa y se colocó en un microtubo.
2. Se agregaron 10 μ l de solución de unión por cada 10 mg de agar.
3. Se incubó 50 a 70°C durante 10 min mezclando cada 2 min hasta fundir el gel.

4. Se colocó una columna en su tubo colector de 2 ml y dentro de la columna se depositó la mezcla de agarosa ADN, se incubó 2 min a temperatura ambiente.
5. Se dió un pulso de 10 segundos, se recuperó el eluido y se vertió nuevamente en la columna, se incubó 2 min a temperatura ambiente y se dió un pulso de 10 segundos, este paso fue repetido 2 veces más.
6. Se agregaron 700 µl de solución de lavado y se centrifugó 1 min a 10,000 rpm.
7. Se decantó el eluido y se agregaron 500 µl de solución de lavado y se centrifugó 5 min a 10 000 rpm.
8. Se adicionaron 30 µl de agua libre de nucleasas previamente calentada a 70 °C en la columna y se incubó 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó 2 min a 10,000 rpm para recibir el eluido en microtubo nuevo.

6.3.4 Aislamiento de ADN total (cromosómico) de *P. aeruginosa*

1. Se incubaron 4 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 a 12 000 rpm; las células se resuspendieron después en 450 µl de TE 50/20 (Tris 50 mM/EDTA 20 mM, pH 8.0).
3. Se agregaron 50 µl de lisozima 10 mg/ml, se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 50 µl de proteinasa K 20 mg/ml, se incubó durante 15 min a 37 °C. Se agregaron 50 µl de SDS al 10% y se incubó por 30 min a 37 °C.
4. Posteriormente se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M y se agitó en vortex durante 15 min, para después incubarse 5 min a 65 °C.
5. Se adicionaron 80 µl 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 µl) agitando de 4-5 min en vortex, se centrifugó por 4-5 min a 10,000 rpm.
7. Se extrajo 2 veces con 200 µl de fenol/cloroformo (1:1), posteriormente se centrifugó por 7 min a 10,000 rpm.
8. Se adicionaron 500 µl de etanol/isopropanol (60:40), se incubó a -20 °C por 1 min.
9. Se lavó la pastilla 3 veces con 500 µl de etanol al 70%.

10. Se resuspendió la pastilla en 200 μ l de agua destilada estéril.
11. Se agregaron 3 μ l de RNAsa y se incubó 30 min a 37 °C.
12. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

6.3.5 Transformación por electroporación

6.3.5.1 Preparación de células electrocompetentes

1. La cepa *E. coli* JM101 se creció en 3 ml de CLB con agitación constante a 30 °C durante toda la noche en incubación (Lab-line incubator shaker).
2. Se inocularon 250 ml de CLB contenido en un matraz de 1 litro con el cultivo anterior.
3. Se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 leídas a 600 nm en el espectrofotómetro Thermo scientific Genesys 20.
4. El cultivo se colocó en hielo durante 10 min con agitación ocasional para después cosecharse a 5,500 rpm a 4 °C (Eppendorf centrifuge 5810R).
5. Las células obtenidas se lavaron dos veces, el primer lavado con 50 ml y el segundo con 25 ml de agua destilada estéril fría, se centrifugaron a 5,500 rpm a 4 °C por 10 min.
6. La pastilla se lavó con 50 ml de glicerol al 10% estéril, frío. Se centrifugó a 5,500 rpm a 4 °C por 10 min.
7. Se resuspendieron las células en 1 ml de glicerol al 20% estéril, frío.
8. Se repartieron las células en alícuotas de 100 μ l y se almacenaron a -70 °C.

6.3.5.2 Transformación de células electrocompetentes de *E. coli*

1. A una alícuota de 100 μ l de células electrocompetentes se le agregaron de 1-3 μ l de la mezcla de ligación de ADN o ADN plasmídico (aproximadamente 50 ng), la mezcla se colocó entre los electrodos de una celda para electroporación de 0.1 cm fría, posteriormente la celda se colocó en la cámara del electroporador (Micropulser BIO-RAD) y se dió un pulso de 1.8 a 2.4 kV durante 3-4 milisegundos.
2. Posteriormente las células se transfirieron a un tubo con 1 ml de CLB y se incubaron a 30 °C durante 1 hora con agitación constante.

3. Se colocaron 200 μ l de las células en una placa de ALB con el marcador de selección adecuado y se distribuyeron en la placa con perlas estériles. La placa se dejó secar en la campana de flujo laminar y se incubó a 37 °C de 18 a 24 horas.
4. Las colonias que crecieron se pasaron a tubos con 3 ml de CLB para realizar aislamiento del ADN plasmídico y caracterizarlo.

6.4 Procesos enzimáticos

6.4.1 Restricción de ADN con endonucleasas

El ADN se digirió utilizando una unidad de endonucleasa por μ g de ADN y en buffer tango 1X, se incubó durante 12 horas a 37°C, posteriormente la mezcla se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para separar los fragmentos de ADN esperados.

6.4.2 Ligación de ADN

El fragmento amplificado correspondiente al gen *fadD3* se purificó y clonó en pGEM-T Easy en una proporción 10:1 (inserto-vector); mientras que para el resto de los fragmentos ligados se mantuvo una proporción 5:1. La reacción de ligación procedió a 4°C durante 16 horas, utilizando la enzima ADN ligasa T4 (Promega). En todas las reacciones de ligación se utilizaron 1.2 unidades de la ADN ligasa T4 y 2 μ l de buffer 10X T4 ADN ligasa y se completó a 20 μ l con agua destilada estéril.

6.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen *fadD3* se utilizó el oligo 1617-B1, oligo directo, (5' GGA TCC CATGGTCACTGCAAATCGTCTGCCG 3') que le adicionó el sitio de restricción *Bam*HI y el oligo 1617-H, oligo reverso, (5' AAG CTT TTC GTG CCA GAG CAC GGC CTC 3') que le adicionó el sitio de restricción *Hind*III, los cuales se subrayaron en las secuencias de los oligos, originando un fragmento de 1,680 pb. La verificación de la inserción del cassette de resistencia a gentamicina en *fadD3* se realizó mediante esta técnica, por lo que el tamaño esperado para las mutantes *fadD3* R, *fadD1-fadD3* y *fadD2-fadD3* fue de 2480 pb. La inserción del cassette de resistencia a gentamicina en *fadD2* de la doble mutante *fadD1-fadD2* se verificó con los oligos para *fadD2*,

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*, oligo reverso, (5' GAA GCT TGG CGA TTT CGC GCA GCT CAC G 3') que le proporcionó el sitio de restricción *Hind*III y el tamaño esperado fue de 1,976 pb.

La mezcla de reacción para la amplificación de la mutante analizar consistió de los siguientes componentes: 200 ng de DNA total de *P. aeruginosa* PAO1SR ó mutante *fadD3 R*, mutante *fadD1-fadD3*, mutante *fadD2-fadD3* mutante *fadD1-fadD2*, 30 pmoles de los oligos correspondientes, 1.5 µl dNTPs (0.25 mM), 5 µl de buffer de reacción 10X, 1 µl de MgSO₄ 1 mM, 1 µl de enhancer y 1 unidad (0.4 µl) de ADN polimerasa Platinum *Pfx* (Invitrogen). La reacción se llevó a un volumen total de 50 µl con agua destilada estéril. La mezcla se sometió a 1 ciclo de 94 °C/5 min, posteriormente a 35 ciclos de 94 °C/40 segundos, 58 °C/40 segundos y 68 °C/8 min y finalmente se sometió a un ciclo de 68 °C/5 min. La mezcla se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar la ampliación.

6.5 Procedimientos para la generación y caracterización de mutantes

6.5.1 Conjugación triparental en *P. aeruginosa*

1. Se crecieron en 3 ml de CLB durante toda la noche la cepa con el plásmido auxiliar (*E. coli* pRK2013), 3 ml de CLB con la cepa donadora (*E. coli* S17-1 pKOK4-*fadD3*::Gm^R o *E. coli* S17-1 pKOK4-*fadD2*::Gm^R) y 3 ml de la cepa receptora (*P. aeruginosa* PAO1 SR o *P. aeruginosa* PW6542 o *P. aeruginosa* PW6545) a 37 °C con agitación constante.
2. Las cepas correspondientes se mezclaron en una relación 1:1:0.5 y 2:1:0.5 (donadora:receptora:auxiliar).
3. La mezclas de conjugación se centrifugaron a 13 000 rpm durante 2 min y la pastilla se resuspendió en 500 µl de CLB.
4. La mezcla de conjugación se distribuyó sobre una placa de ALB y se incubó a 37 °C por 15 horas.
5. El cultivo sobre la placa de ALB se cosechó y resuspendió en 1 ml de CLB, del cual se hizo una dilución 1:10, 1:100 y 1:1000.

6. De cada dilución se espatularon (con el uso de perlas) 100 μ l en placas de ALB con el marcador de selección correspondiente, (estreptomicina 200 μ g/ml y gentamicina 100 μ g/ml, o tetraciclina 60 μ g/ml y gentamicina 100 μ g/ml).
7. Se seleccionaron 10 colonias aisladas y se sembraron en ALB con el antibiótico correspondiente y finalmente a dos colonias se les verificó la inserción del cassette de resistencia a gentamicina mediante PCR usando los ologonucleótidos correspondientes.

6.5.2 Crecimiento de las mutantes en diferentes fuentes de carbono

A las mutantes que se les verificó la inserción del cassette de resistencia a gentamicina mediante PCR, se sembraron por estría simple en cajas de AM9 suministradas con diferentes fuentes de carbono. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: 1- octanol (50 μ l), citronelol (100 μ l), ácido citronélico (100 μ l), citral (100 μ l), geraniol (100 μ l), ácido geránico (100 μ l), y ácido isovalérico (100 μ l). Estos compuestos se volatilizaron en la placa de AM9 colocándolos en un disco de papel filtro, el cual se puso sobre la tapa de la caja petri. También se probó como fuente de carbono leucina 0.5%, adicionado con valina 0.005% e isoleucina 0.005% los cuales se disolvieron en AM9. El crecimiento se registró durante 10 días, cada 24 horas.

6.5.3 Cinéticas de crecimiento de las mutantes en diferentes fuentes de carbono

1. Se crecieron por 10 horas aproximadamente, pre-inóculos de las cepas mutantes en M9 adicionado a una concentración final de 0.02% de peptona de caseína y 0.2% de glucosa.
2. Con el cultivo anterior se inocularon matraces de capacidad de 125 ml, los cuales contenían 25 ml de M9 adicionados con 0.1% de peptona de caseína y 0.2% de glucosa, los matraces se incubaron a 30 °C a 150 rpm durante toda la noche.
3. Posteriormente con el cultivo anterior se inocularon matraces de 125 ml, los cuales contenían 25 ml de M9 adicionado con 0.02% de peptona de caseína. Se inoculó el volumen necesario para ajustar la D.O. de 0.15 a 0.20 leída a 600 nm (aproximadamente 3 ml). Una vez ajustada la D.O., se adicionó como fuente de carbono citronelol 0.075%, ácido isovalérico 0.075% y ácido citronélico 0.075%.
4. La cinética de crecimiento se realizó a 30 °C a 150 rpm, durante 36 horas tomando muestras cada 4 horas.

6.6 Procedimientos para la caracterización de FadD3-His

6.6.1 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Se realizó una curva estándar para la determinación de proteína, como se muestra en la Tabla VII, para la curva de concentración de proteína se usó albúmina sérica bovina (BSA) preparando las siguientes soluciones stock: 2.5 µg/20 µl, 5 µg/20 µl, 7.5 µg/20 µl y 10 µg/20 µl. La BSA se disolvió en NaCl 0.15 M. Preparar:

Tabla VII. Curva estándar de BSA

	Estándar de BSA (µl)	NaCl 0.15M (µl)
Blanco	0	100
2.5 µg	20	80
5 µg	20	80
7.5 µg	20	80
10 µg	20	80
Muestra problema	20	80

Se mezcló suavemente y se adicionaron 800 µl de agua destilada estéril y 200 µl de Azul Brillante de Coomassie (BioRad). Se mezcló en vortex y se dejó incubar a temperatura ambiente 2 min. La curva de concentración de proteína se leyó a 595 nm.

6.6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida discontinuos en un sistema de cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema de geles para el SDS-PAGE se preparó como a continuación se describe:

- **Gel separador 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 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 y se utilizaron 4,400 μ l para la preparación del gel, posteriormente se agregó agua destilada y se dejó polimerizar durante 25 min.

- **Gel concentrador 4 %.** Se mezclaron 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 μ l de SDS 10%, 10.8 μ l de PSA al 10% y 2.7 μ l de TEMED, se mezcló. Se retiró el agua depositada sobre el gel separador y se agregó la mezcla del gel concentrador, se colocó el peine y se dejó polimerizar por 20 min.

Una vez polimerizado el gel, se ensambló en la cámara de electroforesis, se llenó el tanque superior e inferior con buffer de corrida (25 mM Tris base, 192 mM glicina y 3.46 mM SDS) y se cargó el gel con las muestras mezcladas con buffer de carga [0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% (v/v) glicerol, 10% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) azul de bromofenol, 5% (v/v) de beta-mercaptoetanol], la cámara se conectó a la fuente de poder a 120 voltios hasta que el colorante migró al otro extremo del gel. Después el gel se tiñó con solución de Azul de Coomassie [0.59 mM Azul Brillante de Coomassie, metanol: agua: ácido acético, 5:5:1 (v/v/v)] y se desteñó con solución de desteñido metanol: ácido acético 40:7 (% v/v).

6.6.3 Inmunodetección de la proteína FadD3-His

La inmunodetección se realizó mediante el reconocimiento de la etiqueta de histidinas fusionada a la proteína FadD3-His de la siguiente manera:

1. Los extractos celulares se corrieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), por duplicado. Uno de los geles se tiñó y el otro se transfirió.
2. Se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa humedecida con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). La transferencia se realizó en una cámara de transferencia (Trans-Blot SD Semi-Dry), por 45 min a 15 voltios.
3. El gel transferido se tiñó para comprobar que la transferencia haya sido eficiente.
4. Se bloqueó la membrana con leche al 5% en TBS (Tris HCl 10 mM, NaCl 0.9, pH 7.8) con agitación constante a 4 °C.

5. Se lavó la membrana con 10 ml de TBS-T (TBS, 0.1% Tween 20) por 5 min, 2 veces.
6. El anticuerpo se disolvió en TBS en un título 1:5000 μ l. La membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti-His), por 12-48 horas en agitación suave a 4°C.
7. Se lavó la membrana 2 veces con 10 ml de TBS-T por 5 min.
8. Se diluyó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (anti-donkey) en TBS, en un título 1:2000 μ l y se incubó con la membrana durante 2 horas en agitación suave a 4 °C.
9. Se lavó la membrana con 10 ml de TBS-T por 5 min.
10. Se lavó la membrana con 50 ml de TBS por 2 min.

6.6.3.1 Revelado

1. Se disolvieron 40 mg de 4-Cl-1-Naftol en 20 ml de metanol (solución A).
2. Se adicionaron 500 μ l de peróxido de hidrógeno comercial a 50 ml de TBS (solución B).
3. Se colocó la membrana en la solución B y se adicionó lentamente solución A.
4. La reacción se detuvo pasando la membrana a agua destilada.

6.6.4 Rastreo del tiempo de inducción de la proteína FadD3-His

1. La cepa *E. coli-fadD3b* o *E. coli-fadD3c* se creció en 3 ml de CLB con agitación constante a 30 °C por 12 horas aproximadamente.
2. Con el cultivo anterior se inoculó un matraz de 1 litro con 250 ml CLB, con el antibiótico correspondiente y se incubó a 30 °C, a 150 rpm, hasta llegar a una D.O. de 0.4 a 0.6 leída a 600 nm. Se agregó isopropil tio- β -galactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM.
3. Se tomó una muestra de 5 ml antes de incubar el cultivo, y se tomaron muestras cada 2 horas hasta llegar a las 12 horas.
4. Cada muestra se centrifugó y lavadó con 1 ml de agua destilada estéril y se almacenó a -70 °C.
5. Las muestras se resuspendieron en 100 μ l de buffer Tris HCl 50 mM y NaCl 100 mM con inhibidores de proteasas.
6. Las muestras se sonicaron (Ultrasonic processor) durante 20 segundos a 7 watts y se ajustaron a una D.O. de 0.3 leída a 600 nm.

7. Las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE y posteriormente se realizó el western-blot.

6.6.5 Obtención de extractos crudos libres de células

1. La cepa *E. coli-fadD3c* y *E. coli* JM101 se creció en 3 ml de CLB con agitación constante a 30 °C de 10-12 horas.
2. La cepa *E. coli-fadD3c*; se inoculó un matraz de 1 litro con 250 ml CLB, con el antibiótico correspondiente y se incubó hasta llegar a una D.O. de 0.4 a 0.6 leída a 600 nm entonces se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Ambas cepas se crecieron durante 12 horas a 30 °C a 150 rpm.
3. El cultivo se cosechó en 3 tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó durante 5 min a 7,500 rpm a 4°C.
4. La pastilla celular se lavó con 3 ml de buffer Tris HCl 50 mM, NaCl 0.1 M a 4 °C.
5. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 200 µl de buffer Tris HCl 50 mM, NaCl 0.1 M con inhibidores de proteasas.
6. Las muestras en hielo se sonicaron dando 10 pulsos de 5 segundos a 3 watts.
7. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 15 min a 4 °C.
8. Se extrajo el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas totales.

6.6.6 Purificación de la proteína FadD3-His por cromatografía de afinidad

La resina TALON (Co²⁺-carboxil-metil-aspartato está acoplado a una resina) se equilibró como se describe a continuación:

1. La resina se resuspendió completamente y se colocaron 200 µl en un microtubo.
2. Se centrifugó la resina a 7,500 rpm por 5 min, el sobrenadante se desechó.
3. Se agregó 1 ml de buffer A (50 mM fosfato de potasio monobásico, 2 mM MgCl₂, 0.3 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM imidazol, pH 6.85) y se mezcló suavemente.
4. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se desechó.
5. Los pasos 3 y 4 se repitieron.

Una vez equilibrada la resina se llevó a cabo la purificación como se describe a continuación:

1. Fue mezclado el extracto crudo y la resina, esta mezcla se agitó en hielo durante 2 horas.
2. La mezcla se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min, el sobrenadante se desechó.
3. La resina (más la proteína) se lavó con 1 ml de buffer A, para lo cual se agitó en hielo durante 10 min.
4. La mezcla se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min, el sobrenadante se almacenó.
5. Se repitieron los pasos 3 y 4.
6. La resina (más la proteína) se lavó con 1 ml de buffer B (buffer A, 10% glicerol y 20 mM imidazol), para lo cual se agitó en hielo durante 10 min.
7. La mezcla se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min, el sobrenadante se almacenó.
8. Se repitieron los pasos 6 y 7.
9. La resina (más la proteína) se lavó con 1 ml de buffer C (buffer B y 50 mM imidazol), para lo cual se agitó en hielo durante 10 min.
10. La mezcla se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min, el sobrenadante se almacenó.
11. Los pasos 9 y 10 se repitieron.
12. La proteína se eluyó con 0.5 ml de buffer D (buffer B y 250 mM imidazol), para lo cual se agitó en hielo durante 10 min y se fraccionó en una columna en 3 partes.
13. Se realizó SDS-PAGE de los sobrenadantes de los lavados y las fracciones para determinar donde se encuentra la proteína FadD3.

6.6.7 Determinación de la actividad enzimática

El fundamento de la determinación de la actividad enzimática es la detección de los ésteres, es decir, una vez que la reacción enzimática *in vitro* se llevó a cabo y se formó el éster, el acil-CoA correspondiente (Aisling *et al.*, 2009), éste se hace reaccionar con la hidroxilamina para formar el acil-hidroxamato, el cual al reaccionar con el cloruro férrico formar un complejo coloreado rojo azulado o púrpura, que absorbe a una longitud de onda de 520 nm (Lipmann *et al.*, 1945).

6.6.7.1 Curva de calibración con acetato de etilo

Se preparó una solución stock de acetato de etilo 0.1 M, a partir de esta solución se realizaron diluciones a 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 M, 12.5 mM y 15 mM. De cada dilución se tomaron 222.5 μ l y se les aplicó el método de revelado.

6.6.7.2 Método de revelado

1. Se agregaron 166 μ l de hidroxilamina (la cual se preparó mezclando un volumen 1:1 de hidrocloreto de hidroxilamina 4 M e hidróxido de sodio 3.5 M, pH 6.9). Se dejó reaccionar 15 min en baño de agua a 30 °C.
2. La mezcla se calentó por 10 min en baño de agua a 95°C.
3. Posteriormente se enfrió durante 10 min en hielo.
4. Se agregaron 166 μ l de la solución de HCl-agua 1:3 (% v/v) y 166 μ l de FeCl₂ 5% disuelto en HCl 0.1 N, estrictamente en este orden y se agitó suavemente.
5. Las muestras se dejaron reposar durante 5 min y se centrifugaron durante 2 min a 12,000 rpm.
6. Finalmente cada muestra se leyó a 520 nm.

6.6.7.3 Ensayo enzimático

1. La mezcla de reacción contenía 12.5 μ l de MgCl₂ 0.2 M, 50 μ l de ATP 0.1M disuelto en buffer Tris base 50 mM, 30 μ l de sustrato (ácido citrónico, ácido geránico, ácido isovalérico o aceite de aguacate) 10 mM, 100 μ l de extracto crudo libre de células (70 μ g de proteína total).
2. La mezcla se llevó 5 min a un baño de agua a 30 °C.
3. Se agregaron 30 μ l de CoA 20 mM disuelta en buffer Tris base 50 mM y se incubó 15 min en baño de agua a 30 °C.
4. Posteriormente a cada reacción se les aplicó el método de revelado.

6.7 Procedimientos bioinformáticos

6.7.1 Análisis BLAST

Las secuencias proteicas se obtuvieron de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Benson *et al.*, 2012) o de la página del genoma de *P. aeruginosa* (<http://www.pseudomonas.com>) (Winsor *et al.*, 2011). La búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se realizó en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Altschul *et al.*, 1990), se utilizó la opción blastp, la secuencia de la proteína de referencia en formato fasta, se especificó la base de datos y el organismo. Posteriormente, con las secuencias encontradas en formato fasta, se creó una base de datos local en el programa Lasergene EditSeq y se realizó búsqueda BLAST con cada una de las secuencias para asociar posibles funciones a cada secuencia.

6.7.2 Alineamientos de secuencias

Las secuencias se importaron al programa Lasergene MegAlign y se realizaron alineamientos de secuencias múltiples utilizando Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) así se determinó el porcentaje de identidad respecto a cada una de las secuencias. Los alineamientos se editaron en con el programa BioEdit (Hall, 1999).

6.7.3 Identificación de región promotora

La identificación de la región promotora del operón que comprende los ORFs PA1617, PA1618 y PA1619 se realizó en línea en la página <http://www.softberry.com>, por lo que se introdujo la secuencia nucleotídica de la región intergénica de los ORFs PA1616 y PA1617.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación del gen que codifica la proteína FadD3 mediante análisis bioinformático

Los genes que posiblemente codifican para la proteína FadD3 se identificaron mediante análisis tipo BLAST en las bases de datos del NCBI (por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information) y alineamientos de secuencias múltiple con Clustal W (materiales y métodos). La secuencia de la acil-CoA sintetasa de *E. coli* K12 (con número de acceso al GenBank BAA15609) se utilizó como secuencia de referencia. Para nuestros fines la comparación fue realizada contra la secuencia del genoma *P. aeruginosa* PAO1 (taxid 208964), cepa resistente a estreptomycin con la que cual se trabajó experimentalmente. Con base a los siguientes criterios se propusieron 14 ORFs que codifican para posibles acil-CoA sintetasas (Tabla VIII); se descartaron proteínas con motivos ATP/AMP con tamaños mayores de 1,500 aminoácidos (aa), por no tratarse del tamaño descrito para acil-CoA sintetasas involucradas en el catabolismo de ácidos grasos, cuyo tamaño es de 400 a 700 aminoácidos. Tampoco se consideraron proteínas parciales, es decir, que sólo un fragmento de la proteína se consideró en el alineamiento donde este fragmento no incluyó los dos motivos.

En la tabla VIII se presentan los 14 ORFs que codifican posibles acil-CoA sintetasas ya que se identificaron aminoácidos conservados en los dos motivos característicos; en la primera columna se enlistan las proteínas putativas de acuerdo a las anotaciones del programa. Además, estos ORFs codifican proteínas de tamaños de entre 517 a 651 aminoácidos, de los cuales cinco ya han sido nombrados o relacionados con alguna función; PA3299/*fadD1* y PA3300/*fadD2* (Kang *et al.*, 2010), PA4228/*pchD* (Serino *et al.*, 1997), PA0996/*pqsA* (Gallagher *et al.*, 2002), PA4733/*acsB* y PA0887/*acsA* (Suman *et al.*, 1995). A excepción de PA3299, que codifica FadD1, y PA3300 el cual codifica a FadD2 (Kang *et al.*, 2010), los niveles de identidad respecto a la acil-CoA de *E. coli* se encuentran en el rango de 32 al 22%.

Tabla VIII. Acil-CoA sintetasas de *P. aeruginosa* PAO1 homólogas a FadD de *E. coli*

Proteína putativa	Número de aminoácidos	Número de acceso en GenBank	% de identidad	ORF/Gen (referencia)
Acil-CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga	562	NP_251989	55	PA3299/ <i>fadD1</i> (Kang <i>et al.</i> , 2010)
Acil-CoA ligasa de cadena larga	562	NP_251990	54	PA3300/ <i>fadD2</i> (Kang <i>et al.</i> , 2010)
Proteína de unión a AMP	564	NP_251247	32	PA2557
Proteína de unión a AMP	632	NP_252549	29	PA3860
CoA ligasa	517	NP_249687	29	PA0996/ <i>pqsA</i> (Gallagher <i>et al.</i> , 2002)
Acil-CoA sintetasa	540	NP_252887	26	PA4198
Acil-CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga	560	NP_252613	25	PA3924
Proteína de biosíntesis de pioquelina (PchD)	547	NP_252918	25	PA4228/ <i>pchD</i> (Serino <i>et al.</i> , 1997)
Proteína de unión a AMP	555	NP_251245	25	PA2555
Acetil-CoA sintetasa	645	NP_253421	24	PA4733/ <i>acsB</i> (Suman <i>et al.</i> , 1995)
Acetil-CoA sintetasa	651	NP_249578	24	PA0887/ <i>acsA</i> (Suman <i>et al.</i> , 1995)
Acetil-CoA sintetasa	628	NP_252258	24	PA3568
Proteína de unión a AMP	555	NP_250308	24	PA1617
Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga	608	NP_251583	22	PA2893

Un segundo criterio de selección fue realizar un alineamiento múltiple (Clustal W) de los productos proteicos de los probables ORFs de *P. aeruginosa* y las acil-CoA sintetasas de *M. hydrocarbonoclasticus* (Holtzaple y Schmidt-Dannert, 2007). Al igual que en la tabla anterior, en la Tabla IX se presenta en la primera columna el ORF correspondiente a cada proteína y en las siguientes columnas los porcentajes de identidad de los productos proteicos de cada ORFs respecto a la proteína Acs1, Acs2, Acs3 y Acs4 de *M. Hydrocarbonoclasticus*. Los genes *fadD1* y *fadD2* de *P. aeruginosa* presentaron un porcentaje de identidad alto respecto a la Acs2, en la cual se ha demostrado la capacidad de activar ácido fitánico a fitanoil-CoA. El ORF PA1617 presentó el mayor porcentaje de identidad respecto a Acs3 y Acs4, (55.1% y 49.5%

respectivamente), en comparación al resto de los ORFs, sugiriendo que los genes *fadD1*, *fadD2* y el ORF PA1617 tienen una alta probabilidad de codificar la isoprenoil-CoA sintetasa involucrada en la vía metabólica en estudio.

Tabla IX. Comparación de posibles acil-CoA sintetastas de *P. aeruginosa* con las acil-CoA sintetastas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

ORF/Gen	% de identidad			
	Acs 1	Acs 2	Acs 3	Acs 4
PA3299/ <i>fadD1</i>	22.5	62.8	20.3	23.4
PA3300/ <i>fadD2</i>	23.7	59.6	21.4	24.0
PA2557	22.9	25.4	21.4	20.1
PA3860	23.3	26.0	20.9	20.0
PA4198	33.2	23.6	19.2	20.1
PA3924	38.8	20.9	20.0	17.9
PA4228/ <i>pchD</i>	21.8	22.5	18.6	16.8
PA2555	17.1	23.9	17.4	14.7
PA0996/ <i>pqsA</i>	20.9	21.8	21.4	20.3
PA4733/ <i>acsB</i>	21.5	19.6	16.7	14.9
PA0887/ <i>acsA</i>	19.5	21.0	15.9	15.8
PA3568	20.9	19.5	17.2	17.5
PA1617	20.3	21.9	55.1	49.5
PA2893	16.2	18.1	14.6	13.8

Anteriormente se ha mencionado que las acil-CoA sintetasas tienen dos motivos característicos altamente conservados, por lo que otra estrategia que se utilizó para la identificación del gen que codifica a la isoprenoil-CoA sintetasa consistió en analizar los motivos catalíticos de unión ATP/AMP y el motivo de unión a ácidos grasos y determinar el porcentaje de identidad comparando el producto proteico del ORF PA1617, la Acs2 de *M. Hydrocarbonoclasticus*, y las acil-CoA sintetasas FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa*. Para esto se realizó un alineamiento múltiple (Clustal W) con las secuencias de las proteínas mencionadas (Figura 19). Los motivos se identificaron teniendo como referencia la ubicación de los motivos de las acil-CoA sintetasas FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* (Kang *et al.*, 2010). En el motivo de unión ATP/AMP, el producto del ORF PA1617 presentó 83% de identidad con respecto a la acil-CoA sintetasa Acs2 de *M. hydrocarbonoclasticus*, FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* (Figura 19). Con respecto al motivo de unión a ácidos grasos, el producto del ORF PA1617 presentó 52% de identidad con respecto a la acil-CoA sintetasa Acs2 de *M. hydrocarbonoclasticus*, FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* (Figura 19). Con los datos obtenidos de los análisis bioinformáticos podemos sugerir que los genes *fadD1*, *fadD2* y el ORF PA1617 son los candidatos con mayor probabilidad para codificar a la isoprenoil-CoA sintetasa.

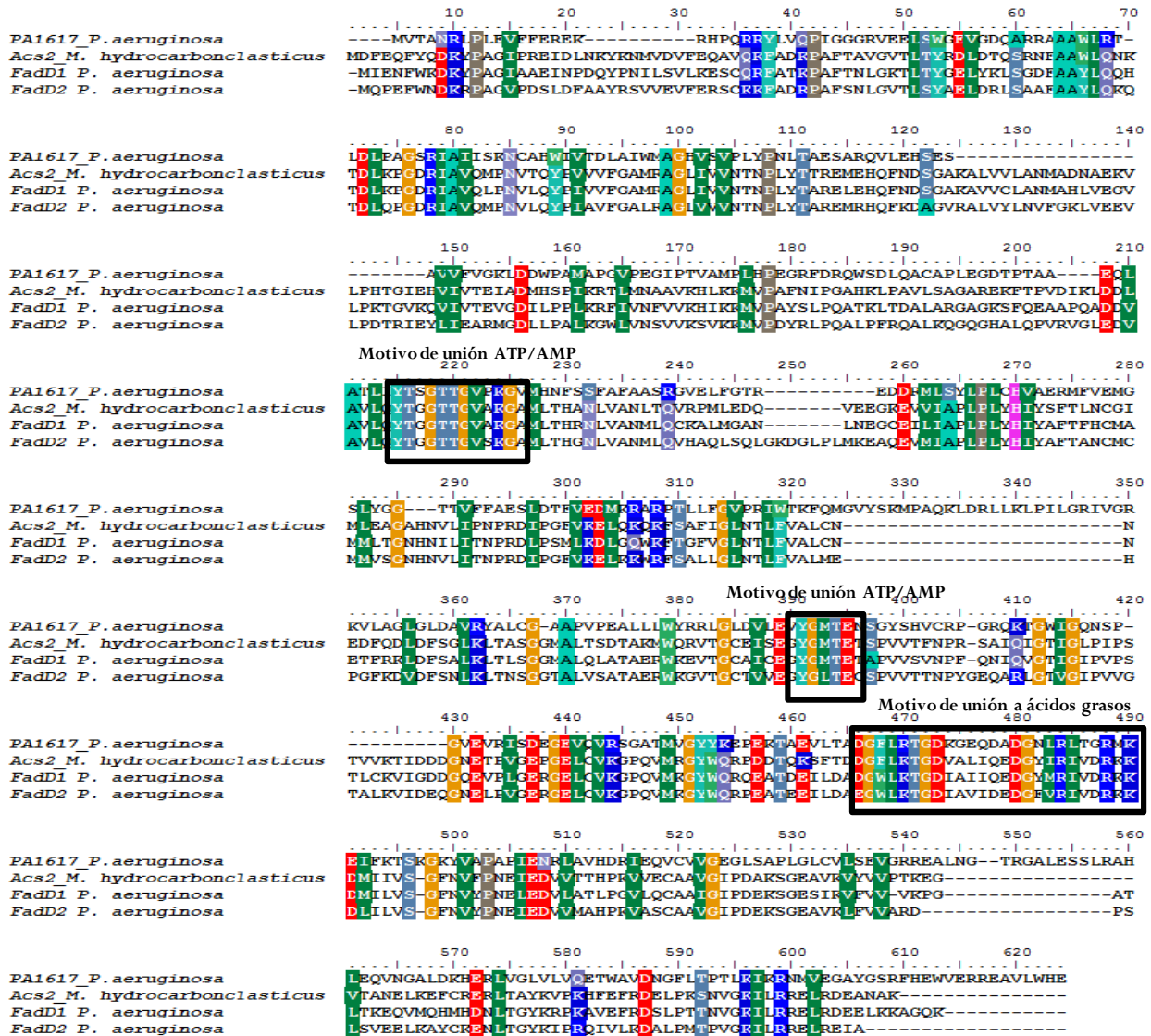


Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las acil-CoA sintetasas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Acs2), el producto proteico del ORF PA1617, FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa*. En los recuadros se indican los motivos característicos de estas enzimas. Los aminoácidos coloreados indican identidad o similitud.

7.1.1 Contexto genómico del ORF PA1617 en el genoma de *P. aeruginosa*

De acuerdo a las anotaciones hechas en la secuencia del genoma de *P. aeruginosa* (www.pseudomonas.com), se sugiere que el ORF PA1617 en conjunto con los ORFs PA1618 y PA1619 podrían estar formando un operón cuya localización es del nucleótido (nt) 1760713 al

nt 1763752 (Figura 20). Los ORFs presentan los siguientes tamaños, PA1617 (555 aa), PA1618 (145 aa) y PA1619 (274 aa).

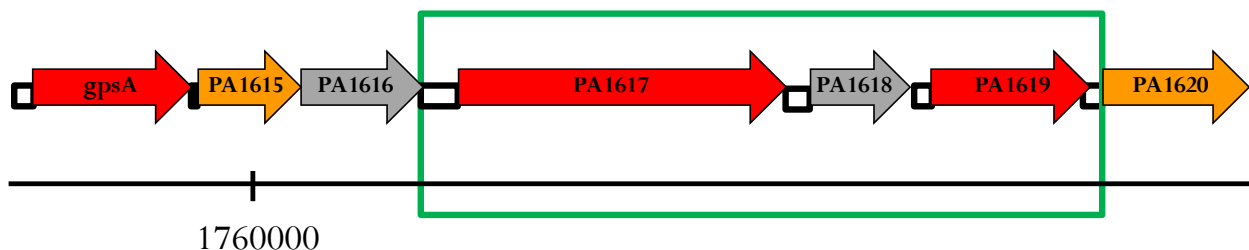


Figura 20. Contexto genómico del ORF PA1617. La flecha indica el gen u ORF correspondiente, la dirección de la transcripción y el nombre asignado. El recuadro en verde indica el operón formado por los ORFs PA1617, PA1618 y PA1619. Los recuadros entre flechas indican las regiones intergénicas; entre el ORF PA1616 y PA1617 es de 126 pares de bases (pb), entre los ORFs PA1617 y PA1618 es de 52 pb, entre PA1618 y PA1619 de 57 pb, y entre PA1619 y PA1620 de 40 pb. La línea en la parte inferior indica la posición en la secuencia del genoma.

Las anotaciones del ORF PA1617 en la página del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 indican que codifica una probable acil-CoA sintetasa de clase 3 (función propuesta para un determinado gen basado en la presencia de motivos o limitado a la homología de secuencias de un gen estudiado experimentalmente). El ORF PA1617 codifica un péptido de 555 aa y 61.4 kDa. El ORF PA1618 codifica una probable tioesterasa que contiene un motivo de HGG de clase 4 (función propuesta para homólogos de genes reportados previamente de función desconocida, o sin similitud a ninguna secuencia reportada), la proteína codificada es de 145 aa y 15.6 kDa. El ORF PA1619 codifica un probable regulador transcripcional de clase 4, es de 274 aa y su peso es de 22.1 kDa. Los ORFs adyacentes al operón son el ORF PA1616 que codifica una probable fosfohistidina fosfatasa de clase 4 y el ORF PA1620 codifica una probable proteína de membrana de clase 4 involucrada en el metabolismo y transporte de treonina, cuyas funciones no están relacionadas con el operón. En la región intergénica entre los ORFs PA1616 y PA1617 se predijo *in silico* la región promotora (materiales y métodos) (Figura 21).

```

      10      20      30      40      50      60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
GAAGCGCCTGGCGCAACGACTACAAACCGAAACATTTCCCGGCCTGCCTCCGGTTGGCTG
      -35
      70      80      90      100      110      120
TGATGGAATATTCGACCAAGCAAGTGCTTGGTCGATCTCCAGAACCAACAACGGAGG
      -10
...|...
CGGTAC

```

Figura 21. Secuencia de la región intergénica entre los ORFs PA1616 y PA1617 de *P. aeruginosa*, en recuadro se indican las cajas -10 y -35 del promotor. La secuencia para la caja -10 y la secuencia para la caja -35 se indican en los recuadros en verde.

En análisis *in silico* anterior indica que el ORF PA1617 de *P. aeruginosa* probablemente codifica la isoprenoil-CoA sintetasa. En lo sucesivo nos referiremos al ORF PA1617 como el gen *fadD3*.

7.2 Determinación de la participación de los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* en el metabolismo de isoprenoides acíclicos mediante mutantes simples y dobles

Teniendo como objetivo analizar la participación de la isoprenoil-CoA sintetasa en el catabolismo de isoprenoides acíclicos, se trabajó con las mutantes en los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* generadas por transposición (materiales y métodos). Se analizó la posición del transposón en cada mutante (Figura 22). En el caso de la mutante en el gen *fadD3* el transposón no afecta los motivos catalíticos. Además el transposón cuenta con un promotor (neomicina fosfotransferasa) y después de la región de inserción del transposón el gen contiene un codón de inicio de la traducción, por lo que podría codificar una enzima funcional de menor tamaño, debido a esta posibilidad, se interrumpió con un cassette de resistencia a gentamicina el gen *fadD3* para generar la mutante en el gen *fadD3* por recombinación homóloga, a la cual nos referiremos como la mutante *fadD3* R. Además, con la finalidad de eliminar un posible efecto de complementación entre estos tres genes y con el objetivo de determinar la

participación de cada uno, se generaron las dobles mutantes *fadD1-fadD3*, *fadD2-fadD3* y *fadD1-fadD2* (materiales y métodos).



Figura 22. Ubicación del transposón en las mutantes en los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* de *P. aeruginosa*. La flecha indica el gen u ORF y la dirección de la transcripción. La punta de flecha indica la posición del transposón; en color azul, el transposón *ISlacZ/hah* y en verde, *ISphoA/hah*. El zig-zag muestra discontinuidad. El recuadro, indica la región intergénica. El gen *fadD1* tiene un tamaño de 1689 nt y el transposón esta ubicado en la posición 1130, *fadD2* tiene un tamaño de 1689 nt y el transposón esta en la posición 717 y *fadD3* tiene un tamaño de 1668 nt y el transposón esta ubicado en la posición 459.

7.2.1 Obtención de las mutantes *fadD3* R, *fadD1-fadD3* y *fadD2-fadD3* por recombinación homóloga

El plásmido recombinante pGEM-T Easy-*fadD3* se utilizó para la interrupción del gen *fadD3* con un cassette de resistencia a gentamicina (Gm^R) obtenido del plásmido pBSL141. Para esto se realizó un análisis de restricción teórico del gen *fadD3* para elegir un sitio de restricción que estuviera en una región intermedia para propiciar eventos de recombinación homóloga, y que estuviera en los sitios múltiples de clonación situados a los extremos del cassette de Gm^R . El gen *fadD3* tiene un sitio único *XhoI* en la posición 995, por lo que el plásmido se digirió con esta endonucleasa para ligar en este sitio al cassette de Gm^R (Figura 23). La mezcla de ligación se utilizó para transformar a células competentes de *E. coli* JM101. Las clonas transformadas se seleccionaron en placas de ALB con ampicilina y gentamicina. A las clonas resistentes se les realizó aislamiento de DNA plasmídico y por electroforesis en gel de agarosa se confirmó que las clonas seleccionadas tenían el plásmido recombinante, el cual fue nombrado pGEM-T Easy-*fadD3*:: Gm^R . Posteriormente a los plásmidos obtenidos se les realizó análisis de restricción con *XhoI* para verificar la construcción. En todos los casos, el tamaño de los fragmentos coincidieron con los tamaños esperados de: 4,683 pb correspondientes a pGEM-T Easy-*fadD3* y de 900 pb correspondientes al cassette de Gm^R (Figura 24).

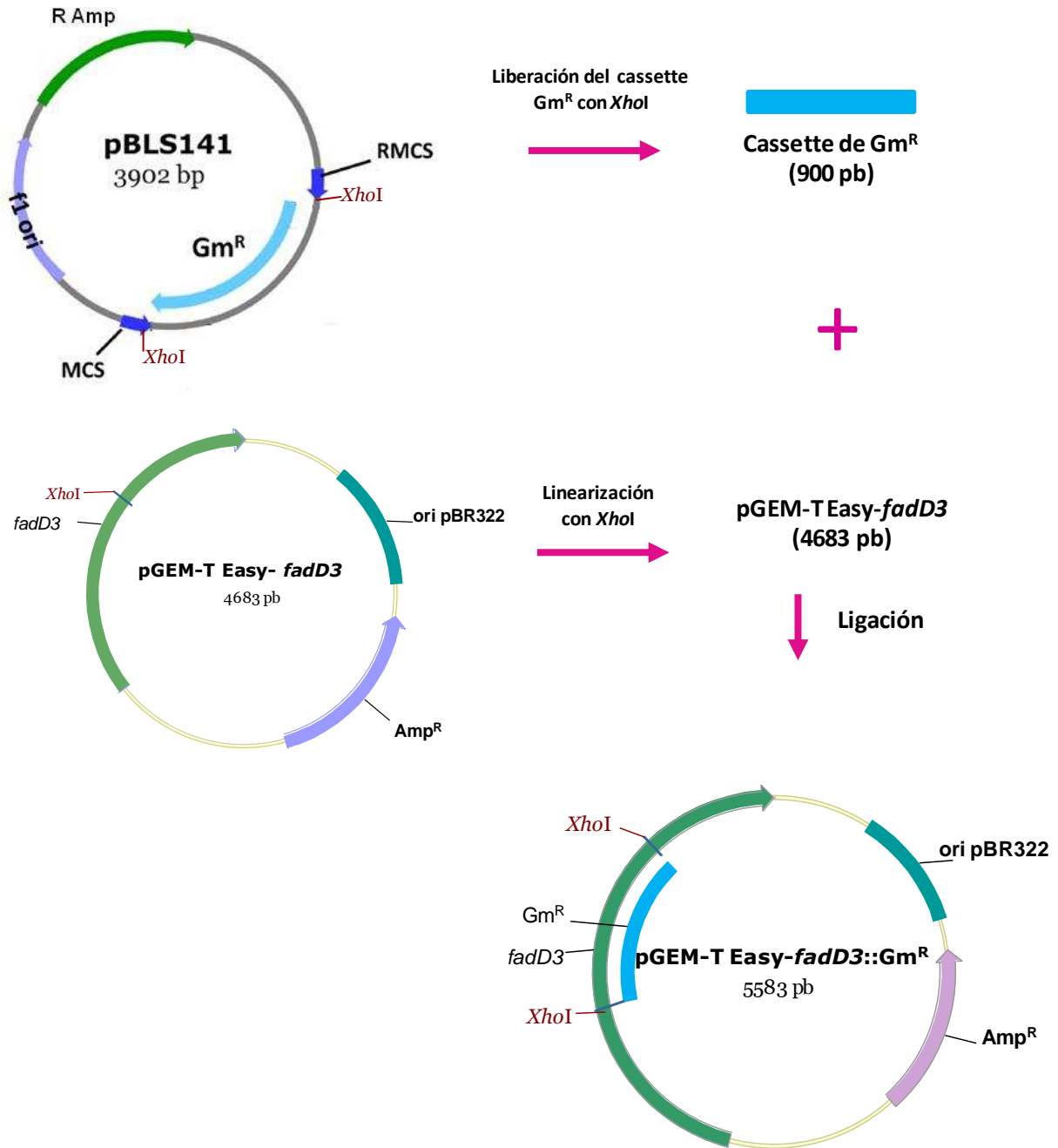


Figura 23. Estrategia experimental para la obtención del plásmido pGEM-T Easy-fadD3::Gm^R. Mediante la restricción de pBLS141 con la enzima *XhoI* se liberó el cassette de Gm^R de 900 pb, el cual se purificó como se indica en materiales y métodos. En plásmido pGEM-T Easy-fadD3 se linearizó con la enzima *XhoI*. Se llevó a cabo la ligación para obtener la construcción pGEM-T Easy-fadD3::Gm^R. *f1*, origen de replicación del fago filamentos *f1*. *ori pBR322*, origen de replicación de *E. coli*. *Amp^R*, resistencia a ampicilina. Gm^R, cassette de resistencia a gentamicina. *MCS*, sitio múltiple de clonación. *RMCS*, sitio múltiple de clonación reverso.

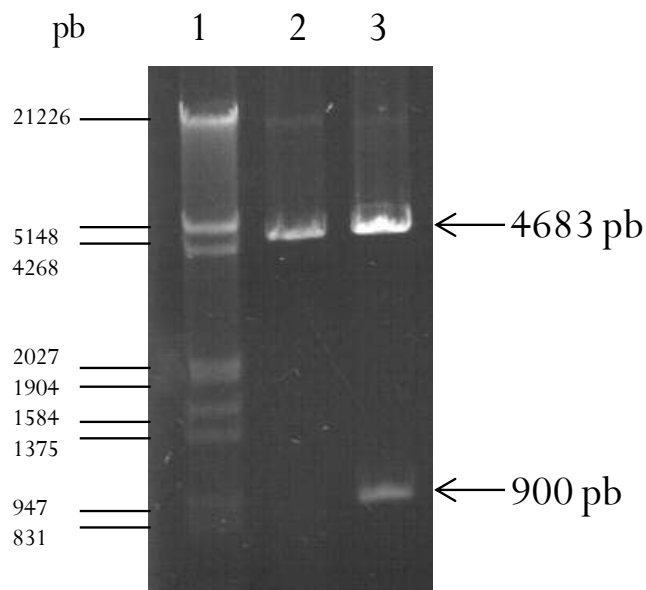


Figura 24. Análisis de restricción del plásmido pGEM-T Easy-*fadD3*::Gm^R. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos de restricción este plásmido. Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ (*EcoRI/HindIII*); carril 2, digestión con *XhoI* a pGEM-T Easy-*fadD3*; carril 3, digestión con *XhoI* a pGEM-T Easy-*fadD3*::Gm^R.

El plásmido pGEM-T Easy-*fadD3*::Gm^R se digirió parcialmente con la endonucleasa *EcoRI* para liberar el gen *fadD3* interrumpido con el cassette de Gm^R de un tamaño teórico de 2,568 pb, se cortó y purificó (materiales y métodos). Posteriormente, este fragmento se clonó en el plásmido pKOK4, el cual se linearizó con *EcoRI* para obtener el plásmido pKOK4-*fadD3*::Gm^R (Figura 25). La clonación en el plásmido pKOK4 fue necesaria debido a que tiene una región *mob* que promueve la movilización del plásmido a la cepa receptora. La mezcla de ligación fue transferida a células competentes de *E. coli* JM101, seleccionando las clonas resistentes a ampicilina y tetraciclina; posteriormente el plásmido pKOK4-*fadD3*::Gm^R se introdujeron por electroporación a *E. coli* S17-1, las cuales tienen en su cromosoma genes *tra* que participan en la transferencia del plásmido. A uno de los plásmidos obtenidos se les realizó análisis de restricción para verificar la clonación. Las endonucleasas utilizadas fueron *Bam*HI con la cual se obtuvieron los fragmentos correspondientes a 5 184, 2 758 y 994 pb, e *Hind*III, con la cual también se obtuvieron los fragmentos con los tamaños esperados de 6 524, 1 574 y 838 pb (Figura 26).

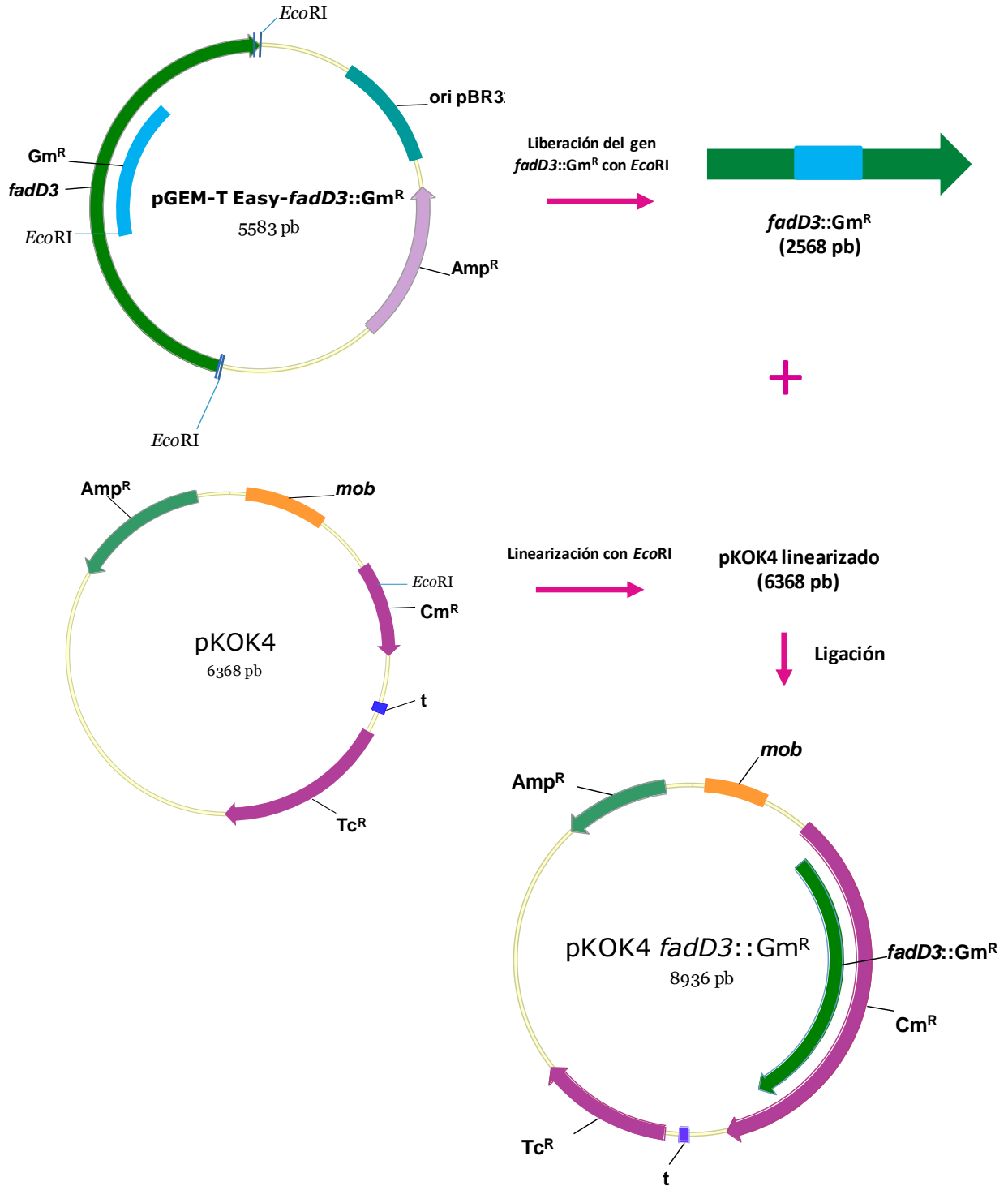


Figura 25. Estrategia experimental para la obtención del plásmido pKOK4-*fadD3*::Gm^R. Este plásmido se digirió de manera parcial con *EcoRI* para liberar el fragmento *fadD3*::Gm^R. El plásmido suicida pKOK4 se linearizó con *EcoRI* y se ligó el fragmento *fadD3*::Gm^R y así obtener el pKOK4-*fadD3*::Gm^R.

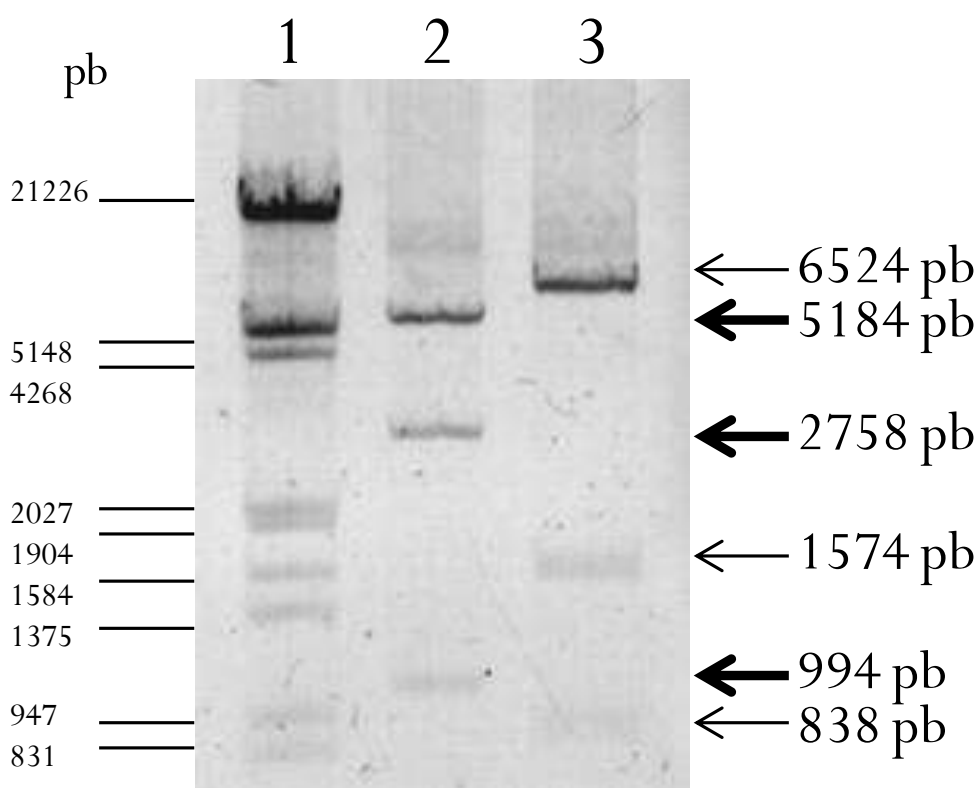


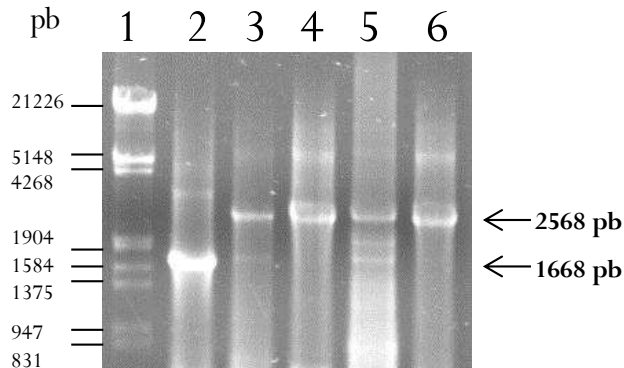
Figura 26. Análisis de restricción del plásmido pKOK4-*fadD3*::Gm^R. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos de restricción de pKOK4-*fadD3*::Gm^R. Carril 1, marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (*EcoRI/HindIII*); carril 2, digestión de pKOK4-*fadD3*::Gm^R con *Bam*HI (flecha gruesa); carril 3, digestión de pKOK4-*fadD3*::Gm^R con *HindIII* (flecha delgada).

El gen silvestre *fadD3* de la cepa receptora *P. aeruginosa* PAO1 se mutó por un evento de recombinación homóloga, introduciendo por conjugación triparental al fragmento *fadD3*::Gm^R del plásmido pKOK4-*fadD3*::Gm^R en *E. coli* S17-1 (materiales y métodos). Se realizaron tres conjugaciones por separado, utilizando diferentes cepas receptoras, en una de ellas, la cepa receptora fue la mutante por transposición en *fadD1* para generar la doble mutante *fadD1-fadD3*; en la segunda, la cepa receptora fue la mutante por transposición en el gen *fadD2* y se generó la doble mutante *fadD2-fadD3*; en una tercera conjugación, la cepa receptora fue la cepa silvestre *P. aeruginosa* PAO1 SR para generar la mutante simple *fadD3* R.

En el caso de las dobles mutantes, las transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a gentamicina, dada por el cassette de Gm^R con el que se interrumpió el gen *fadD3* y tetraciclina, resistencia dada por el transposón utilizado para la generación de la mutante en los genes *fadD1* o *fadD2*. En la mutante simple, las transconjugantes se seleccionaron por resistencia a gentamicina y estreptomycinina, resistencia dada por el cassette de Gm^R insertado y por la resistencia intrínseca de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 SR.

Para verificar que el gen mutado se integró en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 SR se amplificó al gen *fadD3* con oligonucleótidos específicos, utilizando como molde el ADN total de *P. aeruginosa* PAO1 SR, como control positivo, y ADN total de dos clonas recombinantes de cada una de las transconjugantes (materiales y métodos). Los resultados de la amplificación por PCR mostraron que en las cepas mutantes se obtuvo un fragmento de aproximadamente 900 pb adicionales al producto de la cepa silvestre, el cual fue el control positivo (Figura 25). Además de los fragmentos de interés, en el corrimiento electrofóretico del gel de agarosa se observan otros fragmentos los cuales son producto de uniones inespecíficas de los oligonucleótidos en otras regiones del genoma (Figura 27). El resultado nos indica que en estas cepas se llevó a cabo la recombinación sustituyendo el gen silvestre por el gen mutado.

A)



B)

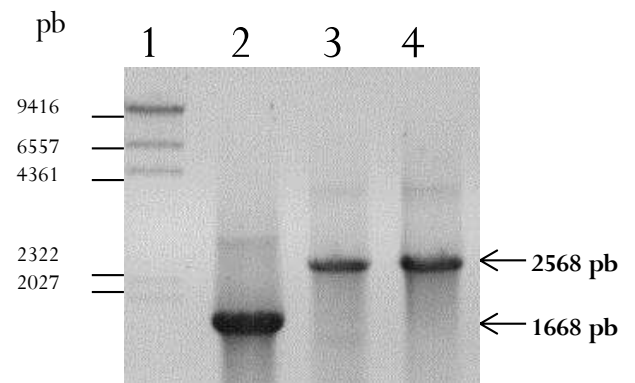


Figura 27. Verificación de la interrupción con el cassette de resistencia a gentamicina en el gen *fadD3* mediante PCR. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos amplificados. **A)** Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ (*EcoRI/HindIII*); carril 2, fragmento amplificado de *fadD3* en PAO1SR; carril 3, fragmento amplificado de *fadD3* en *fadD1-fadD3* colonia 1; carril 4, colonia 2; carril 5, fragmento amplificado de *fadD3* en *fadD2-fadD3* colonia 1; carril 4, colonia 2. **B)** Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ (*HindIII*); carril 2, fragmento amplificado de *fadD3* en PAO1SR; carril 3, fragmento amplificado *fadD3* en *fadD3 R* colonia 1; carril 4, colonia 2.

7.2.2 Obtención de la doble mutante *fadD1-fadD2* por recombinación homóloga

El gen *fadD2* se interrumpió con un cassette de Gm^R para generar la doble mutante *fadD1-fadD2* (materiales y métodos). Al igual que para la construcción de las mutantes donde se interrumpió el gen *fadD3*, también para la construcción de esta mutante fue necesario realizar un análisis de restricción teórico del gen *fadD2* para elegir el sitio de restricción en el cual se integró el cassette de Gm^R . La enzima elegida fue *PstI*, por lo que el cassette de Gm^R se liberó con *PstI* del plásmido pBSL141 y se purificó. Posteriormente el plásmido pTrcHis2A que tiene clonado al gen *fadD2* se digirió con la enzima *PstI*, el gen *fadD2* tiene 3 sitios *PstI* (posiciones 201 nt, 600 nt y 714 nt), por lo que se liberó un fragmento de 513 pb disminuyendo el tamaño del gen a 1 176 pb, y por consiguiente el cassette de Gm^R se clonó en el sitio *PstI* de *fadD2* (Figura 28). La mezcla de ligación se utilizó para transformar a células competentes de *E. coli* JM101. Las clonas transformadas se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina y gentamicina. A las clonas resistentes se les realizó aislamiento de DNA plasmídico y por electroforesis en gel de agarosa se confirmó que las clonas tenían el plásmido recombinante, el cual se nombró pTrcHis2A-*fadD2*:: Gm^R . A uno de los plásmidos recombinantes se le realizó análisis de restricción para verificar la construcción, se realizaron tres reacciones; *HindIII*, *BamHI* y la mezcla de *BamHI* e *HindIII*, en todos los casos los tamaño teóricos corresponden con los tamaños observados en el gel de agarosa (Figura 29).

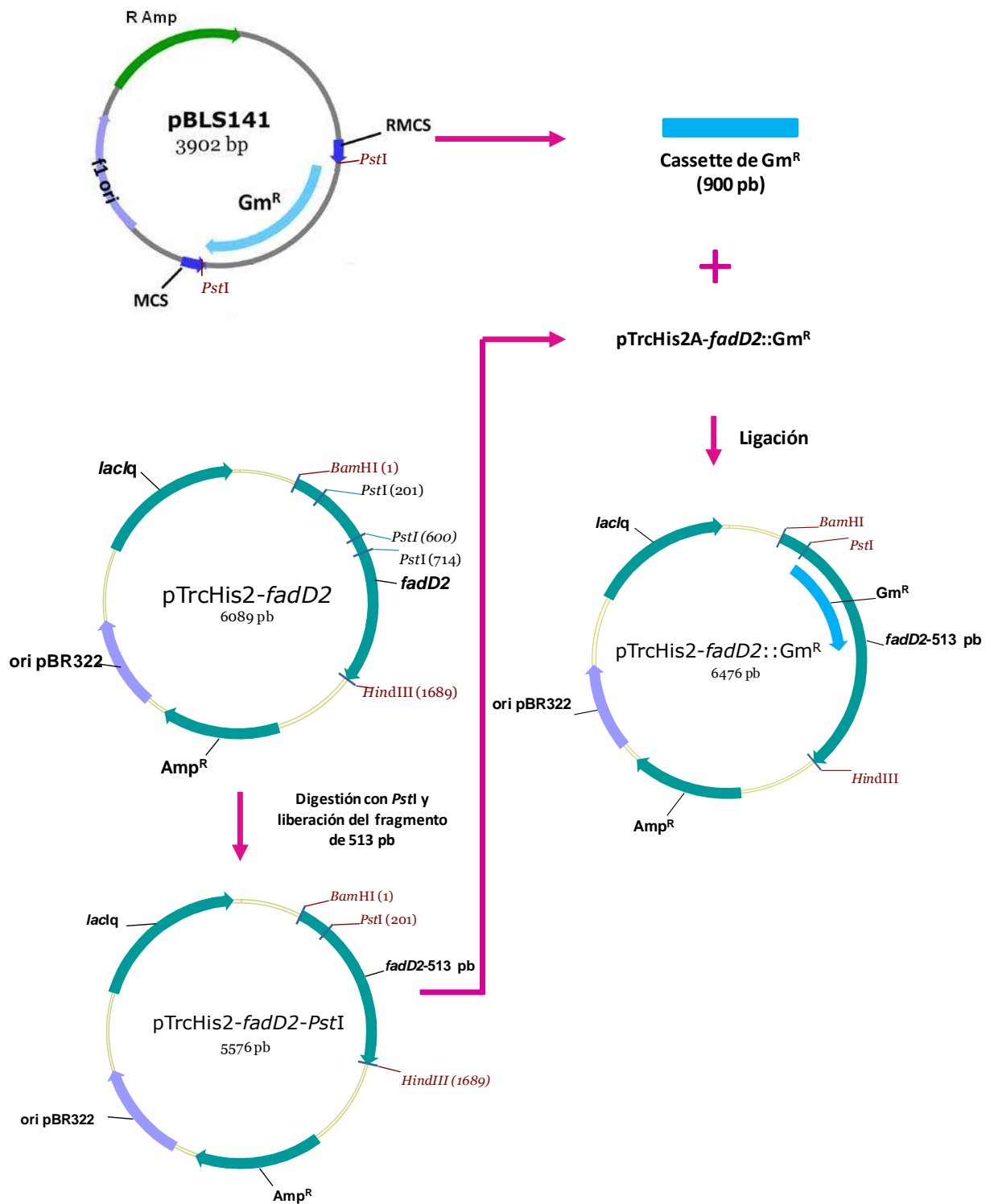


Figura 28. Estrategia experimental para la obtención del plásmido pTrcHis2-*fadD2*::Gm^R. El gen *fadD2* se interrumpió con el cassette de Gm^R liberado con *PstI* del plásmido pBSL141. Posteriormente el plásmido pTrcHis2A que tiene clonado al gen *fadD2* se digirió con la enzima *PstI*. El gen *fadD2* contiene 3 sitios *PstI* (posiciones 201, 600 y 714) , por lo que se liberó un fragmento de 513 pb disminuyendo el tamaño del gen a 1 176 pb, el plásmido linearizado se purificó y el cassette de Gm^R se clonó en el sitio *PstI* de *fadD2*.

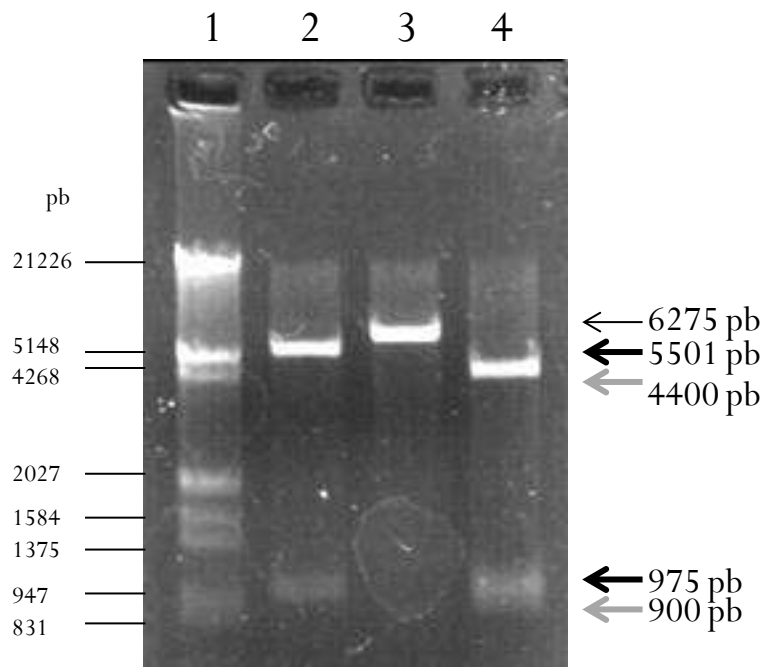


Figura 29. Análisis de restricción pTrcHis2A-*fadD2*::Gm^R. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos de restricción de este plásmido. Carril 1, marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (*EcoRI/HindIII*); carril 2, digestión de pTrcHis2A-*fadD2*::Gm^R con *HindIII* (5 501 y 975 pb, flecha gruesa); carril 3, digestión de pTrcHis2A-*fadD2*::Gm^R con *BamHI* (6 275 y 201 pb, flecha delgada); carril 4, digestión de pTrcHis2A-*fadD2*::Gm^R con *BamHI* e *HindIII* (4 400, 975, 900 y 201 pb, flecha gris).

Al plásmido pTrcHis2-*fadD2*::Gm^R, se le realizó una digestión parcial con las endonucleasas *Hind*III y *Bam*HI para liberar el fragmento *fadD2* interrumpido con el cassette de Gm^R de un tamaño teórico de 2,076 pb; éste fragmento se cortó y purificó como se indica en materiales y métodos. El plásmido pKOK4, también se linearizó con *Hind*III y *Bam*HI para clonar el fragmento *fadD2*::Gm^R, para obtener el plásmido pKOK4-*fadD2*::Gm^R (Figura 30). La mezcla de ligación se transfirió a células competentes de *E. coli* JM101, seleccionando las clonas resistentes a ampicilina y cloranfenicol. Posteriormente el plásmido pKOK4-*fadD2*::Gm^R se introdujo por electroporación a la cepa de *E. coli* S17-1. Adicionalmente, se realizó análisis de restricción para verificar la construcción (Figura 31).

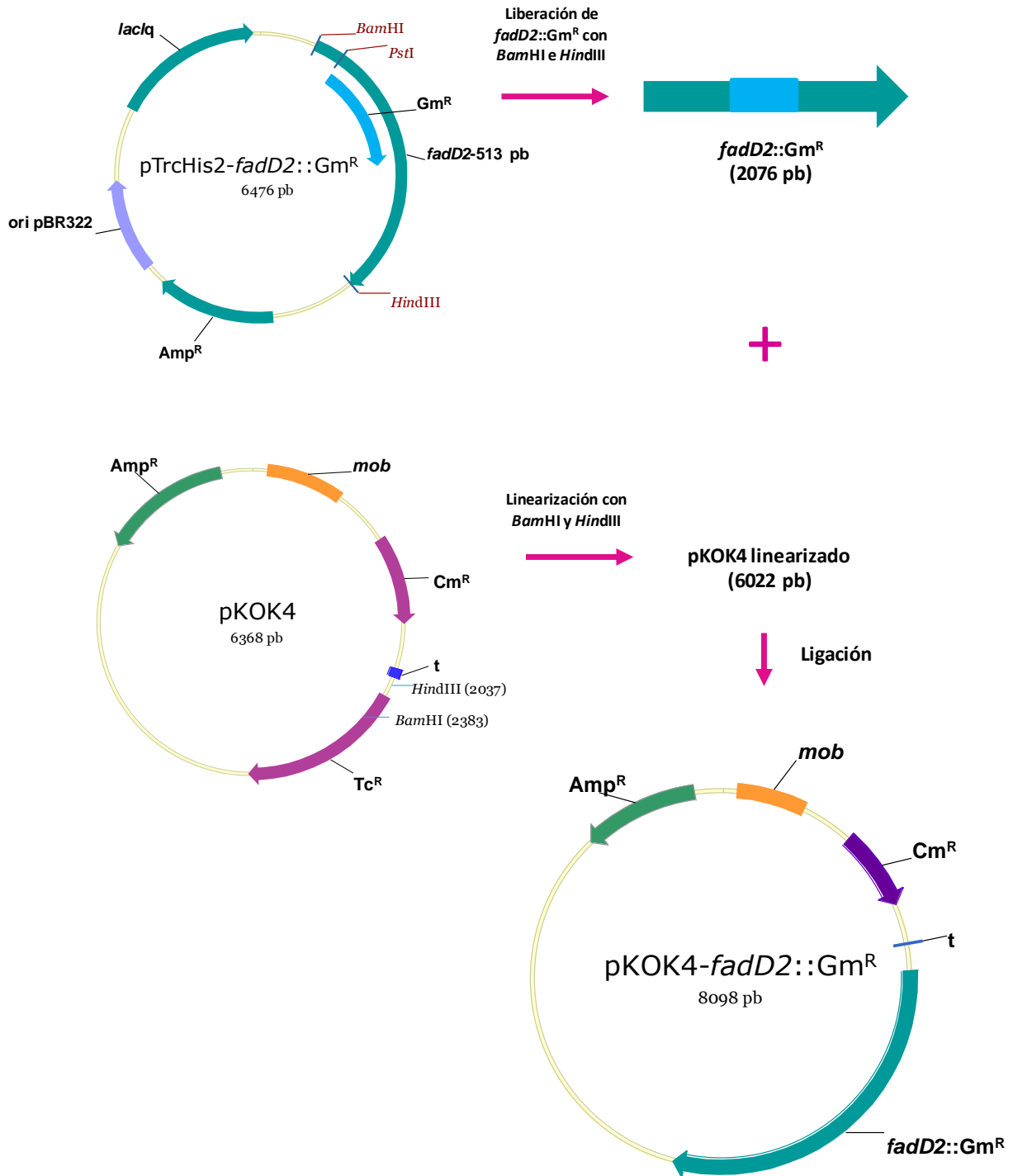


Figura 30. Esquema de la estrategia experimental para la obtención del plásmido pKOK4-*fadD2*::Gm^R. El fragmento *fadD2*::Gm^R se liberó llevando a cabo una restricción parcial y se purificó, el tamaño de este fragmento es de 2,076 pb. Posteriormente este fragmento se clonó en el vector pKOK4 previamente linearizado con las enzimas *Hind*III y *Bam*HI que liberan un fragmento de 346 pb, donde se ligó el fragmento para obtener la construcción pKOK4-*fadD2*::Gm^R.

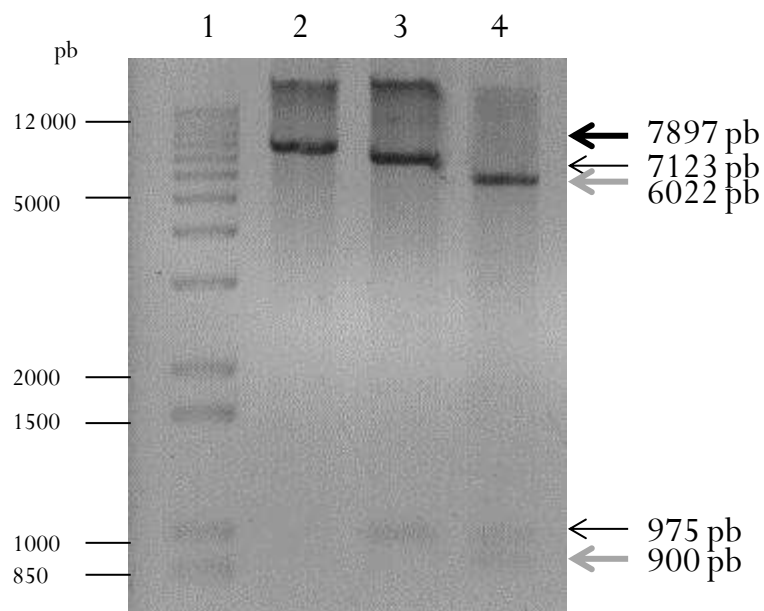


Figura 31. Análisis de restricción pKOK4-*fadD2*::Gm^R. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos liberados de este plásmido. Carril 1, marcador de tamaño molecular, 1 Kb; carril 2, digestión con *Bam*HI (7 897 y 201 pb, flecha gruesa); carril 3, digestión con *Hind*III (7 123 y 975 pb, flecha delgada), digestión con *Bam*HI e *Hind*III (6 022, 975, 900 y 201 pb, flecha gris).

El gen silvestre *fadD2* de la cepa la mutante por transposición en el gen *fadD1*, se mutó por un evento de recombinación homóloga introduciendo por conjugación triparental al fragmento *fadD2*::Gm^R en el plásmido pKOK4-*fadD2*::Gm^R en *E. coli* S17-1. Las transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a gentamicina dada por el cassette con el que se interrumpió el gen *fadD2* y tetraciclina dada por el transposón utilizado para la generación de la mutante *fadD1*. Al igual que con las mutantes *fadD1-fadD3*, *fadD2-fadD3* y *fadD3 R*, la mutación se verificó mediante amplificación de PCR. El gen *fadD2* se amplificó con los oligonucleótidos específicos utilizando ADN total de *P. aeruginosa* PAO1 SR como control positivo y ADN total de dos clonas recombinantes. Los resultados mostraron que en la cepa mutante se amplificó un fragmento mayor de aproximadamente 400 pb al amplificado en la cepa silvestre (Figura 32). La diferencia fue de 400 pb y no de 900 pb como en el caso de las mutantes anteriores debido a que la digestión con la enzima de restricción *Pst*I liberó 513 pb

del gen *fadD2*, lo cual nos sugiere que en estas cepas se llevó a cabo la recombinación y el gen mutado sustituyó al gen silvestre.

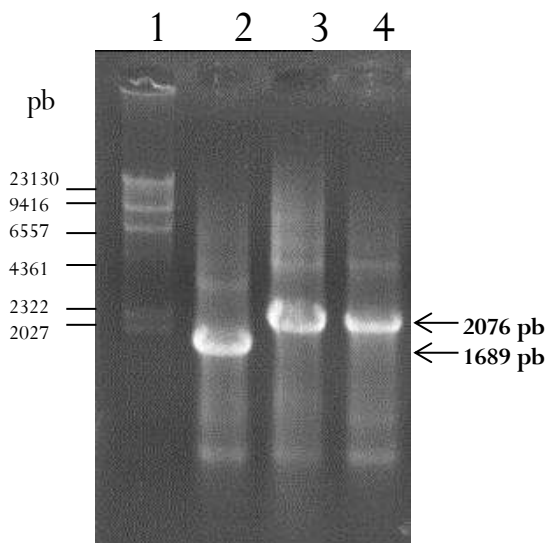


Figura 32. Verificación de la interrupción en el gen *fadD2* con el cassette de Gm^R mediante PCR. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos amplificados. Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ (*HindIII*); carril 2, fragmento amplificado de *fadD2* en PAO1 SR; carril 3, fragmento amplificado *fadD2* en *fadD1-fadD2* colonia 1; carril 4, colonia 2.

7.2.3 Crecimiento de las mutantes en los genes *fadD3*, *fadD2* y *fadD1* en diferentes fuentes de carbono

Las mutantes obtenidas por recombinación homóloga y las mutantes por transposición se crecieron con la finalidad de probar la asimilación de compuestos de la vía general de isoprenoides acíclicos: citronelol, ácido citronélico, geraniol y ácido geránico; además se probaron ácido isovalérico y la leucina, compuestos de la vía de leucina-isovalerato y octanol, compuesto utilizado como control de catabolismo de alcanos lineales. En la vía convergente de la leucina existe un paso de activación para la formación isovaleril-CoA, razón por la cual resultó interesante determinar si los genes *fadD* están involucrados en la vía LIU.

Las cepas mutantes de *P. aeruginosa* se crecieron en medio mínimo durante 10 días a 30 °C con las diferentes fuentes de carbono como es descrito en materiales y métodos. En la Tabla X se muestra el registro del crecimiento a las 48 horas.

Tabla X. Crecimiento de mutantes de *P. aeruginosa* con diferentes fuentes de carbono

	PAO1	<i>fadD1</i>	<i>fadD2</i>	<i>fadD3</i>	<i>fadD3 R</i>	<i>fadD1-fadD3</i>	<i>fadD2-fadD3</i>	<i>fadD1-fadD2</i>
Octanol	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
Citronelol	XXXX	XXX	XX	XXX	X	X	X	XXXX
Ácido citronélico	XXX	XX	XX	XX	X	X	X	XXX
Geraniol	XX	X	X	XX	X	X	X	XX
Ácido geránico	XX	XXX	XXX	XXX	X	X	X	XX
Leucina	XXXX	XXX	XXX	XXX	XXXX	XXX	XXX	XXXX
Ácido isovalérico	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XX	X

La asimilación de los compuestos se determinó por crecimiento de las cepas en placas de medio mínimo M9 con el compuesto indicado como única fuente de carbono y energía, incubando a 30 °C por 48 horas. El nivel de crecimiento se representó con X siendo el máximo crecimiento XXXX.

A este tiempo el octanol las cepas mutantes presentaron crecimiento similar al de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 SR, lo que significa que la mutación o mutaciones por sí misma no afectan el crecimiento en una fuente de carbono y energía que no está relacionada con la vía en estudio, es decir, estos genes no participan en la degradación de n-alcanoles. Por otro lado, se observó que el crecimiento en citronelol y ácido citronélico se afectó en las mutantes *fadD3 R* y en las dobles mutantes *fadD1-fadD3* y *fadD2-fadD3*. El crecimiento en geraniol y ácido geránico resultó ser lento para todas las cepas incluyendo la cepa control. En leucina, el crecimiento no se afectó considerablemente y en ácido isovalérico el crecimiento fue disminuído en las dobles mutantes *fadD2-fadD3* y *fadD1-fadD2*. Además, la mutante *fadD3* que

fue generada por la interrupción de un transposón tuvo un mayor crecimiento en citronelol y ácido citronélico que la mutante *fadD3* R que se generó por la interrupción con el cassette de Gm^R. De acuerdo a los registros realizados durante los 10 días de duración del experimento se observó que el crecimiento máximo en geraniol y ácido geránico fue a los 6 días y en el caso de ácido isovalérico, la doble mutante *fadD2-fadD3* se observó crecimiento similar al de la cepa control a partir del día 5 y para el caso de la doble mutante *fadD1-fadD2* presentó crecimiento similar al control a partir del día 9.

7.2.4 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en los genes *fadD*

La finalidad de realizar cinéticas de crecimiento fue tener datos cuantitativos del grado de afectación del crecimiento en las mutantes al ser crecidas en medio mínimo M9 con citronelol, ácido citronélico y ácido isovalérico.

7.2.4.1 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en los genes *fadD* en citronelol

El crecimiento utilizando como fuente de carbono y energía citronelol se vió disminuido en todas las cepas mutantes respecto al control, sin embargo, el fenotipo puede ser clasificado en dos grupos (Figura 33). Un grupo incluye a las mutantes *fadD1*, *fadD2*, *fadD3* y la doble mutante *fadD1-fadD2*, las cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control y un segundo grupo donde prácticamente no hubo crecimiento, en el que se encuentran la mutante simple *fadD3* R y las dobles mutantes *fadD1-fadD3* y *fadD2-fadD3*. Al igual que en medio sólido, la mutante en *fadD3* generada por transposición presentó mejor crecimiento que la mutante *fadD3* R. Los resultados anteriores indican la participación de los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* en el catabolismo del citronelol y sugieren que el gen *fadD3* o el operón donde se encuentra éste, en caso de demostrarse un efecto polar, juega un papel esencial en esta ruta.

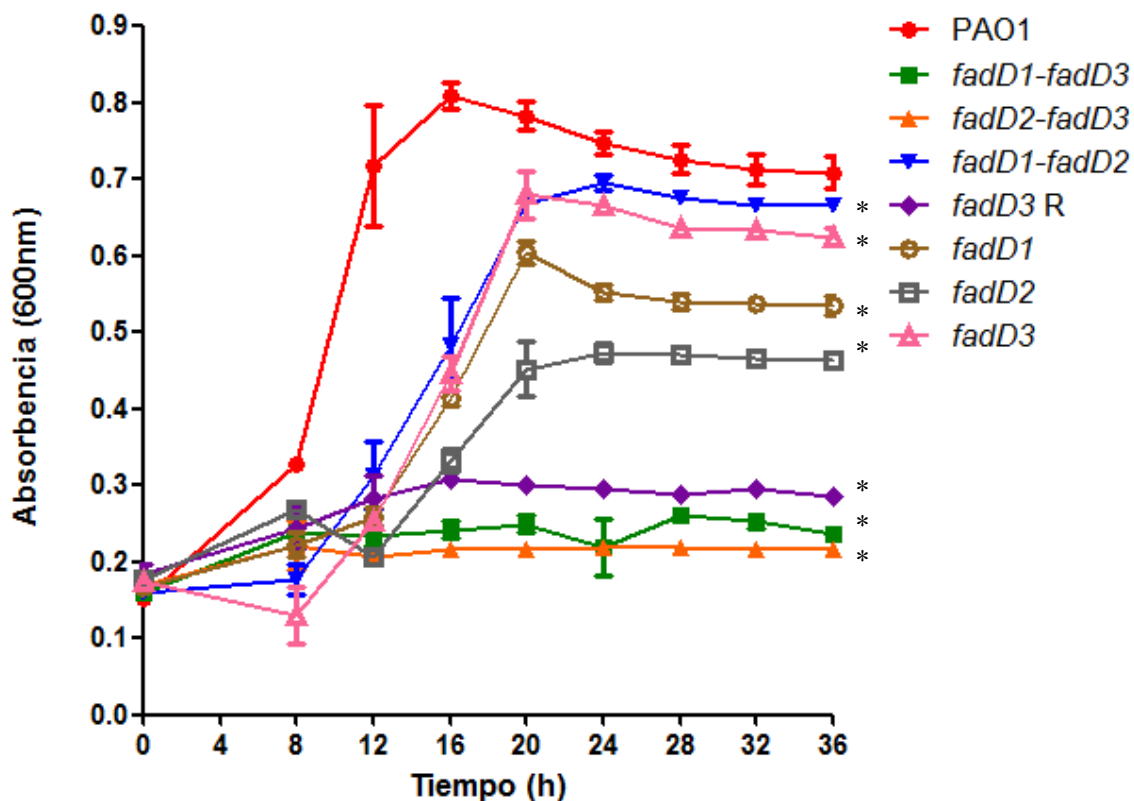


Figura 33. Cinéticas de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en los genes *fadD* en citronelol. Las cepas se crecieron en medio mínimo M9, a 30°C, con citronelol al 0.075%, en agitación constante (150 rpm), n=3, ANOVA, Bonferroni, P<0.05.

7.2.4.2 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en los genes *fadD* en ácido citrónico

Un comportamiento similar al observado en la cinética de crecimiento teniendo como fuente de carbono y energía al citronelol ocurrió en ácido citrónico (Figura 34). Sin embargo el efecto fue más contundente debido a que el ácido citrónico es una fuente de carbono más disponible en comparación con el citronelol, que necesita ser oxidado a ácido citrónico, el cual es el sustrato de los productos proteicos de los genes en estudio. Los resultados confirmaron la participación de los tres genes *fadD* en la vía en estudio y sugieren nuevamente que el gen *fadD3*, o el operón, es esencial para el crecimiento de *P. aeruginosa* en este tipo de compuestos como única fuente de carbono y energía.

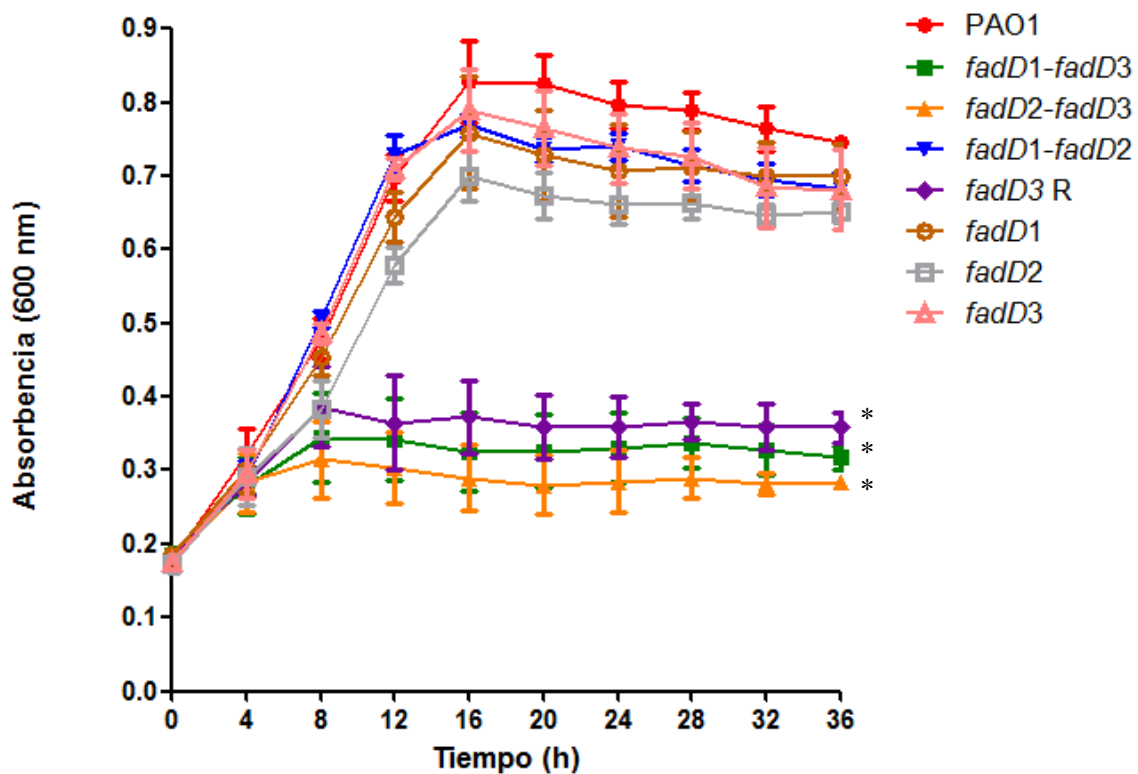


Figura 34. Cinética de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en ácido citrónico. Las cepas se crecieron en medio mínimo M9, a 30°C, con ácido citrónico al 0.075%, en agitación constante (150 rpm), n= 3, ANOVA, Bonferroni, P<0.05.

7.2.4.3 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en los genes *fadD* en ácido isovalérico

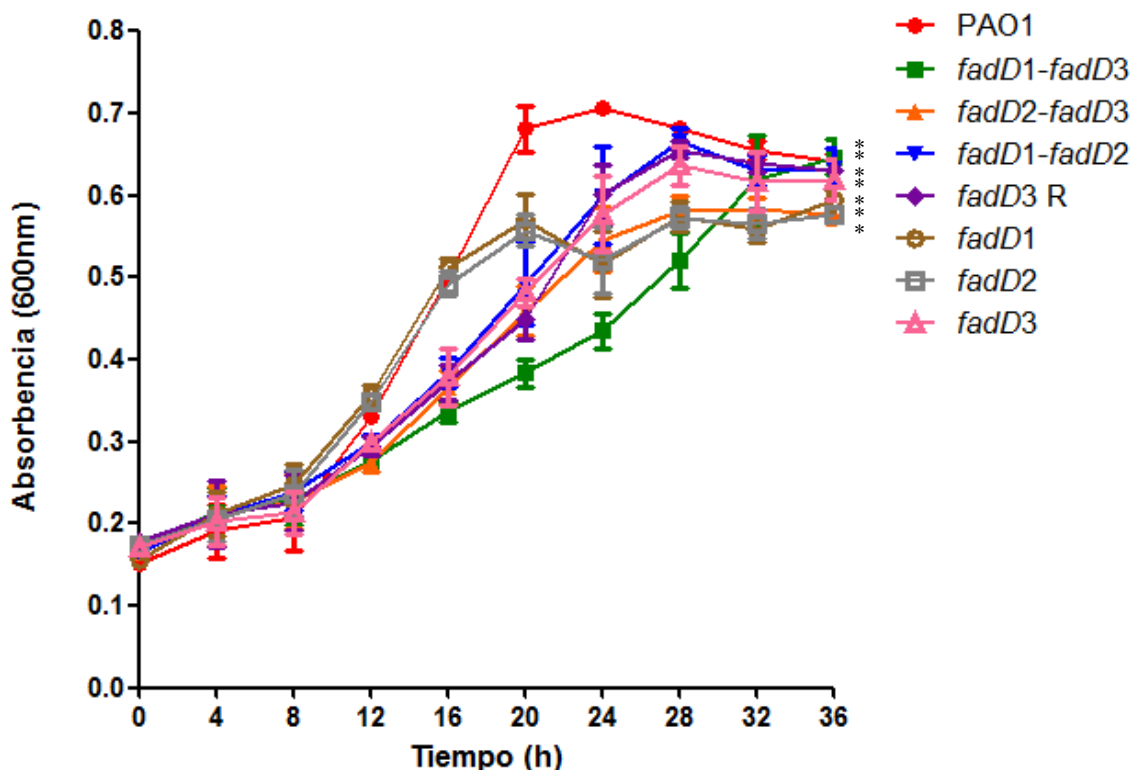


Figura 35. Cinética de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en ácido isovalérico. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo M9, a 30°C, con ácido isovalérico al 0.075%, en agitación constante (150 rpm), n = 3, ANOVA, Bonferroni, P<0.05.

En la cinética de crecimiento de las mutantes en ácido isovalérico se observó disminución en el crecimiento de todas las cepas mutantes respecto a la cepa control, las diferencias fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, se observaron diferencias en la disminución del crecimiento en las distintas cepas (Figura 35). Por ejemplo, la doble mutante *fadD1-fadD3* fue la de menor crecimiento, mientras que *fadD1* y *fadD2* presentaron un crecimiento muy similar entre sí. Por otra parte, las mutantes *fadD1-fadD2*, *fadD3 R* y *fadD3* también presentaron un crecimiento muy similar entre ellas pero diferente al crecimiento de las mutantes *fadD1* y *fadD2*. Aunque los resultados sugieren la participación de *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* en la vía de leucina-isovalerato (LIU), ninguno de estos genes juega un papel esencial.

7.2.4.4 Parámetros de crecimiento de las mutantes que utilizaron como fuente de carbono y energía citronelol, ácido citronélico y ácido isovalérico

Teniendo como finalidad analizar matemáticamente los datos graficados en las Figuras 33, 34 y 35, se procedió a realizar el cálculo de la velocidad de crecimiento máxima (V_{max}) y del tiempo de duplicación (T_D) a partir de la fase exponencial de cada cinética de crecimiento (Tabla XI).

Tabla XI. V_{max} y T_D de las cinéticas de crecimiento de mutantes en citronelol, ácido citronélico y ácido isovalérico

CEPA	Citronelol			Ácido citronélico			Ácido isovalérico		
	V_{max} (h^{-1})	T_D (h)	R^2	V_{max} (h^{-1})	T_D (h)	R^2	V_{max} (h^{-1})	T_D (h)	R^2
PAO1	0.0600	11.5525	0.8865	0.0434	15.9711	0.9915	0.0398	17.4158	0.9932
<i>fadD1-fadD3</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0.0156	44.4325	0.9858
<i>fadD2-fadD3</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0.0191	36.2904	0.9853
<i>fadD1-fadD2</i>	0.0411	16.8649	0.9956	0.0416	16.6622	0.9351	0.0225	30.8065	0.992
<i>fadD3R</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0.0225	30.8065	0.9831
<i>fadD1</i>	0.0326	21.2622	0.9317	0.0392	17.6823	0.9921	0.028	24.7553	0.9748
<i>fadD2</i>	0.0308	22.5048	0.9997	0.0356	19.4704	0.9826	0.0276	25.1140	0.9815
<i>fadD3</i>	0.0461	15.0357	0.9830	0.0426	16.2711	0.9697	0.0218	31.7957	0.9962

Los parámetros cinéticos se calcularon con regresión lineal en fase exponencial, donde la pendiente es la velocidad máxima (V_{max}) y el tiempo de duplicación $T_D = (\ln 2) / V_{max}$. R^2 , constante de correlación; NC, no crecimiento.

En las cepas mutantes donde hubo crecimiento teniendo como fuente de carbono y energía citronelol y ácido citronélico, las velocidades máximas fueron menores a la cepa control y el tiempo de duplicación es mayor. Se aprecia que cuando comparamos cada una de las cepas en citronelol contra ácido citronélico los valores de velocidad máxima y tiempo de duplicación son similares. Los datos confirman la participación de los tres genes *fadD* en la vía en estudio. En ácido isovalérico todas las cepas mutantes presentaron crecimiento, aunque mostraron velocidades de crecimiento disminuidas y tiempos de duplicación incrementados respecto al

control; sin embargo, respecto al citronelol y ácido citronélico la velocidad máxima fue menor y el tiempo de duplicación mayor, lo cual sugiere la participación de estos tres genes en la vía degradativa de leucina/isovalerato.

7.2.4.5 Cinéticas de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en los genes *fadD* en ácidos grasos de aceite de aguacate

Con el objetivo de determinar si el gen *fadD3* está involucrado en el catabolismo de ácidos grasos de cadena lineal se realizó cinética de crecimiento teniendo como fuente de carbono y energía ácidos grasos de aceite de aguacate el cual está compuesto por ácidos mirístico ($C_{14:0}$), palmítico ($C_{16:0}$), palmitoléico ($C_{16:1}^{\Delta 9}$), esteárico ($C_{18:0}$), oleico ($C_{18:1}^{\Delta 9}$), y linoléico ($C_{18:2}^{\Delta 9,12}$) (Alvizouri y Rodríguez, 2009) (Figura 36).

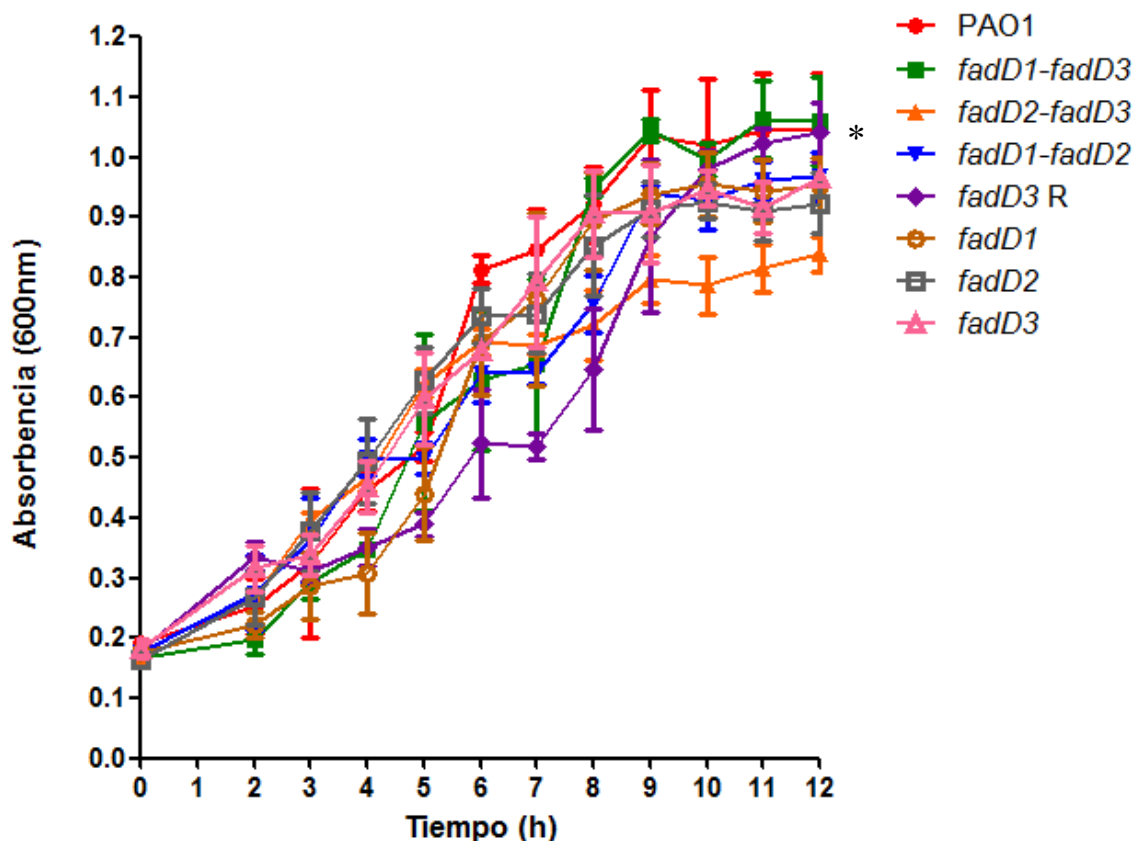


Figura 36. Cinética de crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* en aceite de aguacate. Las cepas se crecieron en medio mínimo M9, a 30°C, con aceite de aguacate al 0.075%, en agitación constante (150 rpm), n = 3, ANOVA, Bonferroni, P<0.05.

Las mutantes tuvieron crecimientos semejantes al control, a excepción de la mutante *fadD3* R que presentó diferencias estadísticamente significativas en fase exponencial, sin embargo, no es posible observar un fenotipo de afectación en las distintas mutantes debido al efecto de complementación de los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3*, por lo que no es posible establecer la participación de *fadD3* de manera contundente en el metabolismo de ácidos grasos.

7.2.4.6 Parámetros de crecimiento de las mutantes que utilizaron como fuente de carbono y energía aceite de aguacate

Tabla XII. V_{\max} y T_D de las cinéticas de crecimiento de mutantes en aceite de aguacate

Cepa	Ácidos grasos		
	V_{\max} (h ⁻¹)	T_D (h)	R ²
PAO1	0.0981	7.0657	0.9333
<i>fadD1-fadD3</i>	0.1053	6.5826	0.9522
<i>fadD2-fadD3</i>	0.0580	11.9508	0.887
<i>fadD1-fadD2</i>	0.0794	8.7298	0.9668
<i>fadD3</i> R	0.0862	8.0412	0.9154
<i>fadD1</i>	0.0954	7.2657	0.9257
<i>fadD2</i>	0.0751	9.2297	0.9257
<i>fadD3</i>	0.0786	8.8187	0.9273

La cinética de crecimiento presentó velocidades máximas y tiempos de duplicación de las mutantes similares respecto al control (Tabla XII). Lo cual indicó la participación compensatoria de *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* en la degradación de ácidos grasos.

7.3 Expresión de la proteína FadD3 de *P. aeruginosa* PAO1

7.3.1 Clonación de *fadD3* de *P. aeruginosa* PAO1

Una vez probada la participación del gen *fadD3* en el metabolismo del citronelol, la siguiente etapa fue determinar la función enzimática de la proteína codificada por este gen. Para lograr lo anterior se llevó a cabo la expresión del producto proteico del gen *fadD3*. De acuerdo a la secuencia nucleotídica reportada en la página del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>), se diseñaron oligonucleótidos específicos y se amplificó el gen *fadD3* mediante PCR, como se describió en materiales y métodos. Por corrimiento electroforético en gel de agarosa se corroboró la amplificación del fragmento de 1,668 pb (Figura 37A), este fragmento se purificó y clonó en el vector de clonación para productos de PCR, pGEM-T Easy (Figura 23). Las clonas transformadas se seleccionaron en placas de agar LB IPTG-Xgal-Amp, eligiendo las clonas blancas, resistentes a ampicilina. Una vez obtenidas estas clonas se les realizó aislamiento de DNA plasmídico y mediante digestión enzimática empleando las endonucleasas *Bam*HI, *Kpn*I y *Pst*I se comprobó la presencia del fragmento de ADN mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa. Observándose los fragmentos esperados de 1223 pb en la digestión con *Pst*I y *Bam*HI, y de 490 pb en la digestión con *Kpn*I (Figura 37B). A este plásmido recombinante se le denominó pGEM-T Easy-*fadD3*.

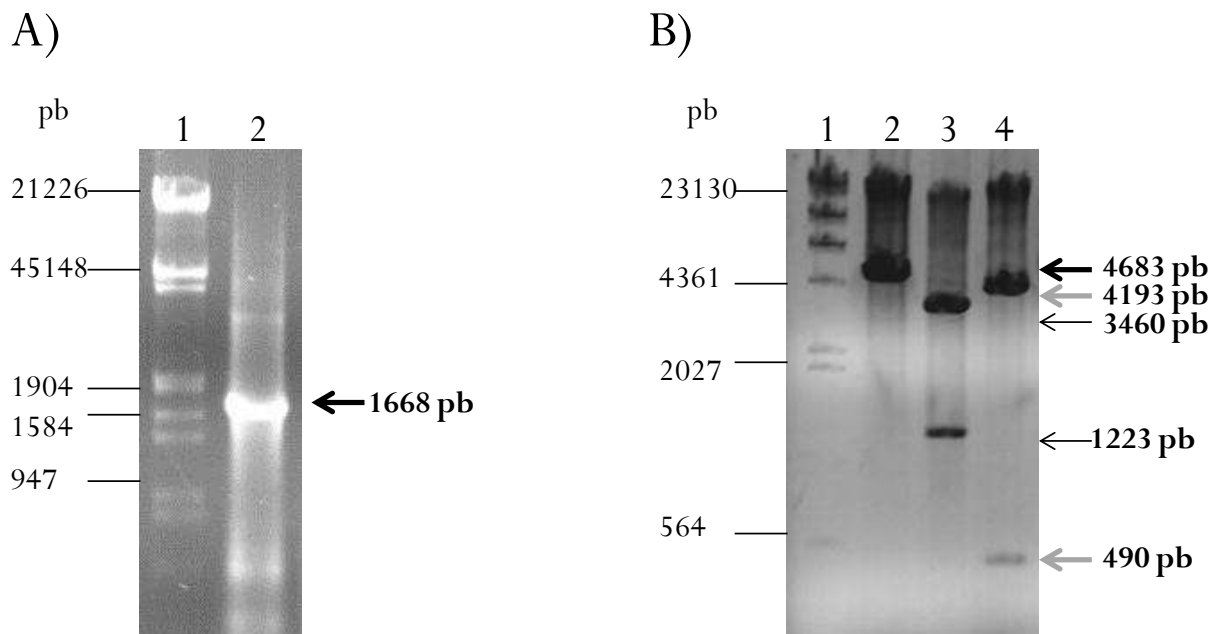


Figura 37. Amplificación y clonación del gen *fadD3* de *P. aeruginosa* PAO1. **A)** Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa del gen *fadD3* amplificado. Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ *HindIII*; carril 2, fragmento de ADN amplificado correspondiente al gen *fadD3*. **B)** Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos de restricción de pGEM-T Easy-*fadD3*. Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ *HindIII*; carril 2, digestión con *BamHI* (4 683 pb, flecha gruesa); carril 3, digestión con *BamHI* y *PstI* (3 460 y 1 223 pb, flecha delgada); carril 4; digestión con *KpnI* (4 193 y 490 pb, flecha gris).

7.3.2 Subclonación del gen *fadD3* de *P. aeruginosa* PAO1

El gen *fadD3* se subclonó en los vectores de expresión proteínas recombinantes en *E. coli* pTrcHis2A y pCFDuet, con la finalidad de obtener la proteína FadD3 en cantidad suficiente para determinar actividad enzimática. Para ello el plásmido pGEM-T Easy-*fadD3* se digirió con *BamHI* e *HindIII*, para liberar el fragmento correspondiente al gen *fadD3*, el cual se purificó y posteriormente ligó a cada vector, los cuales se linearizaron a su vez con *BamHI* e *HindIII* (materiales y métodos). La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* JM101 y las clonas se seleccionaron mediante el marcador de selección, en el caso de pTrcHis2A, resistencia a ampicilina, y en el caso de pCFDuet, resistencia a estreptomycin. El plásmido pTrcHis2A le añade una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal (Figura 38A) y el plásmido pCFDuet agrega una etiqueta de 6 histidinas en extremo amino terminal de la proteína recombinante FadD3 (Figura 39A). Se construyeron ambos plásmidos sobre-expresantes ante la posibilidad de que la etiqueta de histidinas pudiera afectar la actividad o estabilidad de la proteína (Terpe, 2003). De las colonias obtenidas fue aislado ADN plasmídico y se realizó análisis de restricción a la construcción pTrcHis2A-*fadD3* con *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *KpnI* y *XhoI*. En la digestión con *HindIII* se espera un fragmento de 6 068 pb, y la digestión con *HindIII* y *BamHI* liberó un fragmento correspondiente al gen de un tamaño teórico de 1 668 pb y el fragmento de 4 400 pb correspondiente al vector (Figura 38B). La digestión con *HindIII*, *BamHI* y *PstI* liberó los fragmentos de 4 400, 1 223 y 445 pb, debido a que *PstI* tiene un sitio en el gen *fadD3*; la digestión con las enzimas *HindIII*, *BamHI* y *KpnI* liberó los fragmentos de 4 400, 949, 490 y 229 pb, *KpnI* tiene dos sitios en el gen *fadD3*. Mientras que la digestión

con *HindIII*, *BamHI* y *XhoI* liberaron los fragmentos de 4 400, 994 y 674 pb debido a que *XhoI* tiene un sitio en el gen *fadD3* (figura 38B y C). Las endonucleasas *HindIII*, *BamHI*, *ApaI*, *MluI*, *PstI* y *KpnI* se utilizaron para el análisis de restricción en pCFDuet-*fadD3*. *ApaI*, *MluI* y *KpnI* escinden en el plásmido mientras que al igual que en el plásmido anterior *HindIII* y *BamHI* liberan el gen *fadD3* y los sitios de restricción *PstI* y *KpnI* se encuentran en este (Figura 39B). La digestión con *ApaI*, *HindIII* y *BamHI* liberó los fragmentos de 2 757, 1 668 y 1024 pb. La digestión con las enzimas *MluI*, *HindIII* y *BamHI* liberó los fragmentos de 3 180, 1 668 y 601 pb; la digestión con *HindIII*, *BamHI* y *PstI* liberó los fragmentos de 3 781, 1 223 y 445 pb (Figura 39B y C); la digestión *HindIII*, *BamHI* y *KpnI* liberó los fragmentos de 3 573, 949, 490, 229 y 208 pb (Figura 39B y C).

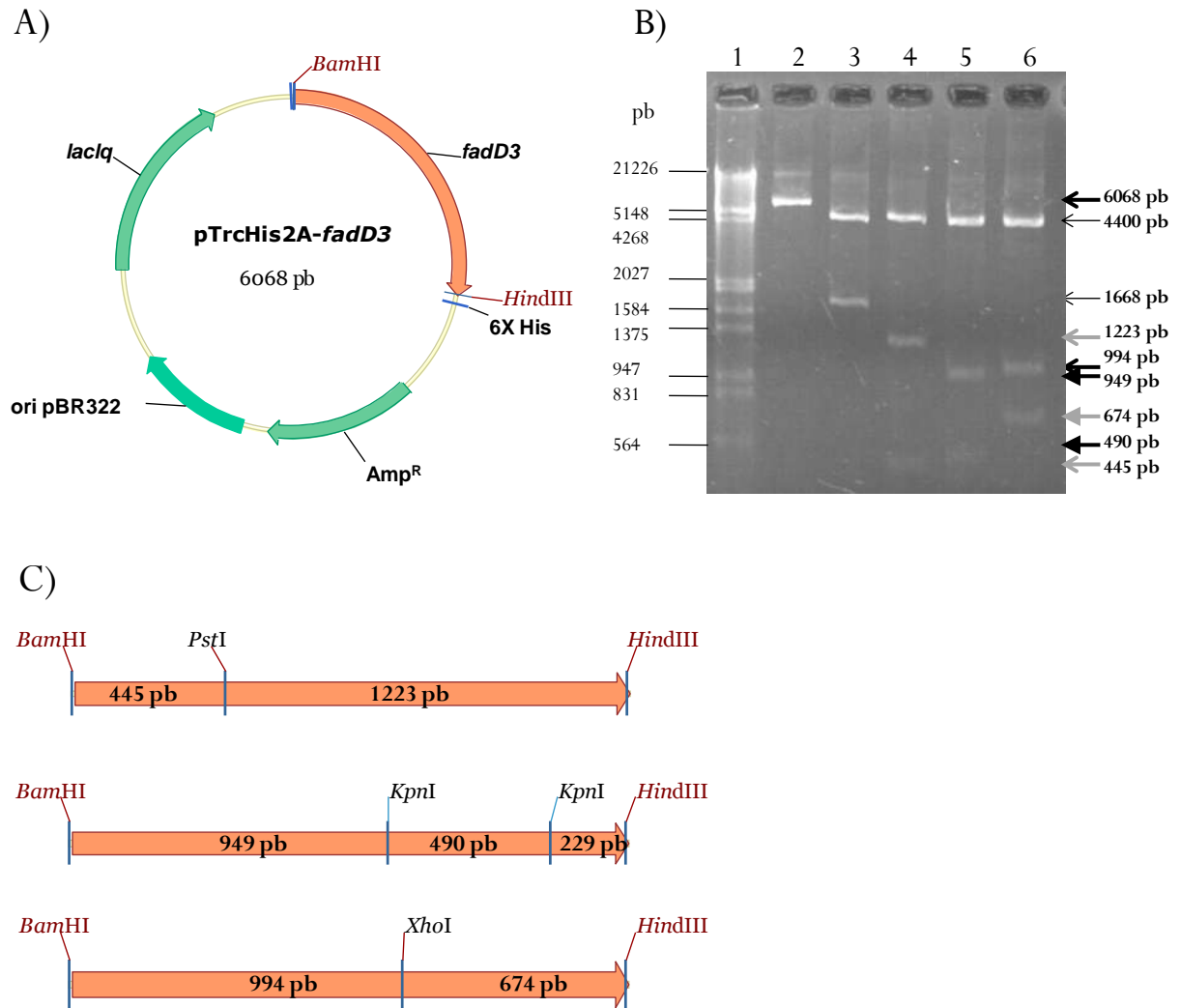


Figura 38. Subclonación del gen *fadD3* en pTrcHis2A para la sobre-expresión de la proteína FadD3. **A)** Diagrama del plásmido pTrcHis2A-*fadD3*. **B)** Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos de este plásmido. Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ (*EcoRI/HindIII*); carril 2, digestión con *HindIII* (6068 pb, flecha gruesa); carril 3 digestión con *HindIII* y *BamHI* (4400 pb y 1668 pb, flecha delgada); carril 4, digestión con *HindIII*, *BamHI* y *PstI* (4400, 1223 y 445 pb, flecha gris); carril 5, digestión con *HindIII*, *BamHI* y *KpnI* (4400, 949, 490 y 229 pb, punta de flecha cerrada); carril 6, digestión con *HindIII*, *BamHI* y *XhoI* (4400, 994 y 674 pb, punta de flecha cerrada y gris). **C)** Mapas de las digestiones con las enzimas de restricción *HindIII*, *BamHI* y *PstI*; digestión con las enzimas *HindIII*, *BamHI* y *KpnI*; digestión con las enzimas *HindIII*, *BamHI* y *XhoI*.

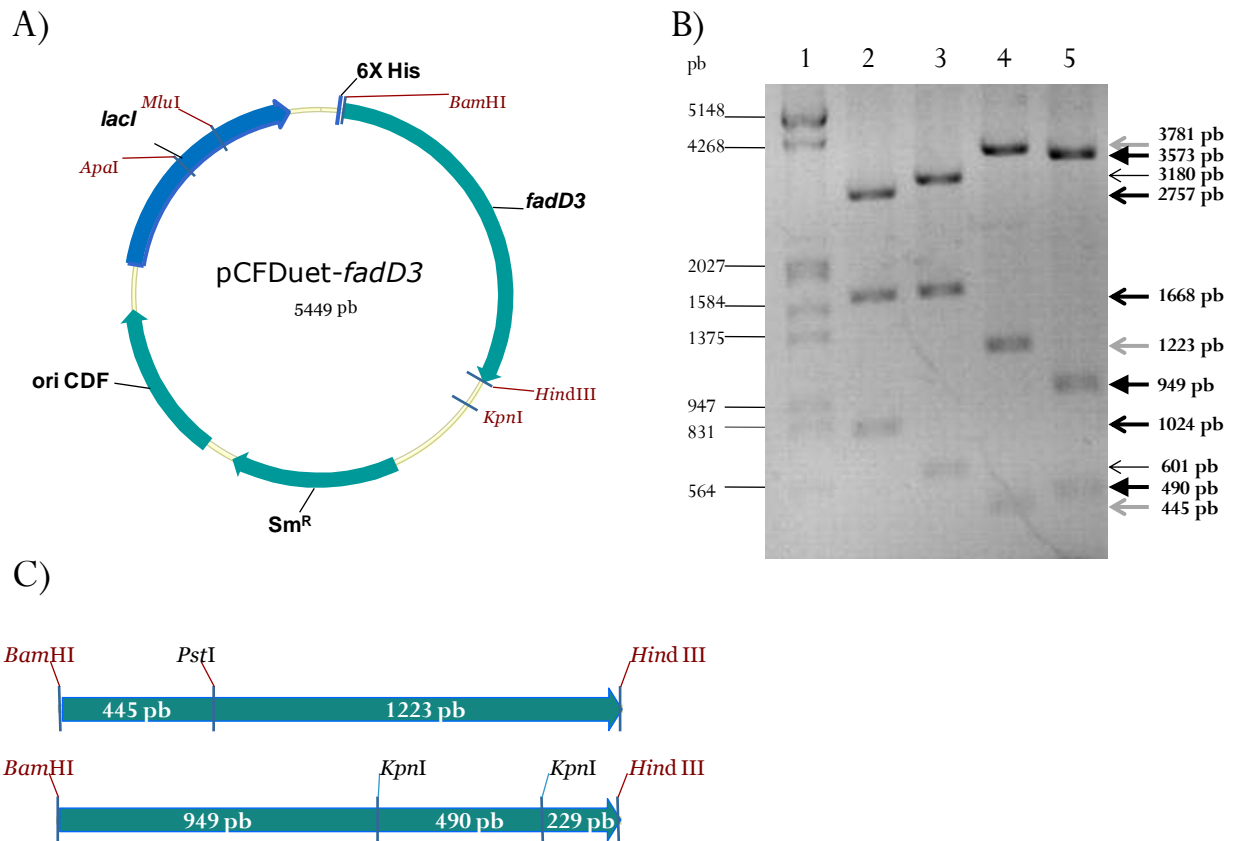


Figura 39. Subclonación del gen *fadD3* en pCFDuet para la sobre-expresión de la proteína FadD3. **A)** Diagrama del plásmido pCFDuet-*fadD3*. **B)** Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los fragmentos de este plásmido. Carril 1, marcador de tamaño molecular, ADN del fago λ (*EcoRI/HindIII*); carril 2, digestión con *ApaI*, *HindIII* y *BamHI* (2757, 1668 y 1024 pb, flecha gruesa); carril 3; digestión con *MluI*, *HindIII* y *BamHI* (3180, 1668 y 601 pb, flecha delgada); carril 4, digestión con *HindIII*, *BamHI* y *PstI* (3781, 1223 y 445 pb, flecha gris); carril 5, digestión con *HindIII*, *BamHI* y *KpnI* (3573, 949, 490, 229 y 208 pb, punta de flecha cerrada). **C)** Mapas de las digestiones con las enzimas *HindIII*, *BamHI* y *PstI*; digestión con las enzimas *HindIII*, *BamHI* y *KpnI*.

7.3.3 Determinación del tiempo de inducción de la proteína FadD3-His

Con la finalidad de determinar el tiempo de inducción óptimo de la expresión de la proteína FadD3-His se llevó a cabo el rastreo a diferentes tiempos después de la inducción, como se describe en materiales y métodos. El cultivo se creció a una D.O. de 0.4 leída a 600 nm, se indujo el sistema con IPTG y se tomó 5 ml de cultivo, esta muestra correspondió al tiempo 0, se dejó crecer el cultivo y se tomaron muestras a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas. Posteriormente, se sometieron a corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) por duplicado; un gel se tiñó con solución de azul de coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectar a FadD3-His mediante western blot. Este experimento se realizó para las cepas con las construcciones pTrcHis2A-*fadD3* (Figura 40) y pCFDuet-*fadD3* (Figura 41).

El peso teórico de la proteína FadD3 de acuerdo a lo reportado en la página del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>), es de 61.4 kDa, se esperaba una proteína recombinante de 62.3 kDa debido a que la etiqueta de histidinas tiene un peso aproximado de 0.93 kDa. En pTrcHis2A-*fadD3* como en pCFDuet-*fadD3*, no se observó la sobre-expresión de una banda en SDS-PAGE, sin embargo, en el western blot se observó una banda del peso de la proteína recombinante. En pTrcHis2A-*fadD3* se observó la mayor expresión de 4 a 24 horas (Figura 40B) y en pCFDuet-*fadD3* de 12 a 24 horas (Figura 41B). Los resultados indicaron que el fragmento clonado codificó para una proteína de 62 kDa, lo cual sugiere que el gen *fadD3* codifica para la isoprenoil-CoA sintetasa.

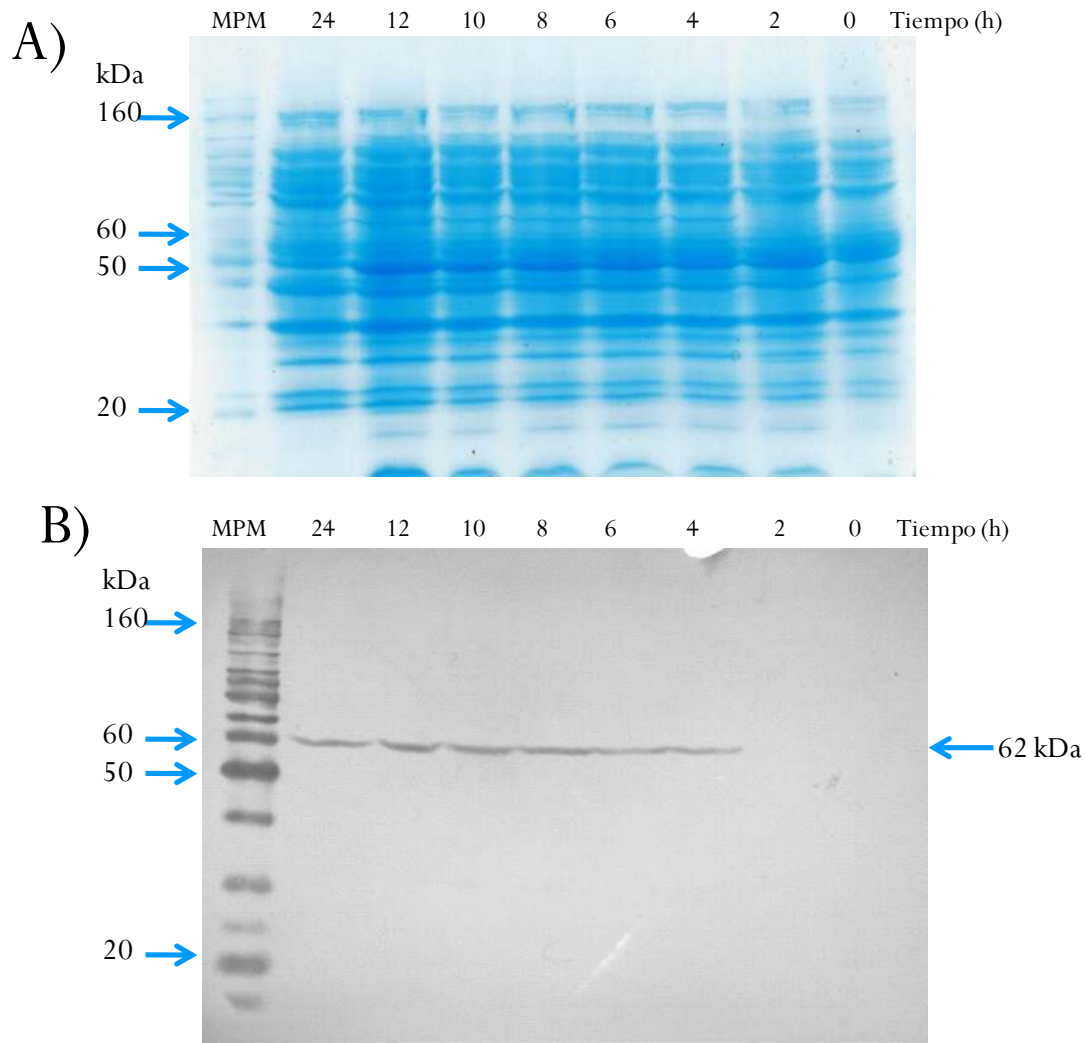


Figura 40. Rastreo de proteína FadD3 del cultivo de *E. coli* transformada con el plásmido pTrcHis2A-*fadD3*. El cultivo se creció a una D.O. de 0.4 leída a 600 nm, a 30 °C, 150 rpm, se indujo con IPTG y se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas. Las muestras se centrifugaron, lavaron, resuspendieron y sonicaron (materiales y métodos). **A)** Fotografía del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los carriles corresponden a, carril 1, MPM, marcador de peso molecular (BenchMark); carril 2-9, homogenados totales a las 24, 12, 10, 8, 6, 4, 2 y 0 horas, respectivamente. **B)** Fotografía de la membrana de nitrocelulosa de western blot de las muestras de inciso A transferidas, la inmunodetección se realizó con un sistema de dos anticuerpos, el anticuerpo primario corresponde al anti-His y el anticuerpo secundario a anti-donkey.

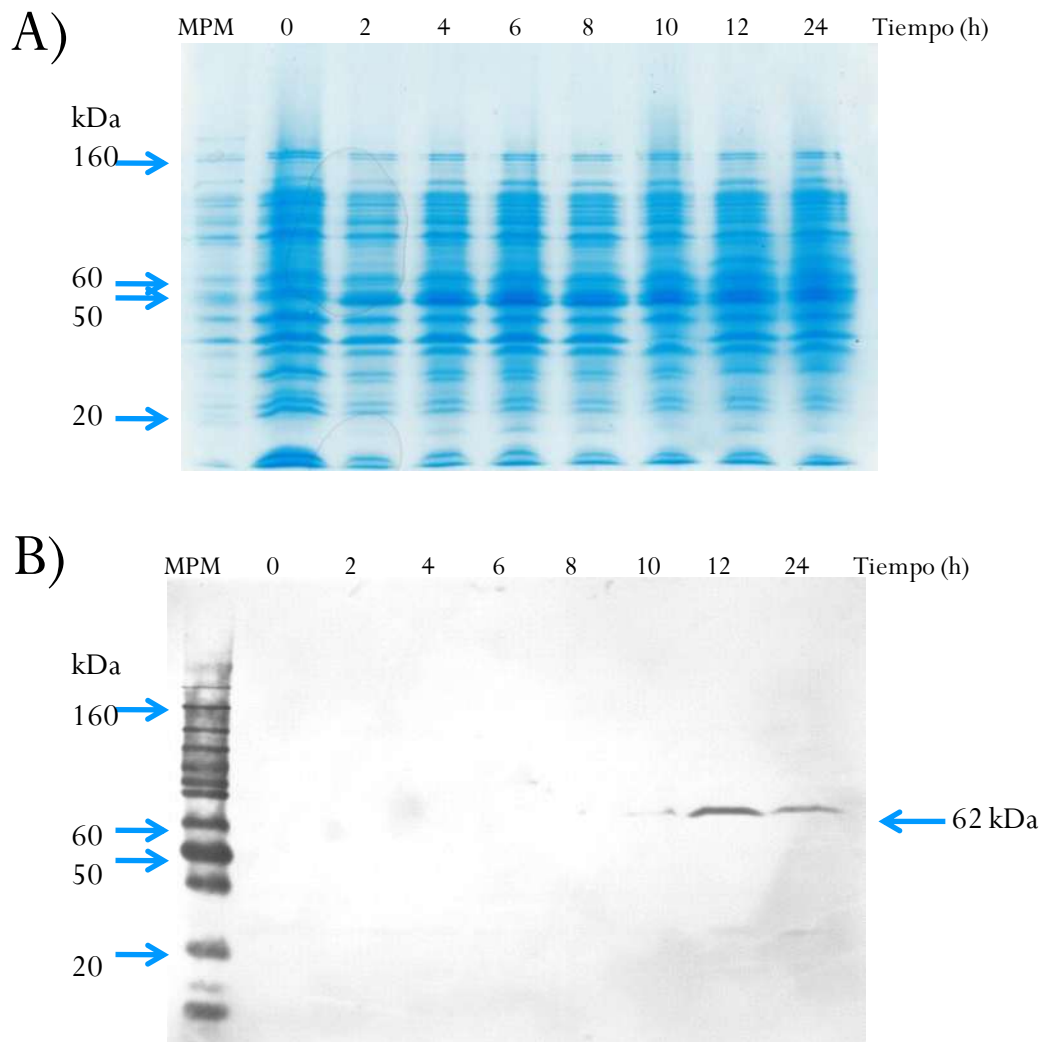


Figura 41. Rastreo de proteína Fadd3 del cultivo de *E. coli* transformada con el plásmido pCFDuet-*fadD3*. El cultivo se creció a una D.O. de 0.4 leída a 600 nm, a 30 °C, 150 rpm, se indujo con IPTG y se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas. Las muestras se centrifugaron, lavaron, resuspendieron y sonicaron (materiales y métodos). **A)** Fotografía del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los carriles corresponden a, carril 1, MPM, marcador de peso molecular (BenchMark); carril 2-9, homogenados totales a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas, respectivamente. **B)** Fotografía de la membrana de nitrocelulosa de western blot de las muestras de inciso A transferidas, la inmunodetección se realizó con un sistema de dos anticuerpos, el anticuerpo primario corresponde al anti-His y el anticuerpo secundario a anti-donkey.

7.4 Determinación de la actividad de la proteína FadD3-His

7.4.1 Purificación de FadD3-His mediante cromatografía de afinidad

En el presente trabajo la enzima se purificó por cromatografía de afinidad con la finalidad de determinar la actividad enzimática. El cultivo de la cepa de *E. coli* transformada con pTrcHis2A-*fadD3* se creció 12 h post-inducción, se lisó y la fracción soluble estuvo en contacto con la resina para unir FadD3-His a esta, posteriormente la proteína recombinante se eluyó mediante el uso de imidazol (materiales y métodos). Los resultados de la purificación de la proteína FadD3-His se observaron mediante un gel SDS-PAGE (Figura 42), donde se observó una banda enriquecida en las fracciones de elución, sin embargo, no se observó la actividad enzimática pese a los esfuerzos en el cambio de condiciones en el proceso de purificación. Por esta razón se cambió de estrategia y la actividad enzimática se determinó en extractos crudos.

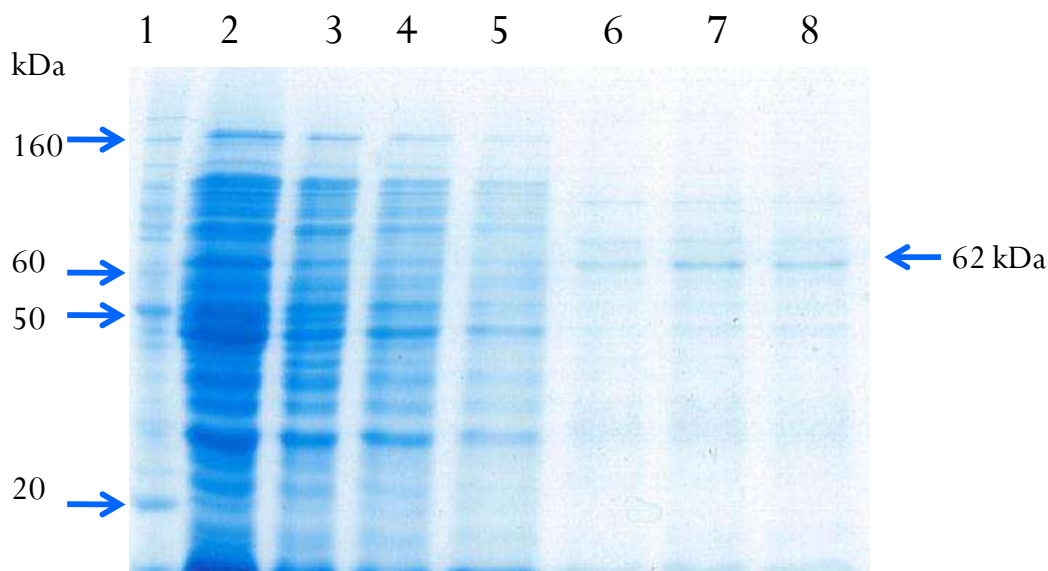


Figura 42. Purificación de la enzima FadD3-His de *P. aeruginosa* expresada en *E. coli* transformada con pTrcHis2A-*fadD3*. El cultivo se creció 12 h post-inducción, se cosechó y lisó, la fracción soluble estuvo en contacto con la resina para unir la proteína recombinante y se eluyó mediante el uso de imidazol. Fotografía de corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Carril 1, MPM, marcador de peso molecular (BenchMark); carril 2, extracto crudo; carril 3, clarificado; carril 4, lavado 1; carril 5, lavado 2; carril 6, elución fracción 1; carril 7, elución fracción 2; carril 8, elución fracción 3.

7.4.2 Determinación de la actividad de la proteína FadD3-His

Con la finalidad de determinar su preferencia por diferentes sustratos y si se trataba de una isoprenoil-CoA sintetasa, se determinó la actividad de la proteína FadD3-His con sustratos involucrados en la vía catabólica de isoprenoides acíclicos. La actividad enzimática se determinó mediante la reacción enzimática in vitro acoplada a una reacción colorimétrica medida por espectrometría.

Con la finalidad de conocer el rango de detección del método, se realizó una curva de calibración con acetato de etilo (Figura 43), determinando que dicho rango se encuentra en el orden de 2.5 mM a 15 mM. Lo cual resulta ser aceptable para la reacción enzimática en estudio.

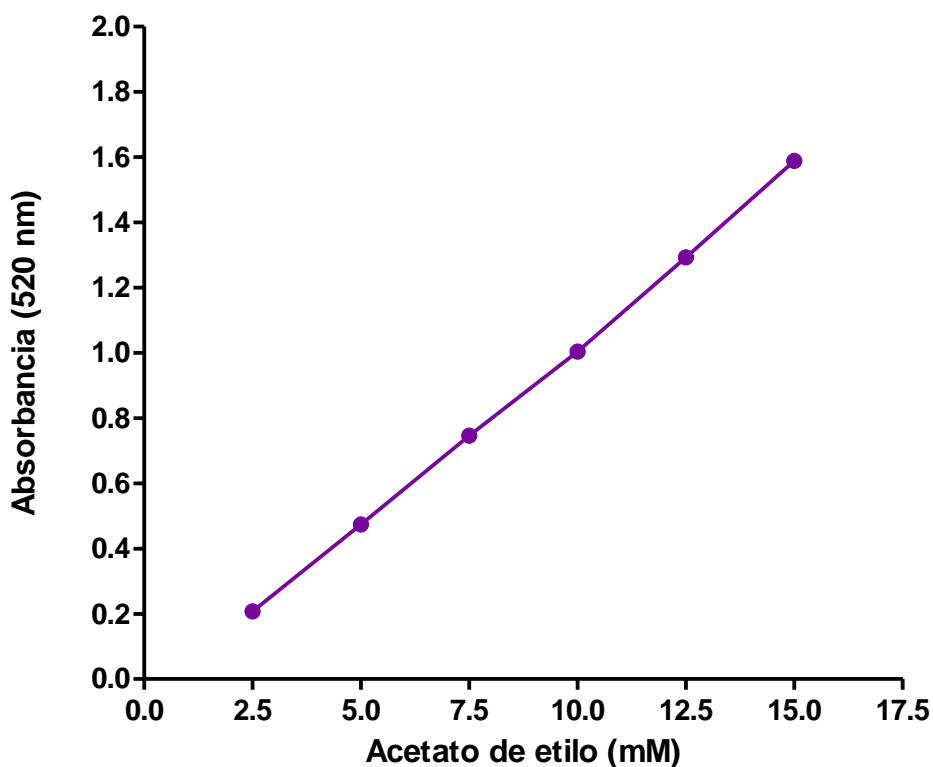


Figura 43. Curva de calibración para la determinación de ésteres. La solución de acetato de etilo reaccionó con hidrocloreuro de hidroxilamina, hidróxido de sodio, HCl y FeCl_2 , se leyeron a 520 nm. $n=3$, Desviación estándar, 2.5 mM \pm 0.06, 5.0 mM \pm 0.12, 7.5 mM \pm 0.22, 10 mM \pm 0.29, 12.5 mM \pm 0.35 y 15 mM \pm 0.44.

Los ensayos enzimáticos se realizaron con las cepas *E. coli* transformadas con los plásmidos sobre-expresantes utilizando como sustrato ácido citrónico (Tabla XIII). Los resultados obtenidos indican que los extractos crudos de la cepa de *E. coli* transformada con la construcción pCFDuet-*fadD3* que la agrega en el extremo amino terminal presenta mayor actividad respecto a la cepa transformada con pTrcHis2A-*fadD3* que le agrega una etiqueta en el extremo carboxilo terminal. Esto sugiere que la posición de la etiqueta de histidinas afecta la estabilidad de la proteína recombinante. Por lo cual, se eligió la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pCDFDuet-*fadD3* para los posteriores ensayos.

Tabla XIII. Actividad enzimática con los extractos crudos de las cepas de *E. coli* sobre-expresantes de FadD3-His

Sustrato	<i>E. coli</i> sobre-expresante pCDFDuet- <i>fadD3</i> ($\mu\text{moles}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína)	<i>E. coli</i> sobre-expresante pTrcHis2A- <i>fadD3</i> ($\mu\text{moles}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína)
Ácido citrónico	139.11±36.75	47.91 ±17.02

La cepa de *E. coli* transformada con pCDFDuet-*fadD3* se creció en medio LB, 12 h después de la inducción con IPTG y la cepa transformada con pTrcHis2A-*fadD3* se creció 10 h después de la inducción a 30 °C, a 150 rpm. La reacción se leyó a 520 nm, n=3.

La actividad enzimática se determinó teniendo como sustrato ácidos grasos de aceite de aguacate, ácido citrónico, ácido geránico y ácido isovalérico. La enzima FadD3-His presentó actividad enzimática con los cuatro sustratos, sin embargo la mayor actividad la mostró al usar el ácido citrónico. Además se determinó la actividad enzimática con extractos crudos de *E. coli* para descartar la actividad de su FadD utilizando como sustrato ácido citrónico y ácidos grasos de aceite de aguacate, en ambos casos, la actividad de la cepa sobre-expresante es más de tres veces mayor que la actividad de su fondo genético, la cepa de *E. coli* (Tabla XIV). Estos datos sugieren que efectivamente el gen *fadD3* codifica para una acil-CoA sintetasa capaz de

activar los ácidos terpenoicos; citronélico y geránico, además de presentar actividad con ácidos grasos, lo cual indica la participación en el catabolismo de éstos compuestos.

Tabla XIV. Actividad enzimática con extractos crudos de la cepa de *E. coli* transformada con pCDFuet-*fadD3*

	Actividad Enzimática (μmoles / min * mg de proteína)			
	Ácido citronélico	Ácido geránico	Ácido isovalérico	Ácidos grasos de aceite de aguacate
<i>E. coli</i> (pCDFDuet- <i>fadD3</i>)	76.77\pm24.28	61.76\pm10.33	27.13\pm9.18	65.80\pm17.05
<i>E. coli</i>	20.78\pm6.54	ND	ND	20.20\pm4.36

La cepa de *E. coli* transformada con pCDFuet-*fadD3* se creció en medio LB, 12 h después de la inducción con IPTG a 30 °C, a 150 rpm. La reacción se leyó a 520 nm, n=4. ND=No determinado.

8. DISCUSIÓN

P. aeruginosa es una bacteria ubicua y metabólicamente versátil lo cual está relacionado con tener un genoma procarionte secuenciado considerado de gran tamaño. En mi grupo de trabajo se ha estudiado la vía catabólica de isoprenoides acíclicos en este microorganismo, una vía importante por sus posibles aplicaciones biotecnológicas en la degradación de hidrocarburos 3-metil ramificados. Este trabajo tuvo como objetivo identificar y caracterizar la isoprenoil-CoA sintetasa de *P. aeruginosa* involucrada en el catabolismo de isoprenoides acíclicos. La identificación del gen que codifica a la isoprenoil-CoA sintetasa se realizó mediante una estrategia *in silico*, 14 ORFs candidatos se identificaron (**Tabla VIII**), PA3299 (gen *fadD1*), PA3300 (gen *fadD2*), PA2557, PA3860, PA4198, PA3924, PA4228 (gen *pchD*), PA2555, PA0996 (gen *pqsA*), PA4733 (gen *acsB*), PA0887 (gen *acsA*), PA3568, PA1617 y PA2893. El ORF PA1617 mediante alineamientos con la acil-CoA sintetasa de *M. hydrocarbonoclasticus* (**Tabla IX**) y la identificación de sus motivos catalíticos (**Figura 19**), se propuso en este trabajo como el gen que codifica para una isoprenoil-CoA sintetasa, la cual se nombró como FadD3, sin embargo no descartamos la posibilidad de que otro u otros de los ORFs candidatos; tengan la capacidad de utilizar como sustrato isoprenoides acíclicos. Entre los ORFs candidatos existen cuatro cuya función ya ha sido demostrada en *P. aeruginosa*, o bien con base a la alta homología que presentan con otros genes cuya función ya ha sido demostrada, y han sido nombrados como genes. Uno de los ORF cuya función ha sido demostrada en *P. aeruginosa* es el ORF PA4228, que corresponde al gen *pchD*, que codifica la acil-CoA sintetasa involucrada en la biosíntesis de pioquelina. Esta enzima realiza la activación del salicilato, un compuesto de estructura aromática (Serino *et al.*, 1997). Otro ORF que ya ha sido caracterizado en *P. aeruginosa*, es el ORF PA0996, denominado *pqsA* que codifica un homólogo de la benzoato-CoA ligasa que está involucrada en la activación de antranilato para la síntesis de quinolona de *Pseudomonas* (PQS) (Gallagher *et al.*, 2002). El antranilato también es un compuesto aromático, lo cual indica que los sustratos preferenciales de las enzimas PchD y PqsA son compuestos aromáticos. De acuerdo a la alta homología de los genes *acsB* (PA4733) y *acsA* (PA0887) con el gen *acs* de *E. coli*, se ha descrito en la página de genoma de *P. aeruginosa* que sus productos AcsB y AcsA, son

acetil-CoA sintetasas que tienen como sustrato preferencial al acetato (Suman *et al.*, 1995). Con base a estos reportes podemos proponer que los ORFs PA4228 (*pchD*), PA0996 (*pqsA*), PA4733 (*acsB*), y PA0887 (*acsA*) no están involucrados en la activación de ácidos isoprenoicos.

Por otro lado, Son y colaboradores en el 2007 mediante aislamiento de mRNA, análisis de microarreglos y RT-PCR identificaron genes sobre-expresados en esputo de pacientes con fibrosis quística infectados con *P. aeruginosa*, estos autores hipotetizan que la fosfatidilcolina es el principal nutriente *in vivo* de este microorganismo. La fosfatidilcolina es un compuesto formado por ácidos grasos de cadena larga, glicerol y fosforilcolina. Los ácidos grasos son principalmente ácido palmítico (C_{16:0}) del 50 al 60% y del 10 al 20% de C_{14:0}, C_{16:1}, C_{18:1} y C_{18:2}. Los ORFs PA3299 (*fadD1*), PA3300 (*fadD2*), PA2893 y PA3924 identificados en este trabajo (**Tabla VIII y Tabla IX**) se sobre-expresaron en la degradación de fosfatidilcolina y se describieron como genes *fadD*. En el reporte de Son y colaboradores se propuso que los productos proteicos de estos genes son acil-CoA sintetasas con preferencia por ácidos grasos de cadena larga a excepción del producto proteico de PA3924 que se describe con preferencia por ácidos grasos de cadena media. Además, FadD1, FadD2 y el producto proteico de PA3924 tienen el motivo de unión ATP/AMP altamente conservado comparado con el motivo de la FadD de *E. coli*. Posteriormente, Kang y colaboradores (2010), mediante mutantes y caracterización bioquímica de los productos proteicos determinaron la participación de los genes *fadD1* y *fadD2* en la degradación de ácidos grasos demostrando que FadD1 y FadD2 presentan actividad enzimática por ácidos grasos de 4 a 18 carbonos. Sin embargo, la mayor actividad enzimática de FadD1 fue con ácido oleico (C_{18:1}^{Δ9}) y de FadD2 con ácido caprílico (C₈). En este trabajo se demostró la participación de los genes *fadD1* y *fadD2* en el catabolismo de isoprenoides; citronelol y ácido citronélico, (**Tabla X, Figuras 33 y 34**), por lo que proponemos que posiblemente el producto proteico del ORF PA3924 puede estar involucrado en el catabolismo de estos isoprenoides. Con base a los resultados obtenidos no podríamos explicar porque *P. aeruginosa* tiene más de una isoprenoil-CoA sintetasa involucrada en la activación de ácidos isoprenoicos. Al respecto, Ruth y colaboradores (2008) propusieron que cepas de *Pseudomonas* tiene dos acil-CoA sintetasas involucradas en la degradación de ácidos grasos mientras que *E. coli* solo tiene una, a que

múltiples homólogos de una enzima evitaría el solapamiento de funciones o a que un homólogo de una enzima podría jugar un papel auxiliar.

El ORF PA2893 corresponde al gen *atuH* del operón *atu*, en nuestro equipo de trabajo se reportó que la mutante *atuH* fue capaz de crecer en leucina, isoleucina y citronelol, sugiriendo que este ORF no es esencial en la vía catabólica de leucina-isovalerato, ni en la vía de isoprenos acíclicos (Aguilar *et al.*, 2005). Föster-Fromme y colaboradores (2006) propusieron con base a la comparación de AtuH en bases de datos de especies del género *Pseudomonas*, que este gen codifica la isoprenoil-CoA sintetasa en *P. aeruginosa*, sin embargo, reportaron que la mutante *atuH* no muestra deficiencia en el crecimiento utilizando como fuentes de carbono, citronelol, geraniol, ácido citronélico, ácido geránico, leucina y ácido isovalérico. Lo anterior es consistente con los resultados del análisis *in silico* realizado en el presente trabajo, ya que este ORF presento % de identidad bajos (**Tabla VIII y Tabla IX**) respecto a las acil-CoA sintetasas de *E. coli* y de *M. hydrocarbonoclasticus* por lo que consideramos que AtuH es una probable acil-CoA sintetasa, sin embargo descartamos la posibilidad de que participe en la vía catabólica en estudio.

La comparación de los productos proteicos de los 14 ORFs con la Acs 1 de *M. hydrocarbonoclasticus* (**Tabla IX**) se realizó debido a que esta enzima es una acil-CoA sintetasa de cadena media que acepta ácidos grasos de C₁₀ a C₁₆ (Holtzapple y Schmidt-Dannert, 2007). En las enzimas FadD6, FadD15 y FadD19 de *Mycobacterium tuberculosis* se demostró que modificaciones (metilaciones, hidroxilaciones e insaturaciones) en las posiciones α , β u ω de los ácidos grasos de cadena media o larga utilizados como sustratos no bloquearon la conversión a ésteres de CoA (Pooja *et al.*, 2005), lo que demuestra que la longitud de la cadena hidrocarbonada del sustrato es una característica importante que influye en la actividad de este tipo de enzimas. En la **tabla IX** se muestra que los productos proteicos presentaron porcentajes de identidad cercanos al 20% incluyendo el producto proteico del ORF PA1617 que fue de 20.3%, exceptuando los ORFs PA3924 y PA4198, que presentaron 38.8% y 33.2% de identidad, respectivamente. Lo que sugiere que los productos proteicos de estos ORFs podrían aceptar al ácido citronélico como sustrato.

El ORF PA1617, denominado como *fadD3*, se eligió como un gen candidato que codifica para la isoprenoil-CoA sintetasa porque presentó un mayor porcentaje de identidad con la Acs 3 y Acs 4 de *M. hydrocarbonoclasticus*, 55.1 y 49.5% respectivamente (**Tabla IX**), enzimas capaces de aceptar ácidos grasos de C₁₂ a C₂₀, y por presentar los motivos de unión ATP/AMP y de ácidos grasos, altamente conservados respecto a la Acs 2 la cual corresponde a una isoprenoil-CoA sintetasa, y respecto a FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* (**Figura 19**). Los 14 ORFs identificados como posibles genes que codifican para acil-CoA sintetasas se compararon con la Acs 2 de *M. hydrocarbonoclasticus* la cual activa ácido fitánico, un isoprenoide β-metil ramificado (ácido 3, 7, 11, 15-tetrametilhexadecanoico) (Holtzapfle y Schmidt-Dannert, 2007), FadD1 presentó un 62.8% de identidad; FadD2, 59.6% y el producto proteico del ORF PA1617, 21.9%. Los productos proteicos de los ORFs restantes presentaron un rango de 18 al 26% de identidad (**Tabla IX**). El análisis *in silico* nos sugirió que FadD1 y FadD2 pudieran ser enzimas que además de aceptar como sustratos ácidos grasos, también aceptaran isoprenoides acíclicos.

Las acil-CoA sintetasas son enzimas promiscuas (Reger *et al.*, 2007; Hume *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010), por lo que se puede presentar un efecto compensatorio entre las enzimas FadD1, FadD2 y FadD3, esto puede enmascarar la preferencia de cada una de estas enzimas por el sustrato, debido que al estar afectada una enzima existen otras que pueden llevar a cabo la activación del sustrato, por lo que se consideró necesario generar dobles mutantes con la combinación de los tres genes: *fadD1-fadD3*, *fadD2-fadD3* (**Figuras 23, 24, 25, 26 y 27**) y *fadD1-fadD2* (**Figuras 28, 29, 30, 31 y 32**). Además, la mutante simple *fadD3* R se generó debido a que la mutante *fadD3* del Genome Center of Washington University (Jacobs *et al.*, 2003), el transposón se encuentra al inicio del marco de lectura sin afectar los sitios catalíticos, lo cual no ocurre con las mutantes *fadD1* y *fadD2* (**Figura 22**), además el transposón cuenta con el promotor de neomicina fosfotransferasa, por lo que hipotetizamos que puede originar una proteína funcional aunque de menor tamaño.

Mediante la generación y caracterización de las mutantes se analizó la participación de la isoprenoil-CoA sintetasa en el catabolismo de isoprenoides acíclicos. En la **tabla X** se muestran los resultados del crecimiento de las mutantes de *P. aeruginosa* utilizando como fuente de carbono compuestos involucrados en la vía en estudio. *P. aeruginosa* PAO1 y las

mutantes mostraron crecimiento lento utilizando como fuente de carbono geraniol y ácido geránico en medio sólido. La diferencia entre el citronelol (3,7 dimetil 6 octen-1-ol) y el geraniol (3,7 dimetil 2, 6 octen-1-ol) es una insaturación más en este último, sin embargo convergen en *cis* geranyl-CoA, por lo que posiblemente la disminución en el crecimiento se deba a que la oxidación del geraniol a ácido geránico es dependiente de molibdeno (Höschle y Jendroseek, 2005).

En el crecimiento en citronelol y ácido citronélico como fuente de carbono (**Tabla X y XI, Figuras 33 y 34**), la mutante *fadD3* que se generó por la interrupción de un transposón tuvo un mejor crecimiento en citronelol y ácido citronélico que la mutante *fadD3* R que se generó por la interrupción con el cassette de Gm^R, para explicar estas diferencias en el crecimiento proponemos dos explicaciones independientes. La primera de ellas involucra la posición del transposón en *fadD3*. El transposón se encuentra al inicio sin afectar sitios catalíticos lo cual puede originar una proteína funcional. La segunda está relacionada con el contexto genómico de *fadD3* (**Figura 20**) y el efecto polar (Raynal *et al.*, 2006). El gen *fadD3* (PA1617) es el primero de los 3 genes que forman un operón, al interrumpir el primero de ellos se ve afectada la transcripción de los genes localizados río abajo, si este fuera el caso, indicaría la posible participación de los genes correspondientes a los ORFs PA1618 y PA1619, de demostrarse, sería el tercer operón involucrado en la degradación de isoprenoides acíclicos. De acuerdo a las anotaciones en el genoma de *P. aeruginosa*, se propone que el ORF PA1618 es el gen que codifica una tioesterasa, la cual está dada con base a la presencia del motivo de HGG (clase 4). Además, el producto proteico de este ORF presenta identidad con tioesterasas del género *Pseudomonas*. Las tioesterasas, pueden hidrolizar el enlace entre las cadenas de acilos y la CoA. *E. coli* tiene dos tioesterasas solubles, la tioesterasa I que es activa solo con ácidos grasos de cadena larga y la tioesterasa II activa con ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena. Ambas enzimas hidrolizan tioésteres de CoA, sin embargo, el papel de las tioesterasas bacterianas en el metabolismo de los lípidos no ha sido establecido (Naggert *et al.*, 1990). Por otro lado, en eucariontes se ha demostrado la participación de las acil-CoA hidrolasas y de las acil-CoA sintetasas en la regulación de los niveles de acil-CoA. Los acil-CoA se asocian a la proteína de unión acil-CoA citosólica para proteger de la degradación de las acil-CoA hidrolasas

(Watkins, 1997). La función enzimática de tioesterasa no ha sido propuesta en la vía de degradación de isoprenos acíclicos (Campos-García, 2010), sin embargo, en caso de demostrarse la participación del operón, podríamos hipotetizar que la tioesterasa juega un papel de regulación de los niveles de acil-CoA, como ocurre en eucariotes. El tercer ORF que forma parte de este operón es el ORF PA1619, que de acuerdo a las anotaciones en la secuencia del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 es un probable regulador transcripcional. El producto proteico de este ORF presenta alta identidad con el regulador transcripcional AraC de *P. mendocina*. Los reguladores tipo AraC generalmente actúan como activadores transcripcionales de operones (Tropel y Meer, 2004), por lo que probablemente el gen *fadD3* y el ORF PA1618 esten regulados de esta manera.

En las **Tabla X y XI y Figuras 33 y 34** se observa la participación de los genes *fadD1* y *fadD2* en el catabolismo de isoprenoides acíclicos, además de su participación en el catabolismo de ácidos grasos (Kang *et al.*, 2010). De acuerdo a estos resultados hipotetizamos que los sustratos preferenciales de las enzimas FadD1 y FadD2 son ácidos grasos, sin embargo, también aceptan como sustratos isoprenoides acíclicos, caso contrario ocurre con la enzima FadD3 donde los sustratos preferenciales son isoprenoides acíclicos, pero también acepta ácidos grasos. En *P. putida* U se ha reportado que la fenilacetil-CoA sintetasa involucrada en el catabolismo de ácido fenilacético y la acetil-CoA sintetasa involucrada en el catabolismo del ácido octanoico, son capaces de aceptar el sustrato natural de la otra enzima (Fernández-Valverde *et al.*, 1993). También en la *P. putida* GPo1 se ha reportado que la acil-CoA sintetasa 1 esta involucrada tanto en la activación de ácidos grasos como en la activación de ácido hidroxicarboxílico liberado de granulos de polihidroxialcanoatos (Ruth *et al.*, 2010). La doble mutante *fadD1-fadD2* presentó en la cinética de crecimiento en citronelol (**Figura 33**), mayor crecimiento que las mutantes simples *fadD1* y *fadD2*, y en la cinética de crecimiento en ácido citronélico, estas tres mutantes tuvieron un crecimiento similar (**Figura 34**), lo cual se puede deber a la expresión de otros genes que codifiquen a isoprenoil-CoA sintetasas, semejante a lo que ocurre en *P. putida* U, donde ha sido reportado la presencia de *fadD1* y *fadD2*, sin embargo *fadD2* se expresa solo cuando *fadD1* es inactivado (Olivera *et al.*, 2001).

En la vía de leucina-isovalerato es necesario la activación de ácido isovalérico a isovaleril-CoA (Campos-García, 2010). La cinética de crecimiento utilizando como fuente de carbono ácido isovalérico (**Figura 35 y Tabla XI**) sugiere la participación de los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* en la vía leucina-isovalerato, sin embargo, ninguno de estos genes es esencial. Lo cual indica que el ácido isovalérico no es el sustrato preferencial de estas enzimas e implica la participación de otra enzima hasta el momento desconocida, Campos-García (2010) ha propuesto la participación de una isovaleril-CoA sintasa.

El crecimiento de las mutantes en la cinética de ácidos grasos de aceite de aguacate (**Figura 36 y Tabla XII**) hubo una represión catabólica por carbono ya que el aceite de aguacate es una mezcla de ácidos grasos lo cual se observó en un crecimiento rápido y mayor en comparación con las otras fuentes de carbono utilizadas. En el crecimiento se presentó un efecto de complementación de los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3*, por lo que no se pudo observar la afectación en el crecimiento. Los productos proteicos de los genes *fadD1* y *fadD2* son enzimas promiscuas que reconocen ácidos grasos de cadena corta, media y larga, así que al estar ausente un gen, existe otro u otros genes que codifican para enzimas que complementan la función reconociendo a estos ácidos grasos como sustratos. Sin embargo, con base en estos resultados no es posible concluir si el gen *fadD3* está involucrado en el catabolismo de ácidos grasos.

La última parte de este proyecto comprendió la expresión de la isoprenoil-CoA sintetasa y la determinación de la actividad enzimática. El gen *fadD3* se clonó (**Figura 37**) y subclonó en dos vectores de expresión (**Figura 38 y 39**). La expresión de la enzima FadD3 se detectó mediante western blot (**Figura 40 y 41**). La proteína recombinante tuvo un peso estimado de 62.3 kDa y de acuerdo al western blot y al SDS-PAGE de la purificación de la enzima (**Figura 42**), fue de 62 kDa. Estos resultados sugieren que la forma nativa de la enzima es un monómero. El peso molecular es similar a otras acil-CoA sintetasas reportadas, como lo son, la acil-CoA sintetasa de *P. putida* U, acil-CoA sintetasa de *E. coli*, la acetil-CoA sintetasa de *Methanotherx soehngeni* y *Penicillium chrysogenum* (Fernández-Valverde *et al.*, 1993) y las acil-CoA sintetasas de *P. aeruginosa* (Kang *et al.*, 2010). Las fracciones enriquecidas de la enzima FadD3 (**Figura 42**) no presentaron actividad enzimática, lo que indica que durante el

proceso de purificación se inactivó, por lo que se variaron un cierto número de factores como lo son pH de buffer de lisis, inhibidores de proteasas, tiempos de sonicación, etc. La dificultad en la purificación de estas enzimas ha sido reportada. La palmitoil-CoA sintetasa de células de hígado de rata presentó una difícil purificación por tratarse de una enzima de membrana, al disolverla en detergentes o bajo condiciones alcalinas presentó pérdida de la actividad enzimática, sin embargo bajo condiciones específicas la enzima logró ser purificada, sin embargo, se reportaron pérdidas de actividad enzimática durante la purificación debido al envejecimiento de la enzima o por pérdida de cofactores durante los pasos de purificación, además se apreció actividad de una palmitoil-CoA hidrolasa como contaminación (Bar-Tana *et al.*, 1971). Martínez-Blanco y colaboradores (1990) purificaron la fenilacetil-CoA sintetasa de *P. putida* en la que determinaron una vida media en 90 minutos, baja estabilidad y alta sensibilidad a la temperatura y a condiciones de almacenamiento. La acetil-CoA sintetasa de *Penicillium chrysogenum* se reportaron dificultades similares (Martínez-Blanco *et al.*, 1992). Otro aspecto a considerar sobre por qué no se obtuvo la enzima activa es la localización de éstas. FadD1 y FadD2 de *P. aeruginosa* se encontraron en el citoplasma (Kang *et al.*, 2010), la acil-CoA sintetasa de *E. coli*, FadD es una proteína asociada a membrana citoplasmática, al igual que la acil-CoA sintetasa 2 (ACS 2) de *P. putida* GPO1 mientras que la acil-CoA sintetasa 1 (ACS 1) se localizó preferentemente en granulos de polihidroxialcanoatos, además se hipotetizó que ACS 1 es activa solo cuando esta asociada a membrana como ocurre en la FadD de *E. coli* (Ruth *et al.*, 2010), de ser este el caso de isoprenoil-CoA sintetasa explicaría los rendimientos bajos al ser purificada a partir de la fracción soluble y el porque no se logró obtener en su estado activo.

La determinación de actividad enzimática se realizó en extractos crudos utilizando dos cepas sobre-expresantes, de la cepa transformada con el plásmido pCDFDuet-*fadD3* (proteína recombinante con etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal) y pTrcHis2A-*fadD3* (proteína recombinante con etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal) (**Tabla XIII**), observando que la proteína recombinante con la etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal presenta una mayor actividad enzimática, lo cual sugiere que la posición de la etiqueta de histidinas afecta la actividad enzimática. El análisis de fenilacetil-CoA sintetasas recombinantes demostró que la adición de aminoácidos y modificaciones discretas en el

extremo amino terminal tiene efectos en la actividad enzimática, lo que indica que existen aminoácidos responsables de mantener la función enzimática en este extremo (Miñambres *et al.*, 1996), por lo que podemos hipotetizar dos situaciones; la isoprenoil-CoA sintetasa tiene aminoácidos importantes para la actividad catalítica en el extremo carboxilo terminal y la etiqueta de histidinas causan modificaciones en estos aminoácidos que afecta la actividad enzimática, o al igual que la fenilacetil-CoA sintetasa, existen aminoácidos importantes para la actividad enzimática en el extremo amino terminal y la etiqueta de histidinas favorece esta actividad.

Las posteriores determinaciones enzimáticas se realizaron con la proteína recombinante con la etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal, se utilizaron como sustrato ácido citronélico, ácido geránico, ácido isovalérico y ácidos grasos de aceite de aguacate (**Tabla XIV**), además en el caso de ácido citronélico y ácidos grasos de aceite de aguacate se determinó la actividad enzimática de *E. coli* para restar la actividad de la enzima FadD de este microorganismo. La isoprenoil-CoA sintetasa fue activa con todos los sustratos probados mostrando promiscuidad por el sustrato, al igual que FadD1 y FadD2 respecto a la utilización de ácidos grasos. La actividad enzimática con ácido citronélico, ácido geránico y ácidos grasos de aceite de aguacate, fue mayor respecto al ácido isovalérico, estos resultados indican la preferencia de la isoprenoil-CoA sintetasa por isoprenoides de cadena media en relación a cadenas carbonadas cortas. Además los resultados de la actividad enzimática son consistentes con los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento donde se determinó el gen *fadD3* esencial para el crecimiento utilizando como fuente de carbono ácido citronélico y la participación no esencial de *fadD3* en el crecimiento de ácido isovalérico, sin embargo, la isoprenoil-CoA sintetasa fue capaz de aceptar como sustrato isoprenoides acíclicos de cadenas hidrocarbonadas de longitud corta y media, de esta manera esta participando en dos etapas de la vía general: la vía superior de oxidación activación y en la vía de leucina-isovalerato. Esta característica no es exclusiva de esta enzima, ya que con base a la caracterización bioquímica se ha determinado que algunas enzimas de la vía de degradación de isoprenoides acíclicos pueden reconocer a más de un sustrato, tal es el caso de la geranil-CoA carboxilasa que además de aceptar como sustrato al geranil-CoA, también es activa con 3-metil-crotonil-CoA (Aguilar *et*

al., 2008); y LiuE que presenta actividad como 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa y 3-hidroxi-3-isohehexenilglutaril-CoA liasa (Chávez-Avilés *et al.*, 2009).

Un aspecto importante a considerar es el papel fisiológico de la isoprenoil-CoA sintetasa en la vía catabólica de isoprenoides acíclicos. Con base al conocimiento que se tiene hasta el momento de esta vía y los resultados de este trabajo, hipotetizamos que el citronelol como fuente de carbono es oxidado a ácido citrónico y es acumulado en la célula, el cual debe ser eliminado rápidamente por *P. aeruginosa* para evitar daño celular. *P. aeruginosa* evita el riesgo por la inducción de la isoprenoil-CoA sintetasa, que es capaz de activar al ácido citrónico y almacenarlo como un compuesto no reactivo, citronelil-CoA. En condiciones no acumulatorias de citronelol y escasas de CoA, *P. aeruginosa* podría posteriormente hidrolizar el citronelil-CoA generando ácido citrónico y CoA, mediante una esterasa (Martínez-Blanco *et al.*, 1990; Minambres *et al.*, 1990). Las funciones sugeridas serían codificadas por el que codifica a la isoprenoil-CoA sintetasa. De comprobarse lo anterior, la activación de ácido citrónico a citronelil-CoA por la isoprenoil-CoA sintetasa sería un punto de regulación importante de la vía catabólica de isoprenoides acíclicos.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se propone que *P. aeruginosa* tiene una isoprenoil-CoA sintetasa involucrada en la activación de isoprenoides acíclicos. Si bien se han reportado acil-CoA sintetasas en especies del género *Pseudomonas*, a nuestro conocimiento, este es el primer reporte donde se identifica una isoprenoil-CoA sintetasa en *P. aeruginosa*.

9. CONCLUSIONES

1. El ORF PA1617 de *P. aeruginosa* nombrado como el gen *fadD3*, codifica la isoprenoil-CoA sintetasa involucrada en la activación de isoprenoides acíclicos.
2. Los productos de los genes *fadD1*, *fadD2* y *fadD3* de *P. aeruginosa* participan en la vía degradativa de isoprenoides acíclicos, siendo el gen *fadD3* esencial.
3. La enzima FadD3, al igual que sus paralogas FadD1 y FadD2, presentan promiscuidad catalítica.

10. REFERENCIAS

- Aguilar, J. A., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Rodríguez-Zavala, J. S., Nikolau, B. J. y Campos-García, J. (2008). Substrate specificity of the 3-methylcrotonyl coenzyme A (CoA) and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 190: 4888-4893.
- Aguilar, J. A., Zavala, A. N., Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Díaz-Pérez, A. L. y Campos-García, J. (2006). The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2070-2079.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. S. y Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.
- Altschul, S.F., Gish, W., Millier, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Alvizouri, F. y Rodríguez, A. (2009). Efectos médicos del aguacate. *Med Int Mex* 25: 379-385.
- Bar-tana, J., Rose, G. y Shapiro ,B. (1971). The purification and properties of microsomal palmitoyl-coenzyme A synthetase. *Journal of Biochemistry* 122: 353-362
- Beermann, C., Jelinek, J., Reinecker, T., Hauenschild, A., Boehm, G. y Klör, H-U. (2003). Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipids in Health and Disease*, 2: 1-10.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Clark, K., Lipman, D. J., Ostell, J. y Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research* 40: 48–53.
- Black, P. N., Zhang Q., Weimar, J. D. y DiRusso, C. C. (1997). Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4896–4903.

- Brown, T. L., LeMay, H. E., Bursten B. E. y Burdge, J.R. (2004). Química la ciencia central. 9a ed. Edit. Prentice-Hall Hispanoamérica S. A., México.
- Campos-García, J. (2010) Metabolism of acyclic terpenes by *Pseudomonas*. En *Pseudomonas* volume 6: molecular microbiology, infection and biodiversity. Ramos J.-L. y Filloux A. (Ed). Granada, Spain. pp. 235-252.
- Campos-García, J., Esteve, A., Vázquez-Duhalt, R., Ramos, J. L. y Soberón-Chávez, G. (1999). The branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3730-3734.
- Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D.S. y Fall, R. R. (1978). Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 135: 324-333.
- Chang, R. y College, W. (2003). Química. 7a ed. Edit. McGraw-Hill. Colombia.
- Chávez-Avilés, M., Díaz-Pérez, A. L. y Campos-García, J. (2009). The bifunctional role of LiuE from *Pseudomonas aeruginosa*, displays additionally HHG-CoA lyase enzymatic activity. *Molecular Biology Reports* 37: 1787-1791.
- Crosby, H. A., Rank, K. C., Rayment, I. y Escalante-Semerena, J. C. (2012). Structure-guided expansion of the substrate range of methylmalonyl coenzyme A synthetase (MatB) of *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6619-6629.
- Díaz-Pérez, A. L. y Campos-García, J. (2012). Convergencia catabólica de las rutas degradativas de isoprenoides acíclicos y de leucina en bacterias del género *Pseudomonas*. *Revista de Educación Bioquímica* 31: 127-135.
- Fall, R. R., Brown, J. L. y Schaeffer, T. L. (1979). Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Applied and Environmental Microbiology* 38: 715-722.
- Fernández-Valverde, M., Reglero, A., Martínez-Blanco, H. y Luengo, J. M. (1993). Purification of *Pseudomonas putida* acyl coenzyme A ligase active with a range of aliphatic and aromatic substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1149-1154.

- Figurski, D. H. y Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 76: 1648-1652.
- Förster-Fromme, K., Höschle, B., Mack, C., Armbruster, M. W. y Jendrossek, D. (2006). Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4819-4828.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. y Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 184: 6472-6480
- Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. y Bertrand, J.-C. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 568-576.
- Grimm, A. C. y Harwood, C. S. (1999). NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology* 181: 3310-3316.
- Hagelueken, G., Wiehlmann, L., Adams, T. M., Kolmar, H., Heinz, D. W., Tümmler B. y Schubert W. D. (2007). Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 104: 12276-12281.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 14: 95-98.
- Hassett, D. J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D. E. y Cohen, M. S. (1992). Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: Mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infection and Immunity* 60: 328-336.
- Holtzapple, E. y Schmidt-Dannert, C. (2007). Biosynthesis of isoprenoid wax ester in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798: Identification and characterization of

isoprenoid coenzyme A synthetase and wax ester synthases. *Journal of Bacteriology* 189: 3804-3812.

- Höschle, B. y Jendroseek, D. (2005). Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* 151: 2277-2283.
- Höschle, B., Gnau, V. y Jendrossek, D. (2005). Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 151: 3649-3656.
- Hume, A. R., Nikodinovic-Runic, J., y O'Connor, K. E. (2009). FadD from *Pseudomonas putida* CA-3 is a true long-chain fatty acyl coenzyme A synthetase that activates phenylalkanoic and alkanolic acids. *Journal of Bacteriology* 191: 7554-7565.
- Iurescia, S., Marconi, A. M., Tofani, D., Gambocorta, A., Paterno, A., Devirgiliis, C., van der Werf, M. J. y Zennaro, E. (1999). Identification and sequencing of β -myrcene catabolism genes from *Pseudomonas* sp. strain M1. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2871-2876.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V. y Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 14339-14344.
- Kang, Y., Zarzycki-Siek, J., Walton, C. B., Norris, M. H. y Hoang, T. T. (2010). Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 5:e13557.
- Kokotek, W. y Lotz, W. (1991). Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene* 98: 7-13.

- Kumari S., Tishel R., Eisenbach M. y Wolfe A. J. 1995. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177: 2878-2886.
- Lipmann, F. y Tuttle, L. C. (1945). A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *Journal of Biological Chemistry* 159: 21-28.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M. y de la Cruz F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology* 45: 1-8.
- Martínez-Blanco, H., Reglero A., Rodríguez-Aparicio, L. B., y Luengo, J. M. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 7084-7090.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Fernández-Valverde, M., Ferrero, M. A., Moreno, M. A., Peñalva, M. A. y Luengo, J. M. (1992). Isolation and characterization of the acetyl-CoA synthetase from *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry* 267: 5474-5481.
- Miñambres, B., Martínez-Blanco, H., Olivera, E. R., García, B., Díez, B., Barredo, J. L., Moreno, M. A., Schleissner, C., Salto, F. y Luengo, J. M. (1996). Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* U phenylacetyl-CoA ligase. *Journal of Biological Chemistry* 271: 33531–33538.
- Naggert, J., Narasimhan, M. L., de Veaux, L., Cho, H., Randhawa, Z. I., Cronan, J. E., Green, B. N. y Smith, S. (1990). Cloning, sequencing, and characterization of *Escherichia coli* thioesterase II. *Journal of Biological Chemistry* 266: 11044-11050.
- Olivera, E. R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M. A., Cañedo, L., DiRusso, C. C., Naharro, G. y Luengo, J. M. (2000). Two different pathways are involved in the β -oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Molecular Microbiology* 39: 863-874.
- Pedrotta, V. y Witholt, B. (1999). Isolation and characterization of the *cis-trans* unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *Journal of Bacteriology* 181: 3256-3261.

- Pirnik, M. P., Atlas, R. M. y Bartha, R. (1974). Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology* 119: 868-878.
- Pooja, A., Vats, A., Saxena, P., Mohanty, D. y Gokhale, R. S. (2005). Promiscuous fatty acyl CoA ligases produce acyl-CoA and acyl-SNAC precursors for polyketide biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 127: 9388-9389.
- Raynal, A., Karray, F., Tuphile, K., Darbon-Rongère, E. y Pernodet, J. L. (2006). Excisable Cassettes: new tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4839-4844.
- Reger, A. S., Carney, J. M. y Gulick, A. M. (2007). Biochemical and crystallographic analysis of substrate binding and conformational changes in acetyl-CoA synthetase. *Biochemistry* 46: 6536-6546.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11: 2477-2490.
- Ruth, K., de Roo, G., Egli, T. y Ren, Q. (2008). Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. *Biomacromolecules* 9:1652-1659.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Section 5.72.
- Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. y Fall, R. R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* 38: 742-746.
- Schneiker, S., Martins dos Santos, V. A. P., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T. N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O. V., Kaminski, F., Khachane, A. N., Lang, S., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Nechitaylo, T., Pühler, A., Regenhardt, D., Rupp, O., Sabirova, J. S., Selbitschka, W., Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Vorhölter, F.J., Weidner, S., Kaiser, O. y Golyshin, P. N. (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology* 24: 997-1004.

- Serino, L., Reimann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V. D. y Haas, D. (1997). Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated *pchDCBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179: 248-257.
- Seubert, W. (1960). Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. *Journal of Bacteriology* 79: 426-434.
- Son, M. S., Matthews W. J. Jr., Kang, Y., Nguyen D. T., y Hoang T. T. (2007). In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity* 75: 5313-5324.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. y Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 523-533.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tropel D. y van der Meer J. R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 474-500.
- Vandenberg, P. A. y Wright, A. M. (1983). Plasmid involvement in acyclic isoprenoid metabolism by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1953-1955.
- Watkins, P. A. (1997). Fatty acid activation. *Progress in Lipid Research* 36: 55-83.

- Weimar, J. D., DiRusso, C. C., Delio, R. y Black, P. N. (2002). Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 277: 29369-29376.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W. y Brinkman, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Research* 39: 596-600.
- Wise, A. A., Liu, Z. y Binns, A. N. (2006). Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. En *Methods in Molecular Biology, Agrobacterium Protocols*. 2nd ed. Wang, K. (Ed). New Jersey, U.S.A. 343:43-53.
- Witholt, B., de Smet, M. J., Kingma, J., van Beilen, J. B., Kok, M., Lageveen, R. G. y Eggink, G. (1990). Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends in Biotechnology* 8: 46-52.
- Wong, S. M. y Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 10191-10196.
- Yanish-Perron, C., Viera J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13 pUC18. *Gene* 33: 103-119.