



**UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS.**

**“CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *Pseudomonas
aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA
EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE
TERPENOS ACÍCLICOS”**

TESIS

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

**ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A :

Q.F.B. MAURICIO NAHUAM CHÁVEZ AVILÉS

ASESOR: D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA.

MORELIA MICHOCÁN, ENERO DE 2009.

REALIZACIÓN:

El trabajo de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

ASESOR:

D. C. JESÚS CAMPOS GARCÍA

COMITÉ TUTORAL :

D. C. CARLOS CERVANTES VEGA

D. C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

D. C. HOMERO REYES DE LA CRUZ

AGRADECIMIENTOS

Al D. C. Jesús Campos-García por la confianza depositada en mi persona para llevar a cabo el presente trabajo, así como, por el adiestramiento desarrollado en el laboratorio de Biotecnología Microbiana.

Al D. C. Carlos Cervantes-Vega, D. C. Mauro Manuel Martínez-Pacheco y al D. C. Homero Reyes de la Cruz, por todos los consejos, material y conocimientos facilitados para el desarrollo y comprensión del trabajo realizado.

DEDICATORIAS

A DIOS, de quién he recibido múltiples bendiciones y que siempre me ha guiado.

A mis padres: Roberto Y María Guadalupe, de quien siempre recibí su ejemplo y me enseñaron a luchar por mis sueños y a exigir siempre lo mejor de mi persona ¡Mil gracias por todo su amor y apoyo!

A mis hermanos: Olga, Alejandro y Elisa de quienes siempre recibí amor y confianza para con mi persona y que siempre han estado presentes en todo momento.

A mis suegros: por toda la confianza que han depositado en mi persona para ser cabeza de familia a lado de uno de sus más grandes tesoros, así como por el afecto recibido y todos los apoyos brindados a mi familia, mil gracias.

A mis compadres: Luz y Carlos que han sido como unos hermanos para conmigo demostrando afecto hacia mi persona, pero sobre todo por la amistad que espero perdure a través del tiempo.

A mis amigos y compañeros del postgrado: Sacky, Viry, Luis Ma. Randy, Estela, Liz (Desgra), Luis Alberto (Pastorcillo), Alberto, Hans, César, Paty, Areli, Alma Laura, Santa, José, Jhonny, Esther, Mony, Edgar, José Luis, Cinthia, José Antonio de quienes siempre recibí apoyo, confianza, y gratos momentos que prevalecerán a través del tiempo, pero sobre todo su amistad incondicional.

A mis amigos de la licenciatura: en especial a Soco y Rey por todos los tipos de apoyos otorgados a mi familia, sin ustedes no hubiese sido posible culminar el presente trabajo, estaré eternamente agradecido.

A todos mis familiares: por el apoyo brindado durante mi formación profesional y personal.

A la memoria de: mi hermano Yudiel de quién siempre recibí amor, y confianza y de mi abuela Elisa quien fue una persona maravillosa en mi vida, por que siempre creyó en mí, quien tomó parte elemental en la formación de mi persona, de quién a demás recibí amor y un ejemplo a seguir. Y quienes siempre estarán en mi corazón ¡GRACIAS!

EL PRINCIPAL AGRADECIMIENTO EL ÚLTIMO PERO EL MÁS IMPORTANTE: A mi esposa e hijos: a ti Ale por el apoyo incondicional que siempre has mostrado no importando los sacrificios hechos durante el desarrollo del posgrado, le doy gracias a DIOS por haberte puesto en mi camino, espero envejecer y seguir disfrutando la vida junto a ti, te doy gracias por las desventuras que solo a tú lado pude superar, por ocuparte de mí y de nuestros hijos quienes fueron afectados directamente durante este tiempo y por motivarme a culminar esta etapa que ha sido tan difícil para ambos, TE AMO, y te doy gracias por todo.

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	5
III	JUSTIFICACIÓN	16
IV	HIPÓTESIS	16
V	OBJETIVOS	16
	Objetivo general.	16
	Objetivos específicos.	16
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	17
	6.1. Cepas y plásmidos.	17
	6.2. Medios de cultivo.	18
	6.3. Métodos.	18
	6.3.1 Aislamiento de plásmidos.	18
	6.3.1.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina.	18
	6.3.2 Electroforesis en geles de agarosa.	19
	6.3.3 Purificación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa.	20
	6.3.4 Transformación.	20
	6.3.4.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .	20
	6.3.4.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .	21
	6.4. Procesos enzimáticos.	21
	6.4.1 Restricción de ADN con endonucleasas.	21
	6.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa.	22
	6.4.2.1 Amplificación del gen <i>liuE</i> .	22
	6.4.3 Adenilación de ADN.	22
	6.4.4 Clonación de <i>liuE</i> en el vector pGEM-T Easy.	23
	6.4.4.1 Ligación de ADN.	23
	6.4.5 Subclonación en el vector de expresión pTrcHis2A.	23
	6.5 Procedimientos con proteínas.	23
	6.5.1 Obtención de extractos celulares.	23
	6.5.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.	24
	6.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	24
	6.5.4 Purificación de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa (LiuE).	24
	6.5.5 Renaturalización de LiuE.	25
	6.5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (Blue Native PAGE).	25

6.5.6.1	Condiciones del corrimiento electroforético.	25
6.5.6.2	Tinción de azul de Coomassie (protocolo rápido fermentas).	26
6.5.7	Electroforesis bidimensional.	26
6.5.7.1	Preparación de la muestra.	27
6.5.7.2	Primera dimensión o isoelectroenfoque	27
6.5.7.3	Segunda dimensión: SDS-PAGE al 12%.	28
6.5.7.4	Tinción con plata	28
6.5.8	Determinación de la actividad de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	29
6.5.9	Determinación del comportamiento bifuncional de LiuE.	29
6.5.9.1	Condiciones del crecimiento de las cepas <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y <i>PAMliuE</i> .	29
6.5.9.2	Purificación de las proteínas AtuF, AtuC, AtuE y LiuE.	30
6.5.9.3	Renaturalización de las proteínas AtuF, AtuC, AtuE y LiuE.	30
6.5.9.4	Reconstrucción de la vía metabólica de los terpenos acíclicos empleando extractos celulares de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 o <i>PAMliuE</i> y HMG-CoA liasa purificada y Renaturalizada.	30
6.5.9.5	Determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA (HIHG-CoA) liasa de LiuE.	31
VII	RESULTADOS	32
7.1	Amplificación del ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	32
7.2	Clonación del ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	33
7.3	Subclonación del ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	35
7.4	Monitoreo del tiempo de inducción de LiuE.	37
7.5	Purificación de LiuE.	38
7.6	Caracterización bioquímica de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	38
7.6.1	Ensayo enzimático acoplado.	39
7.6.2	Determinación de los parámetros óptimos para la cinética Enzimática.	40
7.6.2.1	Determinación del tiempo óptimo de reacción.	40
7.6.2.2	Determinación de la concentración óptima de proteína.	41
7.6.2.3	Determinación de la temperatura óptima.	42
7.6.2.4	Determinación del pH óptimo.	42
7.6.2.5	Efecto de cationes divalentes y de los agentes reductores sobre la actividad de la HMG-CoA liasa.	43
7.6.3	Determinación del efecto de la variación de la concentración del sustrato sobre la velocidad.	44
7.6.3.1	Análisis de Hill.	46
7.6.3.1.1	Análisis de Hill en su forma logarítmica para la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	47
7.7	Renaturalización de LiuE.	48
7.8	Determinación del pI de LiuE mediante electroforesis bidimensional.	50

7.9 Efecto de los productos de la reacción enzimática de la HMG-CoA liasa sobre la actividad enzimática.	51
7.10 Comportamiento bifuncional de la proteína LiuE.	53
7.10.1 Determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa en extractos de <i>P. aeruginosa</i> .	54
7.10.2 Determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa empleando reacciones acopladas con las enzimas recombinantes geranyl-CoA carboxilasa e isohexenilglutaconil-CoA hidratasa.	55
VIII DISCUSIÓN	57
IX CONCLUSIONES	65
X PERSPECTIVAS	65
XI ANEXO	66
11.1 Preparación de los amortiguadores de empleados en la determinación del pH óptimo.	66
11.1.1 Amortiguador de acetatos de potasio (20 mM).	66
11.1.2 Amortiguador Tris-HCl (20 mM).	66
11.1.3 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM).	66
11.1.3.1 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 6.0.	66
11.1.3.2 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 6.5.	66
11.1.3.3 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 7.0.	67
11.1.3.4 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 7.5.	67
11.2 Protocolo para la cuantificación de proteína por el método de Bradford.	67
11.2.1 Preparación del azul brillante de Coomassie.	67
11.3 Elaboración de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 10 %.	68
11.3.1 Gel separador al 10 %.	68
11.3.2 Gel concentrador al 4 %.	68
11.3.3 Preparación de la muestra y de los marcadores de peso Molecular.	68
11.3.4 Tinción de azul de Coomassie.	68
11.3.5 Amortiguador de corrida (tris-glicina).	69
11.3.6 Amortiguador reductor de SDS (carga de muestra).	69
11.3.7 Solución de desteñido.	69
11.4 Preparación de los elementos de un BN-PAGE.	69
11.4.1 Preparación de la muestra y de los marcadores de estado de oligomerización.	69
11.4.2 Amortiguador de corrida (tris-glicina) nativo.	69
11.4.3 Amortiguador de carga no reductor.	70
11.4.4 Solución de desteñido.	70

11.5 Preparación de las soluciones empleadas en la electroforesis bidimensional.	70
11.5.1 Preparación del amortiguador “O” (equilibrio).	70
11.5.2 Preparación del amortiguador “L” (lisis).	70
11.5.3 Preparación del amortiguador “K” (cubierta).	70
11.5.4 Preparación de los amortiguadores de corrida.	71
11.5.4.1 Amortiguador del ánodo.	71
11.5.4.2 Amortiguador del cátodo.	71
11.6 Elaboración de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12 %.	71
11.6.1 Preparación de los geles en condiciones desnaturalizantes al 12 %.	71
11.6.1.1 Gel separador 12 %.	71
11.6.1.2 Gel concentrador 4 %.	71
11.7 Preparación de las soluciones empleadas en la tinción de plata.	72
11.7.1 Preparación de la solución fijadora	72
11.7.2 Preparación de la solución de sensibilización	72
11.7.3 Preparación de la solución de nitrato de plata al 0.1 %	72
11.7.4 Preparación de la solución reveladora	72
11.7.5 Preparación de la solución de paro de reacción	72

XII BIBLIOGRAFÍA	73
-------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

No	Título	Pág
1	Vía para la degradación de isoprenoides acíclicos con C ₁₀ en <i>P. citronellolis</i> .	5
2	Representación esquemática del arreglo genético del operón <i>liu</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	6
3	Grupos de genes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	9
4	Análisis de las secuencias de los productos codificados por los operones <i>atu</i> y <i>liu</i> .	10
5	Vías catabólicas y funciones propuestas de los productos codificados por los operones <i>atu</i> y <i>liu</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	13
6	Vías de utilización de los terpenos acíclicos (Atu) y de leucina (Liu) de acuerdo a Seubert y Fass modificada por Höschle <i>et al.</i> , 2005.	15
7	Mapa del cósmido pMO013850, empleado para amplificar el ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> .	32
8	Amplificación y purificación del ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	33
9	Construcción y análisis de restricción del plásmido pGLE24	34
10	Estrategia de subclonación del ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en el vector de expresión de proteínas recombinantes pTrcHis2A.	36
11	Análisis de restricción del plásmido pTLE2011.	37
12	Monitoreo de la inducción de LiuE.	37
13	Purificación de LiuE.	38
14	Cromatograma de la determinación de los estándares de HMG-CoA y control negativo.	39
15	Determinación de la actividad de la HMG-CoA liasa	40
16	Efecto del tiempo de reacción en la actividad relativa de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	41
17	Efecto de la concentración de la proteína sobre la actividad de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	41
18	Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	42
19	Efecto del pH sobre la actividad de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	43
20	Efecto de los cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.	44
21	Determinación del efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	45
22	Análisis de Lineweaver-Burk del efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	45
23	Análisis de los datos cinéticos de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> con el modelo de Hill.	46
24	Análisis de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> mediante el modelo de Lineweaver-Burk para enzimas alostéricas.	47
25	Análisis de Hill en su forma logarítmica (determinación del número de subunidades) para la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	48
26	Panel A: Curva de calibración de la masa molecular. Panel B: Fotografía del corrimiento electroforético de un gel BN-PAGE	49
27	Curva de calibración para la determinación del pI.	50

28	Determinación del punto isoeléctrico de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> (LiuE).	51
29	Efecto del acetyl-CoA y del acetoacetato sobre la actividad enzimática de la HMG-CoA liasa de <i>P. aeruginosa</i> .	52
30	Análisis del efecto del acetyl-CoA sobre la actividad enzimática de la HMG-CoA de <i>P. aeruginosa</i> liasa con el modelo matemático de Lineweaver-Burk para enzimas alostéricas.	53
31	Diagrama de las reacciones acopladas para la determinación de la actividad 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa.	54
32	Determinación de la actividad de HMG-CoA liasa en extractos celulares de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	55
33	Purificación de las proteínas usadas en la reacción acoplada de HMG-CoA liasa.	56

ÍNDICE DE TABLAS

No	Título	Pág
1	Proteínas que muestran identidad de aminoácidos significativa con los productos del operón <i>gny</i>	8
2	Fenotipos del crecimiento de las cepas de <i>Pseudomonas</i>	12
3	Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo	17

RESUMEN

La HMG-CoA liasa (EC 4.1.3.4) cataliza la ruptura del HMG-CoA en acetil-CoA y acetoacetato. En el presente trabajo se determinaron los siguientes parámetros de la HMG-CoA liasa: posee una masa molecular relativa de 33 kDa en condiciones desnaturalizantes y en condiciones nativas se mostró como un homodímero con una masa molecular relativa de 79 kDa. LiuE presentó dos isoenzimas mayoritarias con puntos isoeléctricos de 6.8 y 7.0, mostró un pH y una temperatura óptima de 7.0 y 37°C, respectivamente. Mostró un comportamiento no Michaeliano de tipo sigmoidal, sugiriendo una regulación alostérica, las constantes cinéticas para el HMG-CoA fueron: una $K_{0.5}$ 740 μ M, $V_{m\acute{a}x}$ de 27.3 U/mg proteína y un coeficiente de Hill de 2.3. Finalmente se encontró que el Acetil-CoA es un inhibidor competitivo de la HMG-CoA liasa. Las enzimas homólogas a LiuE son enzimas específicas para su sustrato, y muestran constantes de afinidad pequeñas denotando la gran afinidad por su sustrato, además poseen un comportamiento enzimático Michaeliano. LiuE posee una elevada constante de afinidad por el HMG-CoA con respecto a su homóloga bacteriana (*P. mevalonii*) sugiriendo que podría ser capaz de reconocer más de un sustrato; estos datos reforzaron la hipótesis de que la enzima LiuE es una enzima bifuncional que es capaz de reconocer al 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA (HIHG-CoA) e hidrolizarlo. Utilizando reacciones acopladas empleando la cis-geranil-CoA carboxilasa (AtuC/AtuF) y la isohexenil glutaconil-CoA hidratasa (AtuE), purificadas y renaturalizadas, se observó un consumo pobre de cis-Geranil-CoA (1.59 nmol consumidos) al estar ausente LiuE en la mezcla de reacción, mientras que al agregarla a la reacción, el consumo del cis-geranil-CoA aumento 11 veces (17.82 nmol de cis-geranil-CoA consumidos). Con lo anterior se recaba evidencia para sugerir que LiuE tiene participación en las rutas catabólicas de la leucina y de los terpenos acíclicos, mediante el reconocimiento y fragmentación de los respectivos intermediarios metabólicos (el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA y el 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA).

I INTRODUCCIÓN.

La utilización de los alcanos por microorganismos (como fuente de carbono y energía) ha sido sujeto de muchos estudios, especialmente en relación al impacto ambiental que estos causan ^[14]. La degradación de *n*-alcanos se lleva a cabo principalmente mediante la oxidación del grupo metil terminal para producir el ácido *n*-alcanóico correspondiente, el cual es entonces degradado mediante la vía de oxidación de los ácidos grasos, la oxidación β ^[14, 15].

Los alcanos ramificados son generalmente menos susceptibles a la biodegradación y ciertas ramificaciones alquilo pueden generar compuestos recalcitrantes debido a que tales ramificaciones disminuyen la disponibilidad metabólica. En la mayoría de los casos, si la alquil ramificación está localizada cerca del extremo terminal disminuye la biodegradabilidad, la cual puede ser resultado del impedimento estérico (generado por dicha ramificación) de las enzimas oxidantes, en los alcanos β -metil ramificados esta substitución previene la oxidación β ^[1, 7, 14, 15, 17, 24, 42].

Los terpenos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza y frecuentemente se encuentran en forma de compuestos aromáticos tales como el citronelol (terpeno lineal) y el canfor (terpeno aromático). Los monoterpenos están conformados por dos subunidades de isopreno y frecuentemente su función se encuentra dada por los extremos de estas moléculas. Los terpenos representan uno de los varios subgrupos de compuestos naturales que contienen estructuras moleculares metil ramificadas derivadas del isopreno. Ejemplos de otros subgrupos son los carotenoides, esteroides y los poli-isoprenos por ejemplo el caucho ^[17, 24]. El citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) y el geraniol (3,7-dimetil-octa-2,6-dien-1-ol) son compuestos modelo para el estudio de la degradación de monoterpenos acíclicos y se encuentran naturalmente en las plantas. Ambos compuestos son de interés industrial debido a su uso comercial como saborizantes en alimentos, como fragancia en los perfumes. Sin embargo, el citronelol es de uno los pocos repelentes de mosquitos de origen natural. El geraniol estructuralmente está relacionado con el citronelol, difiere solamente por la ausencia de un doble enlace. Recientemente se ha encontrado que el geraniol y compuestos relacionados tienen efectos significativos sobre células eucariotas y que son capaces de inducir apoptosis *in vitro* en células de cáncer pancreático ^[23]. La intensidad y la variedad de las actividades biológicas de monoterpenos y compuestos relacionados no han sido totalmente investigadas, resultando en la falta de información de las rutas bioquímicas de tales compuestos ^[23, 24].

Como se mencionó antes, algunos terpenos son difíciles de metabolizar debido a la presencia de grupos β -metilos que inhiben la oxidación β . 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 él. El catabolismo del citronelol ocurre en ciertas *Pseudomonadaceae*, incluyendo *Pseudomonas citronellolis*, *P. mendocina* y *P. aeruginosa*, algunas cepas de estas bacterias también son capaces de oxidar *n*-alcanos. Una inducción de ambas vías podría, en principio, proveer un mecanismo de degradación para los alcanos 3-metil ramificados^[1, 2, 14, 15, 18]. McKenna en 1971 (citado en^[37]) demostró que aunque muchas bacterias hidrocarbonoclasticas son capaces de degradar alcanos 2-metil ramificados pocas son capaces de atacar los alcanos 3-metil ramificados. Pirnik demostró que el metabolismo del 2,6-dimetildecano (2,6 DMD) por *Brevibacterium erythrogenes* es ampliamente prevenida por la producción de metabolitos intermediarios 3-metil-acil-CoA. Dichos intermediarios no son susceptibles a la oxidación β debido a la presencia del grupo alquilo en la posición 3. Estos estudios puntualizaron que la ramificación 3-metil representa una característica estructural que previene la biodegradación bacteriana^[37]. *P. aeruginosa* es capaz de utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos como sustratos para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos no pueden asimilar. Este microorganismo es de importancia para el hombre debido a que representa un problema de sanidad así como porque puede ser empleado en procesos biotecnológicos en el área ambiental como la bioremediación. Se sabe que *P. aeruginosa* es uno de los pocos microorganismos capaces de degradar alcanos lineales ramificados, que produce biosurfactantes que son importantes para los procesos de bioremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados^[12].

La colonización de distintos ambientes por *P. aeruginosa* y la patogenia de los aislados ambientales nos plantean interrogantes evolutivas importantes que hacen fascinante el estudio de esta bacteria. La alta conservación génica entre cepas de *P. aeruginosa* aunada a la presencia de genes clonales específicos, podría explicar la capacidad de esta bacteria para colonizar tan diversos nichos y de utilizar como sustrato una gran variedad de compuestos. En un determinado nicho ecológico toda la población bacteriana puede explotar la información genética propia de la especie y, al mismo tiempo, cada clona tiene secuencias génicas propias que son blanco de una acelerada evolución genética. Una de las características de las bacterias del género *Pseudomonas* es su gran capacidad para metabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Esta característica generalmente está codificada en los plásmidos denominados catabólicos, se encuentran en cepas de *P. putida* y en *P. aeruginosa*. En el caso de *P. aeruginosa* su gran versatilidad metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas con actividades desconocidas^[12].

La leucina y el isovalerato son ejemplos de moléculas saturadas con metil ramificaciones en su esqueleto carbonado. El marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) PA2011 de *P. aeruginosa*, codifica una probable 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) liasa, que se ha propuesto cataliza el paso limitante de la degradación de la leucina y de los isoprenoides generado por el impedimento estérico de la metil ramificación en posición β ^[1, 2, 14].

La enzima HMG-CoA liasa (EC 4.1.3.4) está implicada en procesos catabólicos, por ejemplo, en mamíferos juega un papel vital en la cetogénesis, catalizando la ruptura del HMG-CoA en acetoacetato y acetil-CoA (Ac-CoA). Además de este papel en la formación de cuerpos cetónicos la enzima también es crucial en el catabolismo de la leucina ^[9, 10, 16, 20, 25, 27, 34, 35, 38, 46-49]. En plantas participa en el catabolismo de la leucina y en la biosíntesis del mevalonato, además se ha sugerido su participación en el catabolismo de isoprenoides ^[3, 22]. En hongos participa en la cetogénesis ^[40] y finalmente en bacterias participa en el catabolismo de la leucina y del mevalonato ^[4, 27, 36]. Recientemente se ha aportado evidencia que sugiere su participación en el catabolismo de isoprenoides de la familia del citronelol ^[1, 2, 8, 13, 14].

La HMG-CoA liasa es un miembro de la familia HMG-CoA LIASA de proteínas que catalizan reacciones de ruptura o condensación de enlaces C-C. Miembros de la familia incluyen homocitrato sintasa, isopropilmalato sintasa, que catalizan la condensación aldólica de acetil-CoA con α -cetoglutarato o α -cetoisovalerato generando homocitrato y α -isopropilmalato, respectivamente ^[20, 47, 49].

La enzima adopta un plegamiento del tipo TIM-barrel ($\beta\alpha$)₈ con 9 láminas β y 12 α -hélices. El barril se encuentra ocluido por el extremo amino terminal, por lo que el sustrato pasa a través de la cavidad generada por el extremo carboxilo terminal hacia el sitio activo ^[9, 10, 16, 20].

Se sugiere que la reacción de la liasa es llevada a cabo mediante el mecanismo de condensación aldólica retro-Claisen, en el cual la extracción de un protón del gupo 3-hidroxilo del HMG-CoA por un residuo que actúa como una base, desencadena la formación de una cetona en el C3 con la subsecuente ruptura del enlace de los carbonos C2-C3. Una forma carbaniónica de acetil-CoA es transitoriamente formada y estabilizada mediante la deprotonación de C2 de este producto mediante un ácido. Se ha demostrado que la ruptura del HMG-CoA se efectúa con una inversión estereoquímica del C2. Así una consecuencia es la observación general para enzimas que catalizan reacciones de tipo Claisen sugiriendo la propuesta de que estas enzimas emplean como ácidos y bases catalíticos dos residuos de aminoácidos situados en sitios opuestos de la unión del sustrato ^[20, 26, 31, 38, 47, 48].

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

La HMG-CoA liasa requiere un catión divalente para llevar a cabo su actividad, tales como Mg^{+2} o Mn^{+2} . Experimentos previos han sugerido que el catión divalente y el sustrato forman un complejo ternario con la enzima. Se ha propuesto que el metal se liga a los átomos de oxígeno del grupo carboxilo y del grupo hidroxilo del HMG-CoA, facilitando la enolización y por tanto la estabilización de un intermediario carbaniónico. Se espera que dos o más residuos de aminoácidos funcionen directa o indirectamente en la coordinación octaédrica del catión activador ^[9, 20, 31, 35, 47, 48].

II ANTECEDENTES

En 1964 Seubert *et al.* (citado en [8]), aislaron e identificaron microorganismos capaces de degadar isoprenoides, entre ellos se encontró que *P. citronellolis* fue capaz de emplear citronelol como única fuente de carbono y energía; también fue capaz de utilizar otros isoprenoides acíclicos tales como geraniol y farnesol. Muchos de los detalles de la vía catabólica del citronelol fueron dilucidados por Seubert *et al.* (Figura 1), sin embargo las reacciones intermedias quedaron sin resolver. La vía involucra al menos dos enzimas únicas: la geraniol-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 la oxidación β [8].

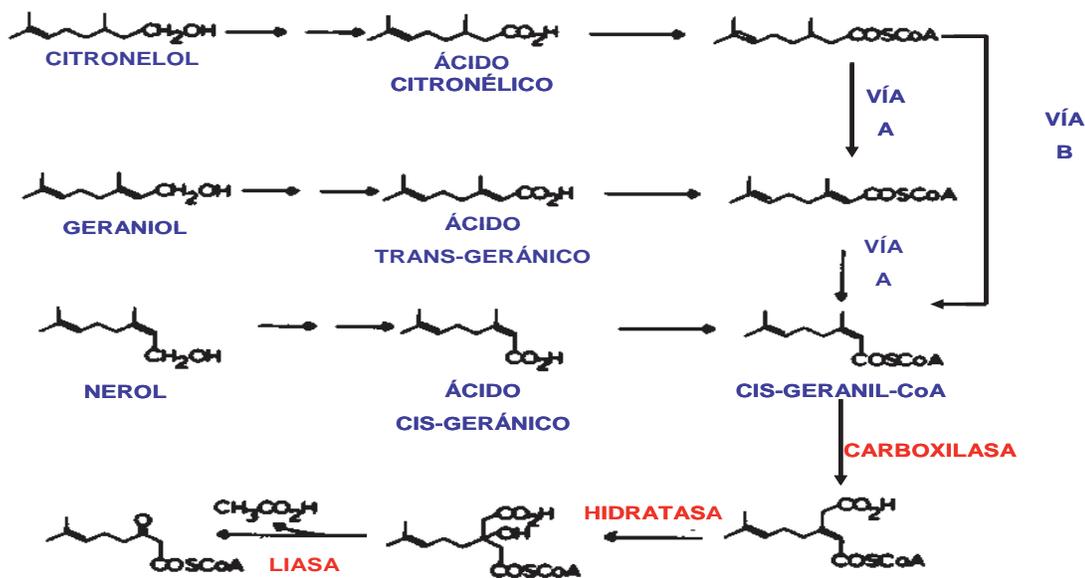


Fig.1 Vía para la degadación de isoprenoides acíclicos con C₁₀ en *P. citronellolis*. Las vías muestran los pasos enzimáticos representativos, basados en el trabajo de Seubert *et al.* 1964 y Cantwell *et al.* 1978. Los pasos marcados como vía A y B representan incertidumbres en dichas vías catabólicas. Modificado de Cantwell *et al.* 1978.

Cantwell *et al.*, en 1978, emplearon once especies diferentes de *Pseudomonas* con el objetivo de establecer si la secuencia de β -descarboximetilación ocurría en estos microorganismos, encontrando que tres especies de la subdivisión fluorescentes tal como *P. aeruginosa*, *P. citronellolis* y *P. mendocina* fueron capaces de crecer en geraniol. Estos datos sugirieron que la secuencia de β -descarboximetilación es característica solamente de ciertas especies del subgrupo fluorescentes y no se encuentra ampliamente distribuida en la familia *Pseudomonadaceae* [8].

La vía catabólica para la degradación de isoprenoides acíclicos había sido reportada solamente en *P. citronellolis*, e involucra la oxidación del alcohol del isoprenoide hacia su forma aldehídica y de ésta hacia la formación de ácido citronélico (llamada vía superior). Estudios bioquímicos sugieren que la degradación de isoprenoides acíclicos en plantas y microorganismos involucran al menos tres enzimas únicas que conforman la vía inferior, constituida por la geranyl-CoA carboxilasa la cual está encargada de llevar a cabo la activación del grupo 3-metilo del sustrato fijando una molécula de CO₂, una enoil-CoA hidratasa, que introduce una molécula de agua y finalmente una enzima homóloga a la 3-hidroxi- γ -carboxigeranyl-CoA liasa la cual cataliza la remoción del grupo β -carboximetilo como acetil-CoA, produciendo un compuesto viable hacia la oxidación β (3-oxo-7-metiloctenoato). Sin embargo, las enzimas y sus genes codificantes estaban aún sin identificar hasta que Díaz-Pérez *et al.* (2004) identificaron un grupo de genes en *P. aeruginosa* denominado operón *gny* (debido a la asimilación del ácido geránico), conformado por siete genes, ubicados en los marcos de lectura abiertos (ORF's) PA2010 al PA2016. Los genes fueron nombrados como *gnyR* (PA2016), *gnyD* (PA2015), *gnyB* (PA2014), *gnyH* (PA2013), *gnyA* (PA2012), *gnyL* (PA2011) y *gnyS* (PA2010), estos genes codifican las enzimas involucradas en la vía inferior de la degradación de isoprenoides acíclicos y el operón fue posteriormente renombrado como operón *liu* (utilización de leucina e isovalerato por sus siglas en inglés) (Figura 2) [14].

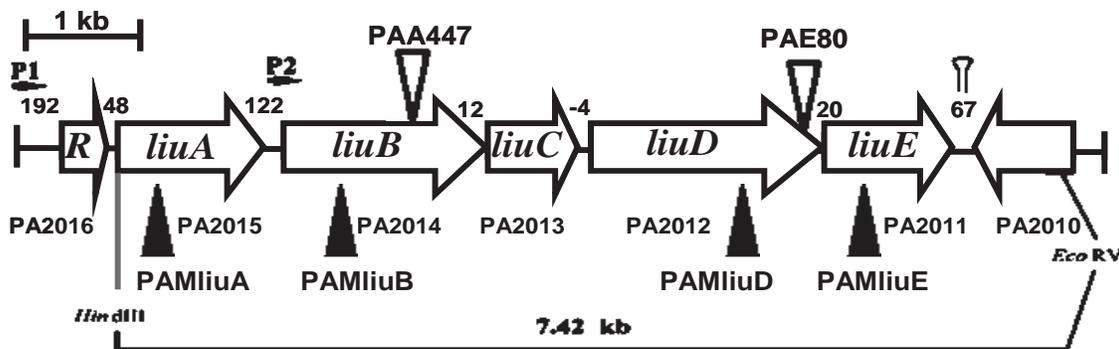


Fig. 2 Representación esquemática del arreglo genético del operón *gny* de *P. aeruginosa* PAO1. La localización de las inserciones por transposición y mutaciones por interrupción se indican con cabezas de flechas abiertas y sólidas, respectivamente. En el arreglo de los genes del operón *liu*, la dirección transcripcional se muestra por las flechas abiertas. Los números de los marcos de lectura abiertos (ORF) correspondientes a las designaciones *Pseudomonas* Genome Project (PGP) [PA2016 a PA2010] se muestran abajo. Las probables regiones promotoras P1 y P2 son mostradas como cabezas de flecha en negita. Un probable terminador transcripcional es indicado con una horquilla. Los números entre las flechas del arreglo génico indican la distancia en pares de bases entre genes adyacentes, un número negativo indica que los genes se encuentran superpuestos. Un fragmento de restricción *HindIII-EcoRV* (7.42kb) subclonado en el plásmido pAL-22 es mostrado abajo Modificado de [14].

Debido a la similitud estructural del citronelol y del geraniol, se asumió que la oxidación de ambos es catalizada por las mismas enzimas. Datos recientes sugieren que la oxidación del geraniol y/o geranial es dependiente de molibdeno y que la oxidación del citronelol es independiente de molibdeno [25]. Citronelil-CoA puede ser convertido a geranil-CoA mediante un paso de deshidrogenación y todas las subsecuentes reacciones son idénticas para el catabolismo del citronelol y geraniol. Geranil-CoA es difícil de metabolizar debido a la presencia de grupos metilos en posición beta los cuales pueden inhibir la oxidación β . Una de las enzimas clave de la vía catabólica del citronelol/geraniol es la Geranil-CoA carboxilasa (GCasa), la cual convierte el grupo metilo β de la cadena ramificada del Geranil-CoA en acetoacetato, el cual puede ser removido con mayor facilidad comparado con el grupo metilo. El producto final de la vía inferior del catabolismo de isoprenoides (7-metil-3-oxo-6-octenoil-CoA) puede ser degradado mediante dos vueltas de oxidación β , sin el impedimento estérico generado por los grupos metilos en posición beta. El metabolito resultante (3-metilcrotonil-CoA) es degradado en la vía del catabolismo de la leucina, que involucra otra carboxilasa (metilcrotonil-CoA carboxilasa) [1, 2, 8, 14].

Múltiples alineamientos de las secuencias nucleotídicas de los productos de los genes constitutivos del operón *liu* obtuvieron una elevada similitud con enzimas bioquímicamente caracterizadas, las cuales se muestran en la Tabla 1 [14].

En 2004 Díaz-Pérez *et al.*, obtuvieron mutantes afectadas en los genes *liuA*, *liuB*, *liuD* y *liuE*, los cuales mostraron incapacidad de crecer en isoprenoides como única fuente de carbono y energía; sin embargo, estas mutantes no fueron afectadas para crecer sobre 6-metil-5-hepten-2-ona, un alcano 3-metil ramificado que teóricamente concurre en 3-metilcrotonil-CoA, por lo que se asumió que el operón *liu* estaba involucrado en el catabolismo de isoprenoides [14].

Sin embargo, en el 2005 Höschle *et al.*, encontraron un operón homólogo en *P. aeruginosa*, al operón *liu*, el cual está implicado en el catabolismo de terpenos acíclicos denominado operón *atu* (acyclic terpenoids utilization) por sus siglas en inglés, el cual comparte una elevada similitud al operón *liu*. Un análisis de la secuencia nucleotídica del operón *atu* mostró que está constituido por ocho probables genes estructurales localizados en los ORFs PA2886 a PA2893. Este grupo secuenció las proteínas carboxilasas codificadas en ambos operones mediante la técnica de tripsinización, la cual originó 13 polipéptidos como resultado de la digestión enzimática. Posteriormente mediante un análisis comparativo de tales polipéptidos con las base de datos de *P. aeruginosa* se determinó que el operón

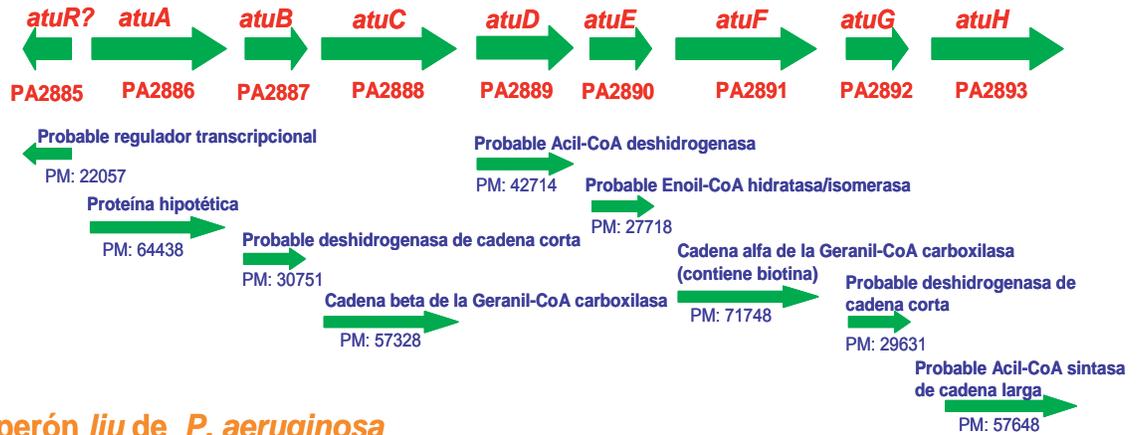
CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

gny poseía un alto índice de similitud al operón del catabolismo de la leucina e isovalerato por lo que se renombró al operón *gny* como operón *liu* (leucine and isovalerate utilization) (Figura 3).

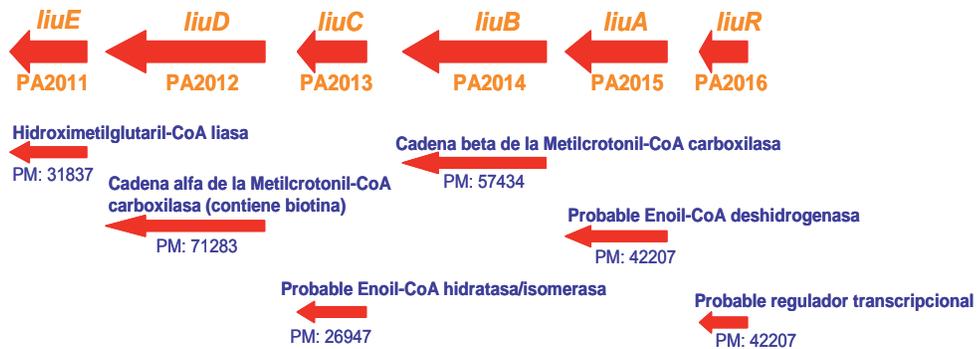
PROTEÍNAS QUE MUESTRAN IDENTIDAD DE AMINOÁCIDOS SIGNIFICATIVA CON LOS PRODUCTOS DEL OPERÓN <i>liu</i>				
<i>Proteína^a</i>	<i>Representante homólogo heterofuncional</i>	<i>Organismo</i>	<i>No. De accesión del GenBank^b</i>	<i>No. De aminoácidos (% de identidad)</i>
LiuR (PA2016) (134 aa)	Probable regulador transcripcional Proteína regulatoria del operón de resistencia a mercurio	<i>P. putida</i> KT2440 <i>Staphylococcus aureus</i> .	AAN69140 P22874*	132 (85) 135 (26)
LiuA (PA2015) (387 aa)	Probable acyl-CoA deshidrogenasa. Isovaleril-CoA deshidrogenasa. Probable acil-CoA deshidrogenasa.	<i>P. syringae</i> pv tomato DC3000. <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>P. aeruginosa</i> PA01.	AA056240 AAD45605* PA2889 [§]	447 (87) 409 (63) 386 (34)
LiuB (PA2014) (535 aa)	Sub-unidad β de la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa Acetil-CoA carboxilasa carboxiltransferasa. Probable carboxilasa dependiente de biotina	<i>P. putida</i> KT2440 <i>Myxococcus xanthus</i> <i>P. aeruginosa</i> PA01	AAN69655 BAB16296* PA2888 [§]	535 (85) 538 (50) 538 (45)
LiuC (PA2013) (265 aa)	Probable enoil-CoA hidratasa. Probable enoil-CoA hidratasa / isomerasa. p-hidroxicinamoil-CoA hidratasa / liasa.	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. aeruginosa</i> PA01 <i>P. fluorescens</i>	AAN69656 PA2890 [§] Y13067*	271 (67) 264 (38) 276 (33)
LiuD (PA1012) (655 aa)	Probable biotin carboxilasa, acetil-CoA carboxilasa. Subunidad α de la biotin carboxilasa acetil-CoA carboxilasa. Probable carboxilasa biotinilada.	<i>P. putida</i> KT2440 <i>Myxococcus xanthus</i> <i>P. aeruginosa</i> PA01	AAN69657 BAB16297* PA2891 [§]	650 (76) 573 (56) 661 (55)
LiuE (PA2011) (300 aa)	Hidroximetilglutaril-CoA liasa. 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa, <i>mvaB</i>	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. mevalonii</i>	AAN69141 AAA25895*	299 (78) 301 (59)

Tabla 1. Proteínas que muestran identidad de aminoácidos significativa con los productos del operón *liu*. ^a Nombre de las proteínas, en paréntesis se indican los correspondientes ORF del PGP. Seguindo de los nombres de las proteínas se muestra en número de aminoácidos (aa). Las proteínas fueron ordenadas de mayor a menor porcentaje de identidad. ^b* Proteínas involucradas en algunas funciones descritas; [§], ORF descrito en PA01 del PGP que puede estar involucrado en el catabolismo del 3-metilcrotonil-CoA. Modificado de ^[14].

(A) Operón *atu* de *P. aeruginosa*



(B) Operón *liu* de *P. aeruginosa*



(C) Probable operón *liu* de *P. putida*

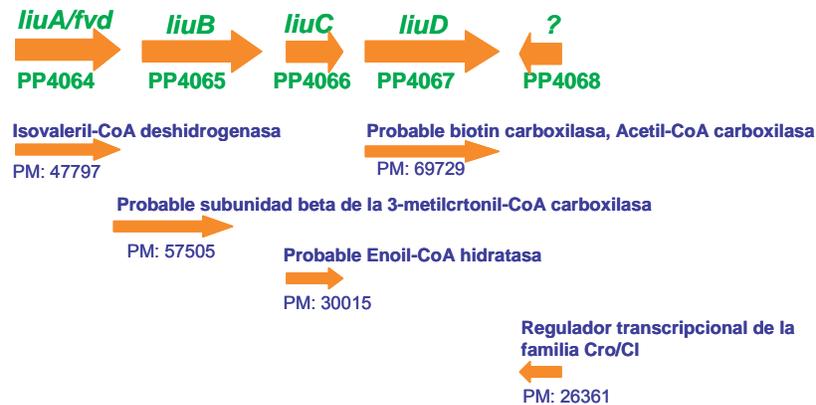


Fig. 3 Gupos de genes de *P. aeruginosa* PAO1 (A, B) (*atu* y *liu* respectivamente), y probable operón *liu* de *P. putida* (C) (datos y anotaciones provienen de <http://www.pseudomonas.com> y <http://www.tig.org>). Note que la inclusión del PA2885 (*atuR*) en *Atu* es hipotética, y no ésta es apoyada por datos experimentales. Se muestran los pesos moleculares deducidos (PM) de los productos de cada gene en Da. Modificado de [24].

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

Aguilar *et al.*, en el 2006 propusieron que los operones *atu* y *liu* codifican enzimas involucradas en la utilización de terpenos acíclicos y de leucina. Los ORFs PA2888 (*atuC*) y PA2891 (*atuF*) mostraron similitud con las subunidades α y β de la familia de las acil-CoA carboxilasas. Asimismo, Aguilar *et al.*, sugieren que el operón *atu* se encuentra conformado por 4 genes estructurales (*atuCDEF*) los cuales podrían codificar genes homólogos a los genes *liuABCD*. Este grupo de trabajo realizó un análisis de la secuencia de los aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes del operón *atu* correspondientes a varias *Pseudomonadaceae* mediante alineamientos múltiples. Solamente se encontró un operón homólogo en tales *Pseudomonadaceae*, que tienen mayor índice de similitud al operón *liu* que al operón *atu* (Figura 4) [1].

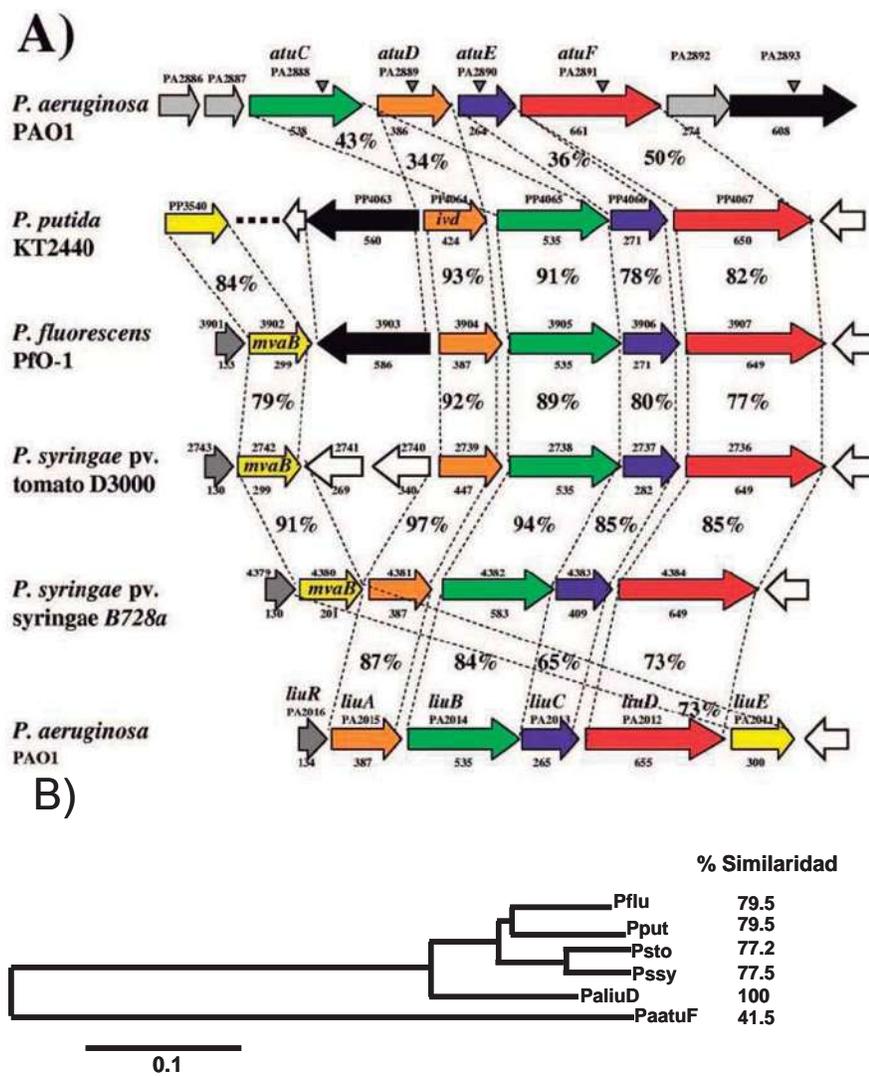


Fig. 4 Análisis bioinformática de las secuencias de los productos codificados por los operones *atu* y *liu*. (A) Arreglos genéticos de los operones homólogos *atu/liu* de especies *Pseudomonadaceae*. Las especies y los nombres de las cepas son

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

mostradas a la izquierda. El arreglo de los ORF's y la dirección transcripcional son mostradas por flechas. Las localizaciones de las inserciones transposicionales en las mutantes de *P. aeruginosa* son mostrados con cabezas de flecha sombreadas. Los números arriba de las flechas muestran el número del ORF asignado por el PGP. Los genes identificados también son mostrados. El número de aa de los ORF's son indicados debajo de las flechas. Las proteínas ortólogas correspondientes son indicadas por el mismo color. Los porcentajes de identidad de los aa entre los ORF's superior e inferior son indicados. (B) Árbol filogenético de las proteínas homólogas Atu/Liu de las especies *Pseudomonadaceae*. Las secuencias de los aa de LiuABCD y AtuDCEF fueron colocadas juntas como una secuencia y alineadas con secuencias homologas de las cepas indicadas. Los números indican el porcentaje de similitud entre las secuencias de los aa alineadas. Pflu, *P. fluorescens* PfO-1; Pput, *P. putida* KT2440; Psto, *P. syringae* pv tomato D3000; Pssy, *P. syringae* pv. *Syringae* B728a; PaatuF, *P. aeruginosa* PAO1 operón *atu*; PaliuD, *P. aeruginosa* PAO1 operón *liu*. La escala de distancia evolutiva es mostrada en el fondo de la imagen. Modificado de ^[1].

Interesantemente, no se encontró un gen homólogo a *liuE* en el operón *atu* ni en otro sitio del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 4), sugiriendo que LiuE podría tener una función dual participando en las rutas catabólicas de la leucina y del citranelol (Figura 5) ^[1].

Una cepa mutante de *P. aeruginosa* PAO1 en *liuE* fue incapaz de crecer en citranelol y leucina (Tabla 2), pero recuperó el fenotipo (capacidad de crecer sobre citranelol y leucina) al complementarse con el cósmido pMO013850 (el cual contiene clonado el operón *liu*) pero no por el cósmido pMO011609 (que contiene clonado el operón *atu*) confirmando que LiuE está localizado en el operón *liu* en *P. aeruginosa* y que es necesario para la degradación de leucina y de terpenos acíclicos ^[1].

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

Cepas	Crecimiento en ^a :			Tiempo de duplicación (h) ^e
	Citronelol	l-Leucina	l-Isoleucina	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1SM	+++	+++	+++	8.2
<i>P. fluorescens</i> L1	-	+++	+++	ND ^f
<i>P. putida</i>	-	+++	+++	ND
PAO2893 ^b	+++	+++	+++	8.0
PAO <i>atuD</i> ^b	-	+++	+++	7.5
PAO <i>atuE</i> ^b	-	+++	+++	11.2
PAO <i>atuC</i> ^b	-	++	+++	13.1
PAO <i>atuF</i> ^b	-	+	+++	13.5
PAO <i>atuF</i> (pAL-22) ^b	-	++	+++	6.5
PAO <i>atuF</i> (pAL-23) ^b	+++	+++	+++	7.0
PAM1529 (mutante en <i>atuF</i>) ^c	-	+++	+++	13.1
PAM1529 (pAL-22) ^c	-	+++	+++	6.5
PAM1529 (pAL-23) ^c	+++	+++	+++	6.5
PAE80 (mutante en <i>liuD</i>) ^c	-	-	+++	ND
PAE80 (pAL-22) ^c	+++	+++	+++	9.0
PAE80 (pAL-23) ^c	-	-	+++	ND
PAM <i>liuD</i> ^d	-	-	+++	ND
PAM <i>liuD</i> (pAL-22) ^d	+++	+++	+++	9.7
PAM <i>liuD</i> (pAL-23) ^d	-	-	+++	ND
PAO <i>liuD</i> ^b	-	+++	+++	ND
PAM <i>liuA</i> ^d	-	-	+++	ND
PAM <i>liuB</i> ^d	-	-	+++	ND
PAM <i>liuE</i> ^d	-	-	+++	ND
PAO <i>atuF liuD</i>	-	-	+++	ND
PAO <i>atuF liuB</i>	-	-	+++	ND
PAO <i>atuF liuE</i>	-	-	+	ND
PAO <i>atuC liuE</i>	-	-	+	ND

Tabla. 2 Fenotipos del crecimiento de las cepas de *Pseudomonas*. ^a Las cepas fueron inoculadas en placas con medio mínimo M9 con los compuestos indicados como fuente de carbono e incubadas por 48 h a 30 °C. +++ Buen crecimiento, ++ crecimiento medio, + poco crecimiento; - sin crecimiento. ^b Mutante obtenida por Jacobs *et al.*, (sin efectos polares río abajo de la expresión del gene). ^c Mutantes obtenidas por Díaz-Pérez *et al.* 2004 (con efectos polares río abajo de la expresión del gene). ^d Una mutante obtenida por recombinación homóloga (con efectos polares río abajo de la expresión del gene). ^e Tiempos de incubación dobles de los cultivos crecidos en medio mínimo líquido M9 adicionado con leucina (0.2 % p/v) como única fuente de carbono, incubadas a 30 °C con agitación constante a 150 rpm. El crecimiento fue medido por la densidad óptica medida a 600 nm y calculada en la fase de crecimiento logarítmica. ^f ND, no determinado Modificado de ^[14].

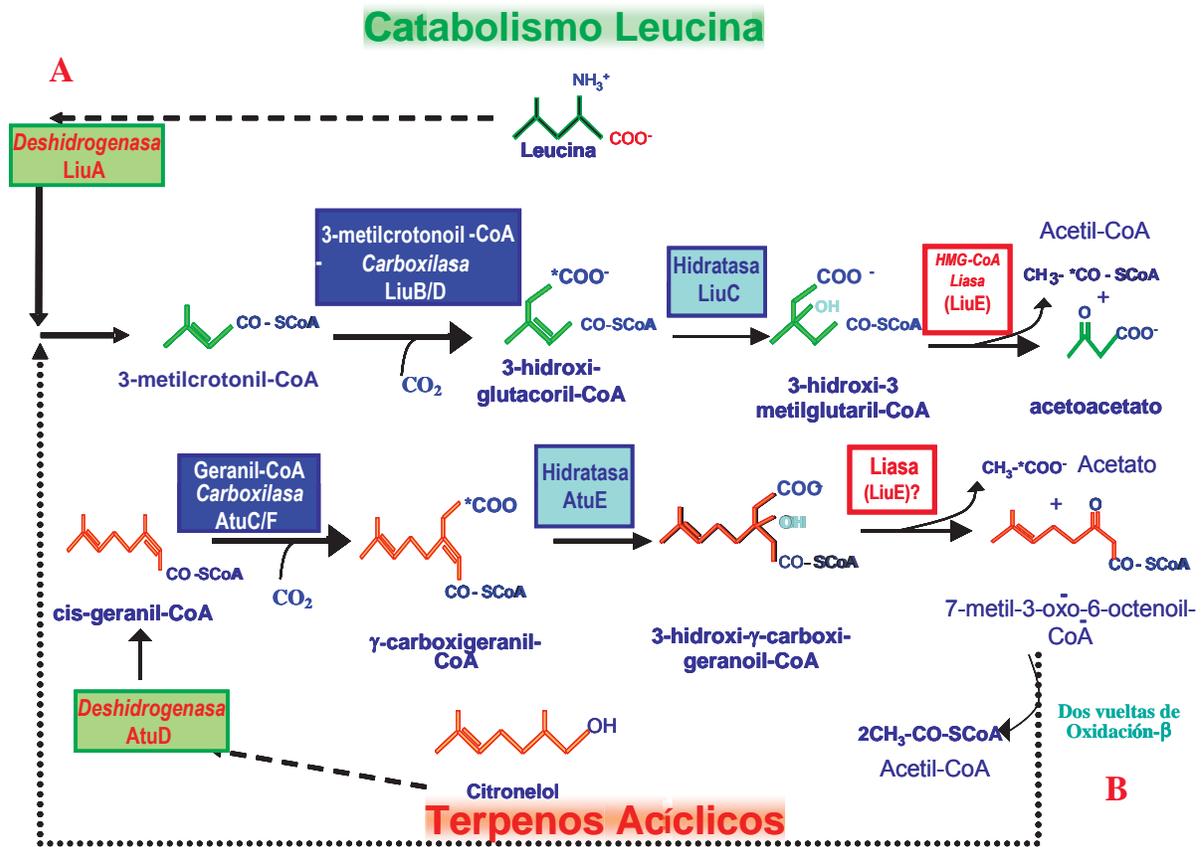


Fig. 5 Vías catabólicas y funciones propuestas de los productos codificados por los operones *atu* y *liu* de *P. aeruginosa* PAO1. (A) Vía inferior del catabolismo de la Leucina, (B) Vía inferior del catabolismo de los terpenos acíclicos. LiuA, isovaleril-CoA deshidrogenasa; LiuB/LiuD, 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa; LiuC, 3-metilglutaconil-CoA hidratasa. LiuE, 3-hidro-3-metilglutaril-CoA liasa y 3-hidroxi- γ -carboxigeranil-CoA liasa; AtuD, citronelil-CoA deshidrogenasa, AtuC/AtuF, geranil-CoA carboxilasa; AtuE, γ -carboxigeranil-CoA hidratasa. Modificado de Aguilar *et al.*, 2006.

Förster y Jendrossek en el 2006 identificaron un operón homólogo al operón *atu* de *P. citronellolis* el cual está conformado por nueve ORFs (*atuRABCDEFGH*) y los productos codificados en dichos mostraron hasta un 91 % de similitud a las proteínas codificadas en el operón *atuRABCDEFGH* de *P. aeruginosa* mostrando también una organización estructural idéntica [18].

Höschle *et al.*, en el 2005, mediante electroforesis bidimensional, observaron algunos de los productos codificados en los operones *atu* y *liu*, encontrando que solamente 5 de los 8 productos codificados en los genes del operón *atu* (AtuA, AtuB, AtuE, AtuF y AtuG), fueron identificados en células crecidas en citronelol y citronelato, pero no estaban presentes en las células crecidas en isovalerato o succinato [24].

Este grupo de trabajo observó en el análisis bidimensional a las enzimas involucradas en la vía inferior del catabolismo del citronelol (la deshidrogenasa, la carboxilasa y la hidratasa), además de otras cuatro proteínas que presentaron un alto índice de similitud a un transportador ABC y proponen la función de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA:acetato-liasa al producto codificado en el gen *atuA*, a pesar de que el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína AtuA sugiere su participación en el transporte de isoprenoides (Figura 6) ^[24].

Díaz-Pérez *et al.*, en el 2007 proponen la vía de la oxidación completa del catabolismo de los isoprenoides, y la dividieron en 5 etapas: la primera involucra la oxidación del citronelol y geraniol a su correspondiente aldehído llevada a cabo mediante enzimas análogas a alcanos hidroxilasas y posteriormente a sus ácidos correspondientes (ácido geránico y citronélico); la segunda consiste en la producción de los correspondientes terpenoil-CoA llevado a cabo por acil-CoA sintasas; la tercera consiste en una carboxilación seguida de una descarboximetilación del acil-CoA originando 3-metilcrotonil-CoA (MC-CoA); la cuarta consiste en el rompimiento de la molécula de MC-CoA generándose dos productos el acetoacetato y acetil-CoA y, por último, la quinta etapa se refiere a la canalización de los productos a otras vías metabólicas para producir energía y componentes celulares como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el ciclo del glioxilato.

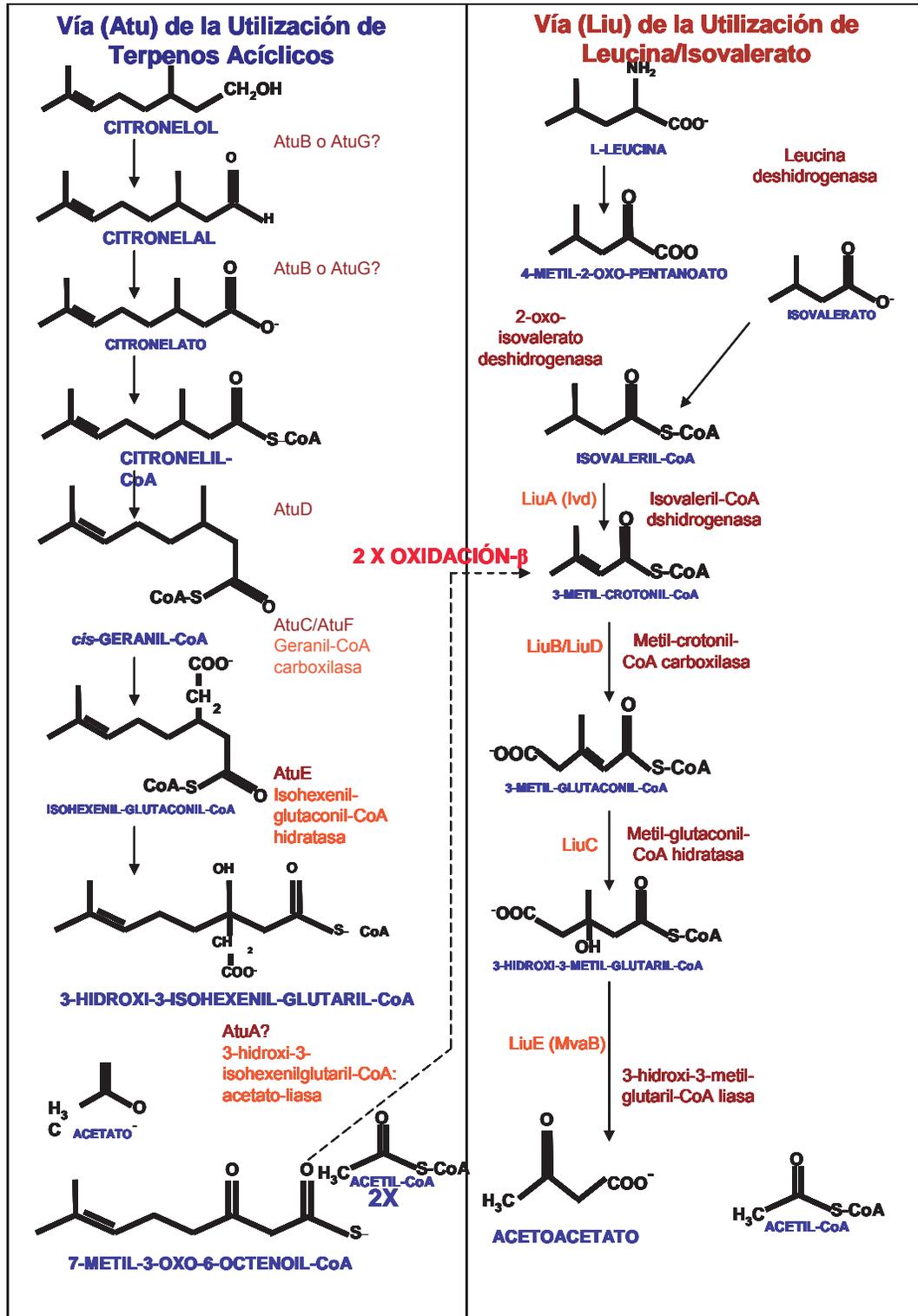


Fig. 6 Vías de utilización de los terpenos acíclicos (Atu) y de leucina (Liu) de acuerdo a Seubert y Fass modificada por Höschle *et al.* 2005. Funciones propuestas basadas sobre el análisis fenotípico, determinación de la actividad, Western-Blot y/o alineamientos de los aa de los productos de los genes identificados. Los marcados con el signo de interrogación son asignamientos especulativos. Modificado de [24].

III JUSTIFICACIÓN

Se ha propuesto que una de las etapas importantes en las rutas catabólicas de la leucina y de los terpenos acíclicos es realizada por una acil-CoA liasa. La caracterización bioquímica de la HMG-CoA liasa (LiuE) contribuirá a mejorar el entendimiento del mecanismo bioquímico en ambas rutas.

IV HIPÓTESIS

El gen *liuE* (ORF PA2011) de *P. aeruginosa* codifica una 3-hidroxi-3-metil glutaril-CoA liasa (HMG-CoA liasa) que participa en las rutas catabólicas de la leucina y de los terpenos acíclicos.

V OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la función de la proteína LiuE de *P. aeruginosa* en el catabolismo de la leucina y de los terpenos acíclicos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener la proteína LiuE de *P. aeruginosa*.
2. Determinar los parámetros bioquímicos de LiuE con los sustratos de ambas rutas catabólicas, HMG-CoA y HIHG-CoA.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS

Tabla 3. Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo.

Cepas	Características	Referencias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1SR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 resistente a estreptomicina	Wong y Mekalanos, 2000
PAMgnyL	PAO1SM <i>gnyL</i> ::Gm ^r , mutante obtenida por recombinación.	Díaz-Pérez <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio supE, thi, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q Z ΔM15]	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E.coli-liuEa</i>	JM101 transformada con el plásmido pGLE24	Este trabajo
<i>E.coli-liuEb</i>	JM101 transformada con el plásmido pTLE2011	Este trabajo
<i>E. coli</i> pTrAtuE	TOP10 transformada con el plásmido pTrcHis2A (contiene un fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de 0.759 kb correspondiente al ORF PA2890).	Díaz-Pérez 2006
<i>E. coli</i> pHPc	TOP10 transformada con el plásmido pHPc (pTrcHis2C con el fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de 1.6 kb de pGEM-atuC)	Pacheco-Lamas 2006
pHPf	TOP10 transformada con el plásmido pHPf (pTrcHis2C con el fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de 1.98 kb de pGEM-atuF)	Pacheco-Lamas H. R. 2006
Plásmidos	Características	Referencias
pMO013850	Cósmido pLA2917 más 25 kb del genoma PAO1, incluyendo el operon <i>gny</i> .	<i>Pseudomonas</i> Genetic Stock Center
pGEM-T Easy	Plásmido empleado para la clonación de productos de PCR; Ap ^R	Promega
pTrcHis2A	Plásmido empleado para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .	Invitrogen
pGLE24	pGEM-T Easy más el ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> .	Este trabajo
pTLE2011	pTrcHis2A más un inserto de 0.9 kb del ORF PA2011 de <i>P. aeruginosa</i> .	Este trabajo

6.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados fueron preparados de la siguiente manera:

- **Caldo Luria-Bertani (CLB)** (Ausubel *et al.*, 1999).
Peptona de caseína 10 gamos 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 adicionado con Glucosa (M9G).**
K₂HPO₄ 120 g/l, KH₂PO₄ 60 g/l, NaCl 10 g/l, NH₄Cl 20 g/l, 0.0001 M CaCl₂, 0.002 M MgSO₄,
0.2 % Glucosa.

Nota: El medio mínimo fue complementado con 0.5 ml/l de disolución de trazas de metales [2 g/l MnSO₄·H₂O, 0.8 g/l Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 0.2 g/l CoCl₂·6H₂O, 0.2 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0.02 g/l CuCl₂·2H₂O, 0.02 g/l NiCl₂·6H₂O, 0.02 g/l Na₂MoO₄·2H₂O, 0.02 g/l NaSeO₄, 0.02 g/l NaWO₄].

6.3 MÉTODOS

6.3.1 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

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

6.3.1.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina

- a) 3 ml de un cultivo crecido en CLB durante toda la noche a 30 °C con agitación constante, fueron centrifugados a 12,000 rpm en una microcentrifuga durante 2 minutos, para sedimentar las células.

- b) Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 150 μ l del amortiguador STE [sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, Ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) 10 mM, pH 8], se adicionaron 20 μ l de lisozima (20 mg/ ml) se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante un periodo de tiempo de 5-10 minutos.
- c) Se adicionaron 150 μ l de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 10 % mezclando suavemente y se incubó en hielo durante 10 minutos.
- d) Se agregaron 150 μ l de una solución 3 M de acetato de sodio (pH 4.8), se incubó 10 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos.
- e) Se adicionaron 150 μ l de una solución fenol-cloroformo (1:1), se agitó suavemente durante 40 segundos y se centrifugó durante 7 minutos a 13,000 rpm.
- f) El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron 500 μ l de una solución de etanol (EtOH)-isopropanol (60:40 % v/v) y se incubó en hielo hasta precipitar el ADN. Se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm.
- g) Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada 2 veces con 500 μ l de EtOH al 70 % y se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm, posteriormente fue secada a 37 °C y resuspendida con 50 μ l de agua destilada estéril. Se agregaron 3 μ l de RNAsa (5 μ l/ ml).
- h) Las muestras se almacenaron a -20 °C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

6.3.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

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

- 1) La agarosa se preparó al 1 % disuelta en el amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M, pH 8.5).
- 2) Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis con el amortiguador TAE. Las Muestras de ADN (3 μ l) se mezclaron con amortiguador de carga (2 μ l) (azul de bromofenol 0.25 % y xilene cianol FF 0.25 % en solución de glicerol al 30 %) y se colocaron en los pozos del gel, así como un marcador de tamaño molecular de ADN lineal (ADN del fago lambda digerido con la(s) endonucleasa *HindIII* o *EcoRI*, Promega).
- 3) La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder y el corrimiento electroforético se realizó aplicando de 90 a 130 volios durante media hora.

- 4) Posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 10 minutos y los geles se observaron en el transiluminador de luz UV de onda corta (Vilber Lourmat).
- 5) Los geles fueron fotografiados por medio de un fotodocumentador BioCaptMw Vilbert Lourmat.

6.3.3 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

La recuperación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó empleando el kit Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones:

- a) Se cortó la banda de interés del gel de agarosa con un bisturí y se colocó en un tubo eppendorf.
- b) Se adicionaron 30 μ l de amortiguador L1 (amortiguador para la solubilización del gel) por cada 10 mg de gel.
- c) Se incubó a 50 °C por 3 minutos, mezclando cada 30 segundos hasta que se disolvió la agarosa.
- d) Se colocó una columna en un tubo de lavado de 2 ml. La columna se cargó con la mezcla del paso anterior y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto.
- e) Se adicionaron 700 μ l de amortiguador L2 (amortiguador de lavado conteniendo etanol) en la columna, se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm.
- f) La columna se introdujo en un tubo eppendorf y se adicionaron 50 μ l de agua destilada estéril en el centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y para recuperar el filtrado se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos.

6.3.4 TRANSFORMACIÓN

6.3.4.1 Preparación de células competentes de *E. coli*

- a) La cepa *E. coli* JM101 se creció en 3 ml de CLB con agitación constante a 30 °C durante toda la noche.
- b) Se transfirió el cultivo a 250 ml de CLB contenido en un matraz bafleado de 1 litro. Se incubó a 37 °C a 200 rpm durante 2-3 h hasta obtener una densidad óptica entre 0.6 y 0.8 a 600 nm ($D.O._{600nm}=0.6-0.8$).

- c) El cultivo fue colocado en hielo durante 10 min con agitación ocasional y después se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min a 4 °C con un rotor Eppendorf F34-6-38.
- d) Las células obtenidas fueron lavadas dos veces con 50 ml de agua destilada estéril fría y fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- e) Las células obtenidas fueron lavadas dos veces con 50 ml de una solución de glicerol al 10 % (v/v) estéril fría y fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- f) Las células fueron resuspendidas en 700 µl de glicerol al 20 % (v/v) estéril, fría.
- g) Se repartieron las células en alícuotas de 200 µl y fueron almacenadas a -70 °C.

6.3.4.2 Transformación de células competentes de *E. coli*

- a) A 100 µl de células competentes se les adicionó 1 µl de la mezcla de ligación de DNA plasmídico (50 ng), la mezcla se colocó entre los electrodos de una celda en la cámara del electroporador (Power N Pac 300, BioRad) y se le dió un pulso de 1.8 a 2.2 kV durante 5 milisegundos.
- b) Inmediatamente después las células fueron transferidas a un tubo con 1 ml de CLB y se incubaron a 30 °C durante 2 h con agitación constante.
- c) Posteriormente 100 µl del cultivo de las células electroporadas fueron distribuidas en una placa ALB adicionada con ampicilina (Ap) 100 µg/ ml (para los plásmidos recombinantes provenientes de pUCP20) o con Ap 100 µg/ ml, 25 µg/ ml de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-tiogalactósido) (USB) y 50 µg/ ml de IPTG (Isopropil-tio-β-galactósido) (USB) para las construcciones provenientes del vector pGEM[®]-TEasy que contenía el gen *liuE*.
- d) Las colonias seleccionadas (en el primer caso clonas resistentes a Ap y clonas blancas resistentes a Ap en el segundo caso) se crecieron en tubos con 3 ml de CLB para realizar el aislamiento del ADN plasmídico y caracterizarlo.

6.4 PROCESOS ENZIMÁTICOS

6.4.1 RESTRICCIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS

El ADN fue digerido empleando una unidad de endonucleasa por µg de ADN en la solución amortiguadora conveniente e incubando mínimo una hora a 37 °C, transcurrido el tiempo de reacción se inactivó la enzima a 60 °C durante 10 minutos. Después se llevó a cabo la electroforesis de la mezcla

de restricción en gel de agar al 1 % con la finalidad de observar el tamaño de los fragmentos generados.

6.4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

6.4.2.1 Amplificación del gen *liuE*

La amplificación del ORF PA2011 (gen *liuE*) fue hecha empleando ADN del cósmido pMO013850 como molde. El oligonucleótido LIB (5'GGGATCCCATGAACTGCCGAAGAAGGTCCGC3') fue usado para generar un sitio de restricción *Bam*HI (subrayado) y el L2H (5'AAGCTTGGCCTTGGCCAGCAACGCTTT3') fue usado para generar un sitio de restricción *Hind*III (subrayado), originando un fragmento de 900 pb.

La reacción de amplificación se realizó con la siguiente mezcla de reacción: se realizó el aislamiento del cósmido pMO013850 (cósmido pLA2917 más 25 kb del genoma de PAO1, incluyendo el operón *liu*) empleado como molde (10-200 ng), oligonucleótidos (30 picomoles), amortiguador de reacción 10X (5 µl), dNTP (0.25 mM), MgSO₄ 1 mM y 1 unidad de ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). Esta mezcla se llevó a un volumen final de 50 µl, posteriormente se sometió a un ciclo de 94 °C/5 minutos, después a 35 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 94 °C/35 seg (desnaturalización), 56 °C/40 seg (alineamiento), 68 °C/1 min (polimerización) y un ciclo final de 68 °C/5 min. Los ciclos de amplificación se realizaron en el termociclador Perkin Elmer modelo PCR System/2400. Se corrió una electroforesis del ADN obtenido por PCR para verificar la pureza del gen *liuE*, se procedió a realizar adenilación del producto de PCR para posteriormente ser ligado con el respectivo vector linearizado en una proporción 3:1(DNA-vector pGEM[®] -T Easy), utilizando la enzima ADN ligasa incluida en el kit del vector pGEM[®] -T Easy, llevando la reacción de ligación a 25 °C durante 1 hora o a 4 °C durante toda la noche.

6.4.3. ADENILACIÓN DE ADN

Debido a que en la PCR se empleó la polimerasa de alta fidelidad Platinum Pfx para llevar a cabo la PCR, la cual a diferencia de la *Taq* polimerasa no adiciona adeninas en los extremos del producto de PCR, el ADN fue adenilado para generar extremos cohesivos con respecto al vector de clonación. La reacción de adenilación se llevó a 70 °C durante un periodo de 30 minutos. La mezcla de reacción de adenilación se realizó de la siguiente manera: se emplearon 100-500 ng de ADN del

producto de PCR, 1 µl amortiguador 10X para la *Taq* polimerasa, 5 U de *Taq* polimerasa, 0.6 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.2 µl dNATPs 2.5 mM y agua destilada estéril c.b.p. 10 µl.

6.4.4. CLONACIÓN DE *liuE* EN EL VECTOR pGEM-T Easy

6.4.4.1. Ligación de ADN

Los fragmentos de ADN fueron ligados manteniendo una proporción 2:1 (inserto-vector ng), utilizando 3 U de la enzima ADN ligasa del fago T4 (Promega), 5 µl del amortiguador 2X y agua destilada estéril c.b.p. 10 µl. La reacción de ligación se realizó a temperatura ambiente por un periodo de 1 h y se procedió a transformar las cepas correspondientes.

6.4.5. SUBCLONACIÓN EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pTrcHis2A

La subclonación de *liuE* se realizó bajo las siguientes condiciones: 150 ng del fragmento de ADN (*liuE*), 30 ng del vector pTrcHis2A, 2 µl del amortiguador 10X, 1 U de la ADN ligasa del fago T4 y agua destilada estéril c.b.p. 10 µl. La reacción de ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de 16 h. Se procedió a transformar la cepa correspondiente.

6.5 PROCEDIMIENTOS CON PROTEÍNAS

6.5.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

A partir de cultivos crecidos en tubo toda la noche se inocularon matraces con medio LB ampicilina 50 µg/ ml. Se incubaron a 37 °C con agitación a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6 ($DO_{600\text{ nm}}=0.6$), en este punto se les adicionó isopropil tio-β-galactósido (IPTG) a una concentración final 0.1 mM se incubó durante 18 horas para llevar a cabo la inducción de la expresión de la proteína. Se realizó un monitoreo del crecimiento bacteriano con la finalidad de determinar el tiempo óptimo de la expresión de la proteína LiuE. Cada uno de los puntos monitoreados fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

6.5.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se realizó una curva estándar de determinación de proteína usando albúmina sérica bovina (BSA) preparada de un stock de 1 mg/ml. Para llevar a cabo la determinación de la proteína purificada, se realizó una dilución 1:10 con NaCl 0.15 M.

6.5.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Se elaboró un gel desnaturalizante al 10 %, se llenó la cámara de electroforesis con el amortiguador de corrida Tris-Glicina, se cargó el gel con las proteínas en cada carril, se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió a un amperaje constante de 30 mA por gel, se dejó correr durante 2 h y 15 minutos. Después de que se corrió el gel por el tiempo indicado se apagó la fuente de poder, se desensambló la cámara, se removió el gel y éste fue teñido con azul de Coomassie.

6.5.4 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA LIASA (LiuE)

La cepa de *E. coli-pTLE2011b* fue crecida en medio LB (200 ml), al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6 se indujo el cultivo con 0.1 mM de IPTG y se incubó durante 24 h a 30°C con agitación a 150 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, la pastilla celular se lavó y resuspendió en el amortiguador de equilibrio 1X pH 8.0. A la suspensión bacteriana se le adicionó el inhibidor de proteasas Fluoruro fenilmetilsulfonil (PMSF) a una concentración final de 1 mM, se lisó mediante sonicación y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, la fracción soluble se aplicó en 300 µl de la resina de afinidad metálica TALON™ (DB Biosciences) previamente equilibrada con el amortiguador de equilibrio 1X pH 8.0. La suspensión se agitó suavemente por una hora a 4°C y centrifugada a 13,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se removió y desechó. El complejo resina-proteína se lavó con el amortiguador de lavado con imidazol 15 mM pH 8.0. Para eluir la proteína se adicionaron 500 µl del amortiguador de elución con imidazol 500 mM pH 7.0 y se agitó suavemente durante 20 minutos a 4°C, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C, se recuperó la fracción soluble.

6.5 5 RENATURALIZACIÓN DE LiuE

La proteína purificada se dializó (en el amortiguador 25 mM de fosfatos pH 6.7, adicionado con una concentración final de 31.25 mM de ditioneitol (DTT), la mezcla se incubó durante 1 h a 4 °C y concentrada en un dispositivo Amicon Ultra-4 con un filtro de 30 kDa MWCO (Milipore), la disolución se centrifugó dos veces 5 minutos a 5,000 rpm a 4°C, la actividad se midió como se describe más adelante. Finalmente la concentración de la proteína se determinó mediante el método de Bradford (Sambrook *et al.*, 1989).

6.5.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS (BLUE NATIVE PAGE)

La electroforesis en condiciones nativas azul es un método de cambio de carga desarrollado para el aislamiento de complejos proteínicos de membrana que también es útil para separar proteínas hidrosolubles tanto ácidas como básicas a un pH fijo de 7.5, además este método analítico sirve para determinar la masa molecular y el estado de oligomerización de complejos no disociados, determinación de la composición de subunidades, determinación de interacciones proteína-proteína; así como para la determinación del grado de pureza. El colorante es suficientemente soluble en agua, pero éste también se puede unir a las proteínas debido a sus propiedades hidrofóbicas. La unión de un gran número de moléculas del colorante impone un cambio de carga a las proteínas que causa que aún las proteínas básicas migren hacia el ánodo a un pH 7.5 durante la BN-PAGE. Sin embargo, las proteínas no son separadas de acuerdo a la relación masa/carga pero sí de acuerdo al tamaño, en los geles con gradientes de poliacrilamida. La migración de las proteínas gradualmente desacelera con la distancia de corrimiento y con la disminución del tamaño de poro en un gel con gradiente de poliacrilamida. Proteínas individuales deben de parar casi completamente cuando se aproximan al límite del tamaño del poro específico dependiendo de su tamaño. Debido a que la superficie de las proteínas está cargada negativamente, éstas se repelen unas a otras, por lo que la tendencia de formación de agregados proteicos es considerablemente reducida ^[42, 43, 50].

6.5.6.1 Condiciones del corrimiento electroforético

Se dejó a temperatura ambiente el gel prefabricado (BioRad) durante 10 min, una vez pasado el período de tiempo, se extrajo el cassette de plástico con el gel de poliacrilamida Tris-HCl, 4-20 % y se armó el equipo de electroforesis empleando el cassette del gel prefabricado y el “dique plástico”

complementario del equipo para formar el tanque superior de la cámara de electroforesis, se adicionó el amortiguador de corrida para geles nativos, se colocaron las muestras así como los marcadores de estado de oligomerización, se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se corrió la electroforesis a un amperaje constante de 10-20 mA (empleando un amperaje constante de 10 mA se desarrolla un volaje de 35 V al inicio y 68 V al final del corrimiento electroforético) hasta la salida del colorante. Se apagó la fuente de poder y se desconectó la cámara de electroforesis, se extrajo el gel nativo y se le realizó la tinción de azul de Coomassie empleando el protocolo rápido de la casa comercial Fermentas.

6.5.6.2 Tinción de azul de Coomassie (protocolo rápido FERMENTAS)

Se lavó el gel en 100 ml de agua desionizada o destilada y se calentó en un recipiente abierto durante 1 min en microondas (esta operación se repitió tres veces), se agregaron 20 ml (o el volumen necesario para cubrir el gel) de la solución de tinte para proteínas PAGEBLUE, y se calentó durante 30 segundos en microondas (cuidando que la solución no hierva), se agitó suavemente (esta operación se repitió cuatro veces), se lavó el gel con agua desionizada o destilada caliente (o se calentó el recipiente en microondas durante 30 segundos) hasta desteñir el gel.

6.5.7 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional (2D), separa proteínas de acuerdo a dos parámetros independientes, el punto isoelectrónico (pI) en la primera dimensión isoelectroenfoco (IEF) y la masa molecular relativa (Mr) en la segunda dimensión en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Las proteínas son moléculas anfotéricas que contienen grupos ácidos y básicos. Estos pueden llegar a ser protonados o deprotonados dependiendo del pH del microambiente donde se localizan. En ambientes básicos, los grupos ácidos llegan a ser cargados negativamente, en ambientes ácidos los grupos básicos son cargados positivamente. La carga neta de las proteínas es la suma de todas las cargas positivas y negativas, de las cadenas laterales de los aminoácidos. Cuando un campo eléctrico es aplicado, las proteínas pueden migrar hacia el extremo opuesto de su carga neta. Al alcanzar el punto isoelectrónico la proteína no posee carga y deja de migrar ^[27].

6.5.7.1 Preparación de la muestra

Se precipitaron 40 µg de LiuE purificada y renaturalizada en 500 µl de acetona fría, se incubó durante 2 horas a -20 °C, se centrifugó 15 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante se eliminó y la proteína precipitada se incubó a 37 °C durante 15 minutos con la finalidad de eliminar el remanente de acetona volatilizándola.

6.5.7.2. Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)

La preparación de los geles para el IEF se realizó con el protocolo de O'Farrel modificado de la siguiente manera: para 10 ml de gel se mezclaron 0.9 ml de acrilamida al 30 % (acrilamida 28.38 %, N,N-metilen-bis-acrilamida 1.62 %), 5.5g de urea, 200µl de Nonidet-P 40 (NP-40), 200 µl de anfolitas pH 3-10, 200 µl de anfolitas pH 5-8, 10 µl de TEMED y 20 µl de PSA al 10 %. Previo a su polimerización, el gel se cargó en unos capilares de vidrio de (14X0.2 cm), bloqueados por un extremo con Parafilm®, los capilares fueron llenados hasta 11 cm con el gel y el resto con agua desionizada. Una vez polimerizado el gel, se retiró el Parafilm®, se eliminó el agua de los capilares y se montaron en el equipo de electroforesis en capilar (Biorad). En la parte superior del capilar se adicionaron 30 µl del amortiguador de lisis y 30 µl del amortiguador K el resto del capilar fue llenado con el amortiguador del ánodo. Se adicionó el amortiguador del cátodo en el tanque inferior del equipo de electroforesis en capilar (hasta cubrir aproximadamente 1 cm de la parte inferior de los capilares) y al amortiguador del ánodo en el tanque superior del equipo hasta cubrir la parte superior de los capilares evitando la formación de burbujas en ambos extremos de los capilares. El equipo se conectó a la fuente de poder y se realizó una pre-corrída de los geles con la finalidad de generar el gradiente de pH, las condiciones del corrimiento electroforético fueron las siguientes 200 V (30 min), 300 V (30 min) y 400 V (60 min). Al finalizar la corrida, se retiró el amortiguador del ánodo sin desmontar el equipo de electroforesis y se lavó la parte superior de los capilares con agua desionizada tres veces. La muestra previamente tratada se resolubilizó mediante la adición de 30 µl del amortiguador de lisis, una vez solubilizada la muestra, se cargo en la superficie del capilar y se añadieron 30 µl del amortiguador K, el resto del capilar fue llenado con el amortiguador del ánodo. Se adicionó el amortiguador del ánodo en el tanque superior del equipo hasta cubrir la parte superior de los capilares evitando la formación de burbujas. El equipo se conectó nuevamente a la fuente de poder y se corre a 400 V durante un periodo de 20 horas. Una vez que se terminó el periodo de corrimiento electroforético, se desmontó el equipo de electroforesis, se extrajeron los geles de los capilares y se pusieron a equilibrar en el amortiguador

“O” por lo menos durante un periodo de dos horas a -20 °C. Las proteínas separadas mediante el IEF se resolvieron posteriormente mediante SDS-PAGE al 12 % de poliacrilamida.

6.5.7.3 Segunda dimensión: SDS-PAGE al 12 %

Se obtuvieron los geles del IEF y se colocaron acostados en los soportes de los geles para la SDS-PAGE al 12 %, y se fijaron con 5 ml de agarosa al 1 % disuelta en el amortiguador “O”, una vez gelificada la agarosa se resolvió la segunda dimensión. Se adicionó el amortiguador de corrida para SDS-PAGE en la cámara de electroforesis, ésta se conectó a la fuente de poder y se realizó el corrimiento electroforético a 100 V hasta que salió el colorante.

6.5.7.4 Tinción con plata

Después de la 2D-PAGE, las proteínas separadas deben de ser visualizadas mediante métodos de tinción generales o específicos. Para el presente estudio se empleó el método de tinción con plata debido a que es más sensible que los métodos del Azul brillante de Coomassie o la tinción de Zinc.

Los iones plata se unen a las proteínas, los cuales pueden ser reducidos bajo condiciones apropiadas, para obtener una imagen visible. Todos los protocolos para la tinción de plata constan de las siguientes etapas:

- I. Fijación con la finalidad de eliminar compuestos que pudiesen interferir con la tinción.
- II. Sensibilización y lavado para aumentar la sensibilidad y contraste de la tinción.
- III. Impregnación de los geles con plata (solución de nitrato de plata o solución de un complejo de plata-amonio).
- IV. Lavado y revelado.
- V. Paro de reacción y lavado de la reacción, con la finalidad de eliminar el exceso de iones plata.

El protocolo que se empleó en el presente trabajo fue el siguiente:

Se realizaron 5 lavados de 30 minutos con agua desionizada con agitación constante (con la finalidad de eliminar las anfolitas y evitar falsos positivos), se adicionó la solución fijadora y las proteínas se fijaron durante 15 minutos, se lavaron dos veces con agua desionizada por un periodo de 5 minutos, se incubaron durante 1 minuto con solución de sensibilización; se hicieron dos lavados con

agua desionizada durante 20 segundos, se incubaron durante 15 minutos con nitrato de plata 0.1 % fría, se lavó un minuto con agua desionizada, se revelaron y se incubaron hasta que aparecieron las manchas (spots). La reacción fue detenida añadiendo una solución de ácido acético glacial gado analítico al 1 % ^[11].

6.5.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA HMG-CoA LIASA DE *P. aeruginosa*.

La determinación de la actividad de la HMG-CoA liasa se realizó mediante el método descrito por Wanders *et al.*, (1988) con variaciones ^[50]. La mezcla de reacción contiene 50 mM (para las determinaciones de la concentración óptima de proteína, determinación del tiempo óptimo) ó 20 mM (para el resto de las determinaciones) amortiguador de fosfatos pH 6.7, 10 mM MgCl₂, HMG-CoA liasa, la reacción se inició mediante la adición del sustrato (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) en un volumen final de 100 µl. La suspensión se incubó a 37°C durante 5 minutos, la reacción se paró adicionando 3 µl de HCl al 25 %. La proteína desnaturalizada se precipitó mediante centrifugación, el sobrenadante fue colectado y neutralizado con 15 µl del amortiguador fosfatos de potasio 2 M pH 9.1. El pH final de la mezcla fue de 6.1. La muestra se analizó mediante HPLC ProStar (Varian Mod 240) con una columna Microsorb–MV 100-5 C-18, 150 X 4.6 (Varian) previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.7 durante 35 minutos.

6.5.9 DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO BIFUNCIONAL DE LiuE

6.5.9.1 Condiciones del crecimiento de las cepas *P. aeruginosa* PA01 y PAMliuE

Las cepas se crecieron en 200 ml de medio mínimo M9 con 0.02 % de peptona de caseína y 0.2 % de glucosa durante un periodo de 24 h a 30 °C con agitación constante a 175 rpm a este punto de crecimiento se adicionó citranelol al 0.075 %, el cultivo se incubó por un periodo de 24 h a 30 °C con agitación constante. Las células se cosecharon a 4 °C y la pastilla celular se lavó dos veces con una solución amortiguadora de equilibrio 1X pH 8.0. Las células se resuspendieron en 0.5 ml de la solución amortiguadora mencionada anteriormente y a la suspensión bacteriana se le adicionó PMSF a una concentración final 1 mM. La suspensión se lisó mediante sonicación y centrifugada a 13,000 rpm durante 20 min, la fracción soluble se separó y centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. El extracto crudo obtenido se empleó para realizar la determinación de la actividad de la HMG-CoA liasa en el catabolismo de los terpenos acíclicos.

6.5.9.2 Purificación de las proteínas AtuF, AtuC, AtuE, LiuE

La purificación de las enzimas implicadas en la vía catabólica de los terpenos acíclicos se realizó como se describe en el apartado 6.6.4.

6.5.9.3 Renaturalización de las proteínas AtuF, AtuC, AtuE, LiuE

La renaturalización de AtuE y LiuE procedió como se describe en el apartado 6.6.5. El proceso de renaturalización de la Geranyl-CoA carboxilasa (AtuC-AtuF) se realizó de la siguiendo el método reportado por Aguilar *et al.*, 2008 ^[2].

Una vez purificadas las subunidades de la Geranyl-CoA carboxilasa (AtuC y AtuF) se mezclaron en una relación 1:1, y se les adicionó urea 7 M hasta alcanzar un volumen de 5 ml, se dejaron desnaturalizando un periodo de 10 horas, cumplido este periodo se sometió a diálisis con el amortiguador de renaturalización cuya composición es la siguiente: 20 mM K₂HPO₄, 0.75 mM DTT y glicerol al 20 % pH 8.0. Para la diálisis se empleó una membrana de celulosa con un tamaño de 12.4 kDa MWCO (SIGMA-ALDRICH), se hizo recambio del amortiguador de renaturalización a las tres horas. Cumplido este tiempo se concentró la proteína en un dispositivo Amicon Ultra-4 con un filtro de 30 kDa MWCO (Milipore). La disolución se centrifugó dos veces 5 minutos a 5,000 rpm a 4°C, la actividad se midió como se describe más adelante. Finalmente la concentración de la proteína se determinó mediante el método de Bradford (Sambrook *et al.*, 1989 ^[41]).

6.5.9.4 Reconstrucción de la vía catabólica de los terpenos acíclicos empleando extractos celulares de *P. aeruginosa* PAO1 o PAMliuE y HMG-CoA liasa purificada y renaturalizada

La evaluación del papel de la actividad de la HMG-CoA liasa en el catabolismo de los terpenos acíclicos se llevó a cabo mediante el método descrito por Aguilar *et al.*, 2008 con ligeras variaciones ^[2]. La mezcla de reacción control contiene 5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 100 mM amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.6, extracto crudo de PAO1 o extracto crudo de PAMliuE, en un volumen final de 100 µl. La reacción se inició con la adición de 10 µl de *cis*-Geranyl-CoA 10 mM (sintetizado como describe Aguilar *et al.*, 2008), se incubó durante 15 ó 30 min a 37 °C. La reacción se paró mediante la adición de 10 µl de HCl 25 %, la mezcla se centrifugó a 13,000rpm durante 5 min, la fracción soluble se separó y analizó mediante HPLC ProStar (Varian Mod 240) con una columna Microsorb–MV 100-5 C-18, 150 X 4.6 (Varian) previamente equilibrada con buffer de fosfatos 50 mM

pH 6.7 durante 30 minutos. Para determinar el papel de la HMG-CoA liasa, ésta se adicionó a la mezcla de reacción a una concentración de 0.01 µg/µl en las mismas condiciones de la reacción control.

6.5.9.5 Determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA (HIHG-CoA) liasa de LiuE

Para determinar la bifuncionalidad de LiuE se emplearon reacciones enzimáticas acopladas con Geranil-CoA carboxilasa (AtuC-AtuF), y isohexenilglutaril-CoA hidratasa (AtuE) purificadas y renaturalizadas, empleando como sustrato el *cis*-Geranil-CoA.

La primera mezcla de reacción control contiene 5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 100 mM amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.6, en un volumen final de 100 µl, a la segunda mezcla de reacción control se le adicionaron 30 µg de la Geranil-CoA carboxilasa, 30 µg de la isohexenilglutaril-CoA hidratasa, y para determinar la actividad de HIHG-CoA liasa de LiuE, esta se adicionó a la mezcla en una concentración final de 0.01 µg; las reacciones se iniciaron con la adición de 10 µl de *cis*-Geranil-CoA 10 mM, se incubaron durante 20 min a 37 °C.

Las reacciones se pararon mediante la adición de 5 µl de HCl 25 %, la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, la fracción soluble se separó y analizó mediante HPLC ProStar (Varian Mod 240) con una columna Microsorb–MV 100-5 C-18, 150 X 4.6 (Varian) previamente equilibrada con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.7 durante 30 minutos.

VII RESULTADOS

7.1 AMPLIFICACIÓN DEL ORF PA2011 DE *P. aeruginosa* PAO1

Con la finalidad de realizar la caracterización bioquímica de la probable HMG-CoA liasa codificada en el ORF PA2011 de *P. aeruginosa* fue necesario obtener una proteína recombinante en la cepa de *E. coli* JM101. Para llevar a cabo este objetivo se realizó la amplificación del gen *liuE* de *P. aeruginosa* partiendo del ADN cosmídico pMO013850 (Figura 7), mediante PCR. De acuerdo a la secuencia nucleotídica reportada en <http://www.pseudomonas.com>, se diseñaron oligonucleótidos específicos delimitando al ORF PA2011 en un fragmento de 0.9 kb.

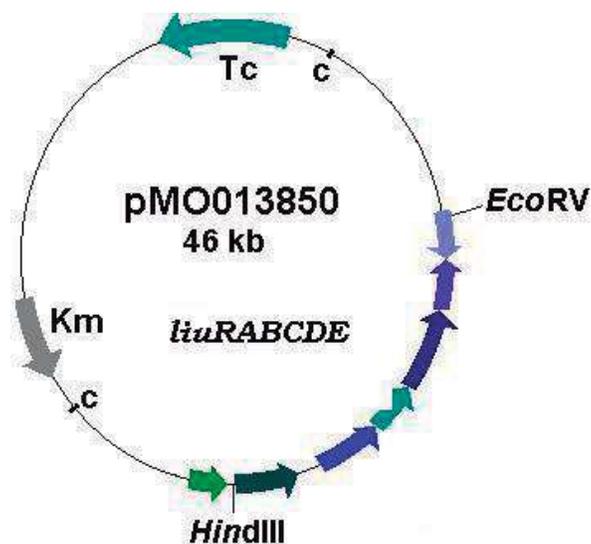


Fig. 7 Mapa del cósmido pMO013850, empleado para amplificar el ORF PA2011 de *P. aeruginosa*. Contiene clonado un fragmento de aproximadamente 20 kb correspondiente al operón *liuRABCDE* flanqueado por los sitios de restricción *EcoRV* y *HindIII*. Tc, gen de resistencia a Tetraciclina; Km gen de resistencia a Kanamicina; c, sitios cos.

Se comprobó electroforéticamente la amplificación del ORF PA2011 el cual correspondió al tamaño esperado (0.9 kb) (Figura 8).

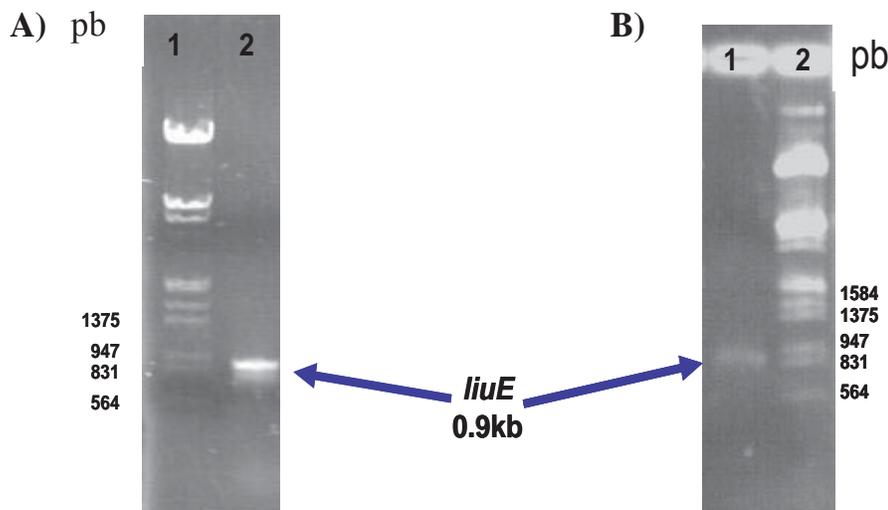


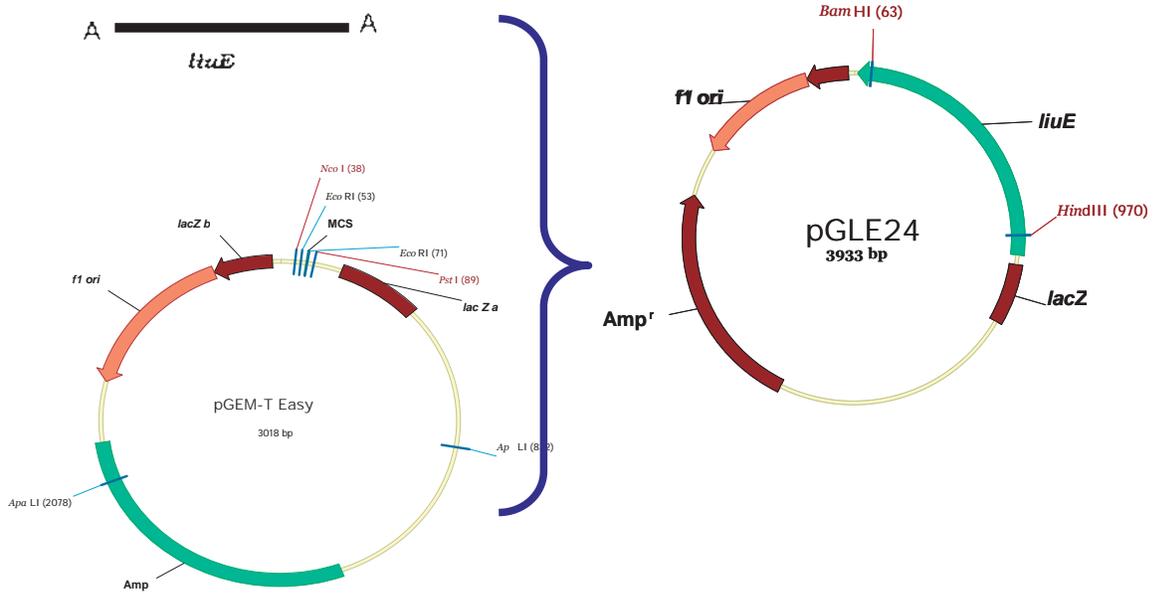
Fig. 8 Amplificación y purificación del ORF PA2011 de *P. aeruginosa* PAO1. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa del fragmento amplificado con los oligonucleótidos LIB y L2H. A) Carril No. 1, marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (*HindIII/EcoRI*); Carril No. 2, fragmento amplificado a partir del cósmido pMO013850, B) Carril No. 1, fragmento purificado de *liuE*, Carril No. 2, marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (*HindIII/EcoRI*).

7.2 CLONACIÓN DEL ORF PA2011 DE *P. aeruginosa* PAO1

El producto amplificado mediante PCR de 0.9 kb correspondiente al ORF PA2011 se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy diseñado para clonar productos de PCR (Promega). Células competentes de *E. coli* JM101 se transformaron con la mezcla de ligación pGEM-T Easy-PA2011 en las condiciones descritas en materiales y métodos. Las clonas transformadas se seleccionaron mediante complementación alfa. Una vez obtenidas estas clonas se les realizó aislamiento de ADN plasmídico y mediante un análisis de digestión enzimática empleando las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III se comprobó la presencia de la construcción mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa observándose los fragmentos de 3 y 0.9 kb correspondientes al vector pGEM[®]-T Easy y al gen *liuE* respectivamente. A este plásmido recombinante se le denominó pGLE24 (Figura 9).

CARACTERIZACIÓN DE *liuE* DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

A)



B)

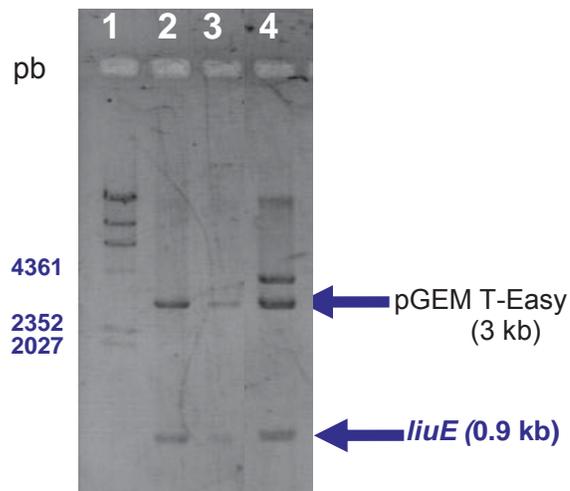


Fig. 9 Construcción y análisis de restricción del plásmido pGLE24. A) Estrategia de clonación del fragmento amplificado del ORF PA2011. LA región PA2011 amplificada mediante PCR adenilada en sus extremos 5' se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy que posee timinas en sus extremos. B) Fotografía del gel de agarosa mostrando el corrimiento electroforético del marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (*Hind*III) (carril 1), restricción del pGLE24 con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III (carril 2,3) y restricción parcial del vector pGLE24 (carril 4).

7.3 SUBCLONACIÓN DEL ORF PA2011 DE *P. aeruginosa* PAO1

Con el propósito de obtener la proteína expresada para llevar a cabo la purificación de la HMG-CoA liasa y su posterior caracterización bioquímica, se procedió a subclonar el ORF PA2011 de *P. aeruginosa* en el vector de expresión para proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* el pTrcHis2A. Para cumplir este objetivo el plásmido pGLE24 se digirió con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III para liberar el fragmento de 0.9kb que fue purificado y posteriormente ligado en el vector pTrcHis2A se linearizó con la endonucleasa *Eco*RI para obtener los extremos complementarios (Figura 10). La mezcla de ligación se empleó para transformar células competentes de *E. coli* JM101 y las clonas transformadas se seleccionaron mediante un marcador de selección (resistencia a ampicilina 100 µg/ ml), de estas se obtuvo el ADN plasmídico, el cual se sometió a un análisis de restricción con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III generando los fragmentos de 4.4 y 0.9 kb correspondientes al vector pTrcHis2A y a *liuE* respectivamente (Figura 11). El plásmido obtenido de la mezcla de ligación se nombró pTLE2011.

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

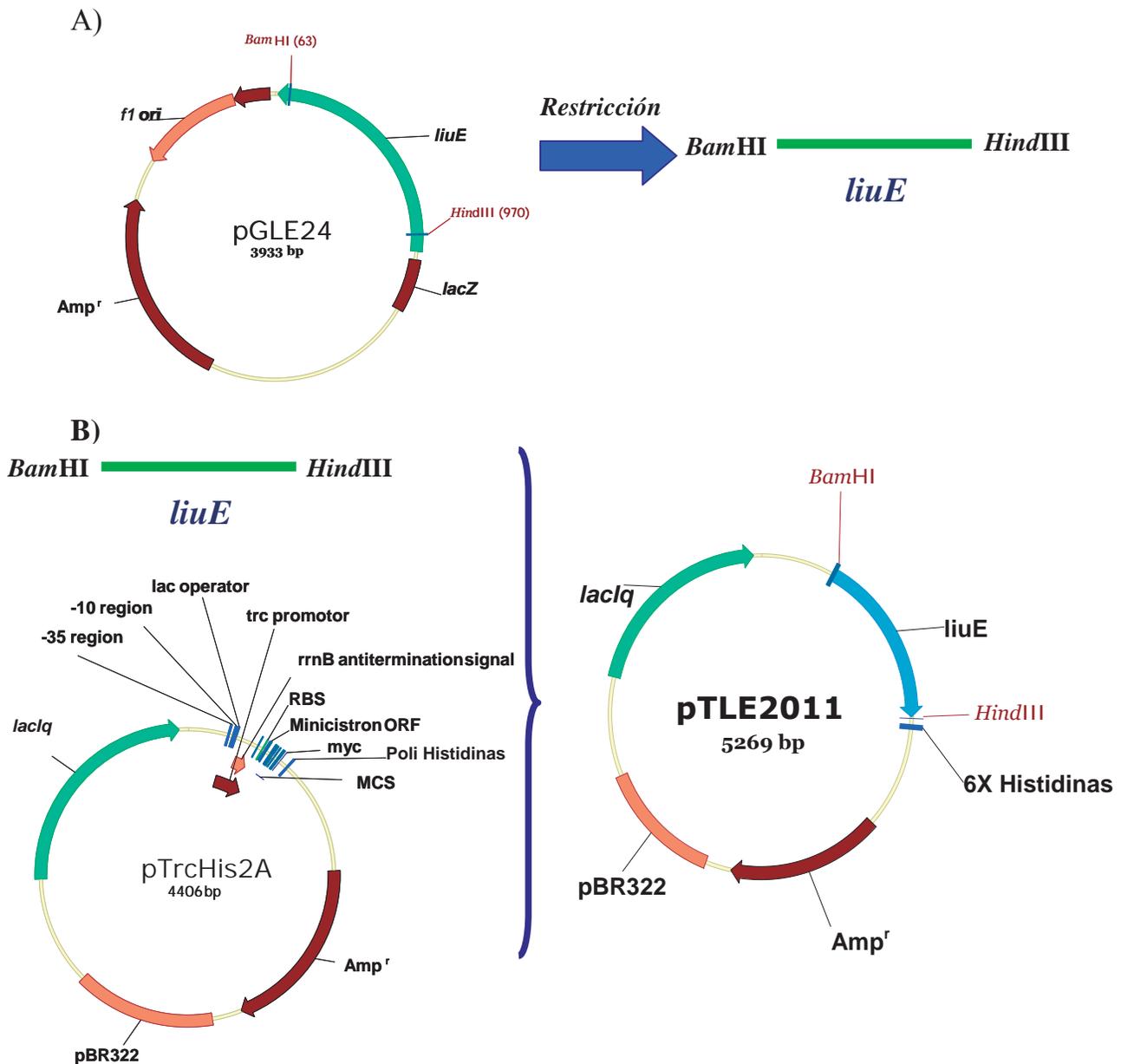


Fig. 10 Estrategia de subclonación del ORF PA2011 de *P. aeruginosa* PAO1 en el vector de expresión de proteínas recombinantes pTrcHis2A. A) El plásmido pGLE24 se digirió con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III para liberar el fragmento de 0.9 kb (ORF PA2011). B) El fragmento liberado se ligó al vector pTrcHis2A linealizado con *Eco*RI. El plásmido generado se nombró pTLE2011.

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

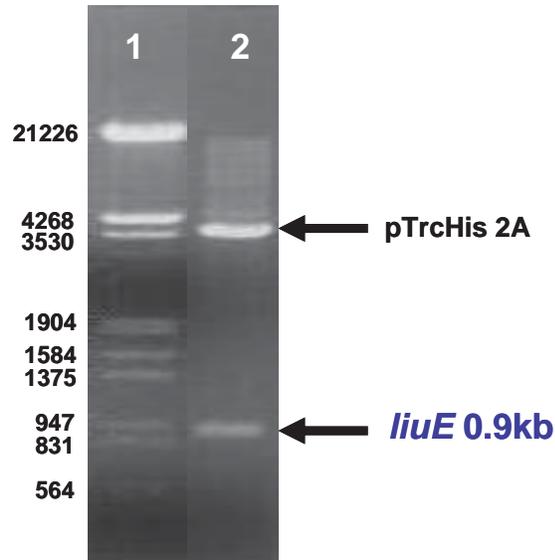


Fig. 11 Análisis de restricción del plásmido pTLE2011. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa. Carril No. 1 marcador de tamaño molecular ADN del fago λ (*Hind*III)-*Eco*RI; carril No. 2 doble digestión del pTLE2011.

7.4 MONITOREO DEL TIEMPO DE INDUCCIÓN DE LiuE

Con la finalidad de determinar el tiempo al cual la expresión de LiuE es la máxima se montó una prueba piloto en la que se monitoreó la expresión cada 4 horas, dando como resultado una mayor expresión en un periodo comprendido entre las 20 y 24 h post-inducción (Figura 12).

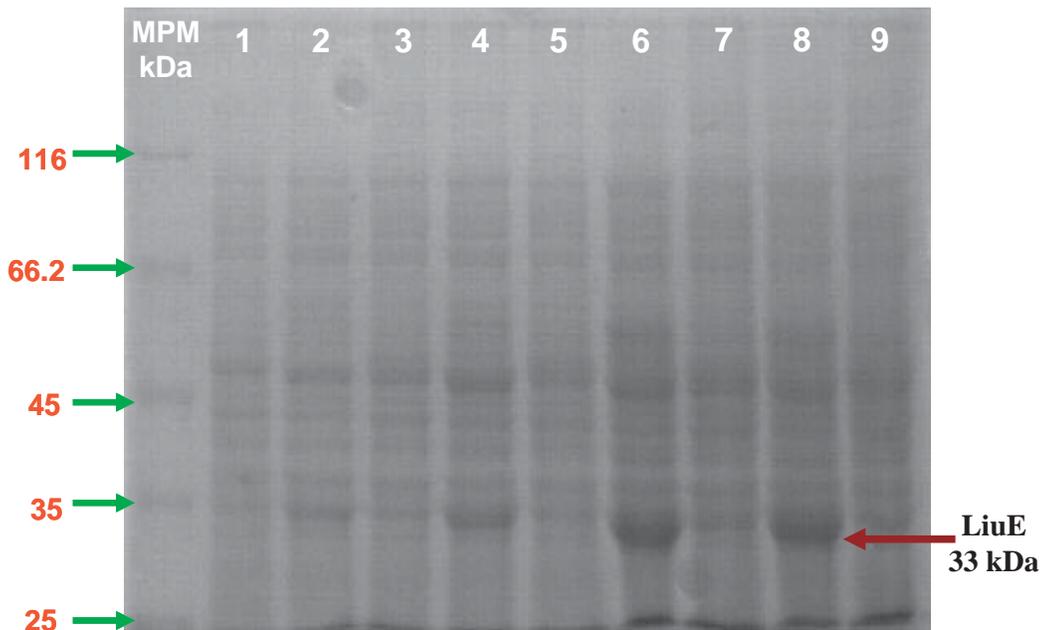


Fig. 12 Monitoreo de la inducción de LiuE. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), MPM marcador de peso molecular (BioRad), carril 1 extractos celulares de la

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

cepa *E. coli* pTLE2011b previo a la inducción, carriles 2, 4, 6, y 8 extractos celulares de la cepa pTLE2011b post-inducción; carriles 3, 5, 7 y 9 extractos celulares de la cepa pTLE2011b no inducida, a los tiempos 4, 8, 20 y 24 h, respectivamente.

7.5 PURIFICACIÓN DE LiuE

Con la finalidad de realizar la determinación de la actividad enzimática se procedió a realizar la purificación de la proteína mediante el empleo de la resina IMAC con centro de Co^{+2} como se describe en Materiales y Métodos. Se comprobó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) el grado de pureza de la proteína obtenida, mostrando un enriquecimiento de la banda de interés.

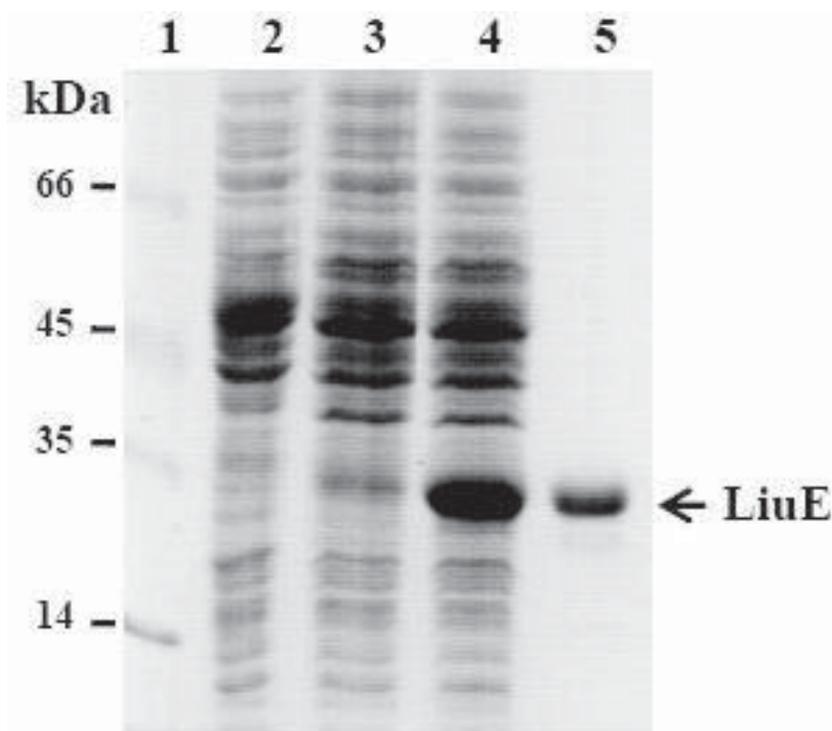


Fig. 13 Purificación de LiuE. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Carril 1 Marcador de peso molecular (Fermentas), carril 2 extractos celulares de la cepa *E. coli* JM101, carril 3 extractos celulares de la cepa *E. coli* pTLE2011b no inducida, carril 4 extractos celulares de la cepa *E. coli* pTLE2011b inducida, carriles 5 LiuE purificada 10 μg .

7.6 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HMG-CoA LIASA DE *P. aeruginosa*

7.6.1 ENSAYO ENZIMÁTICO ACOPLADO

Para poder determinar la actividad enzimática mediante un ensayo acoplado a HPLC, se montó el gradiente de elución reportado por Frieddman *et al.* 2006, con variaciones para determinar los tiempos de retención de los estándares del HMG-CoA y Acetil-CoA, así como una prueba de control negativo en la que se desnaturalizó previamente la enzima antes de adicionar el sustrato a 95 °C. La mezcla de reacción se analizó mediante HPLC como se describe en materiales y métodos, los tiempos de retención observados fueron de 13.9 min y 16.4 min para el HMG-CoA y el Acetil-CoA respectivamente (Figura 14).

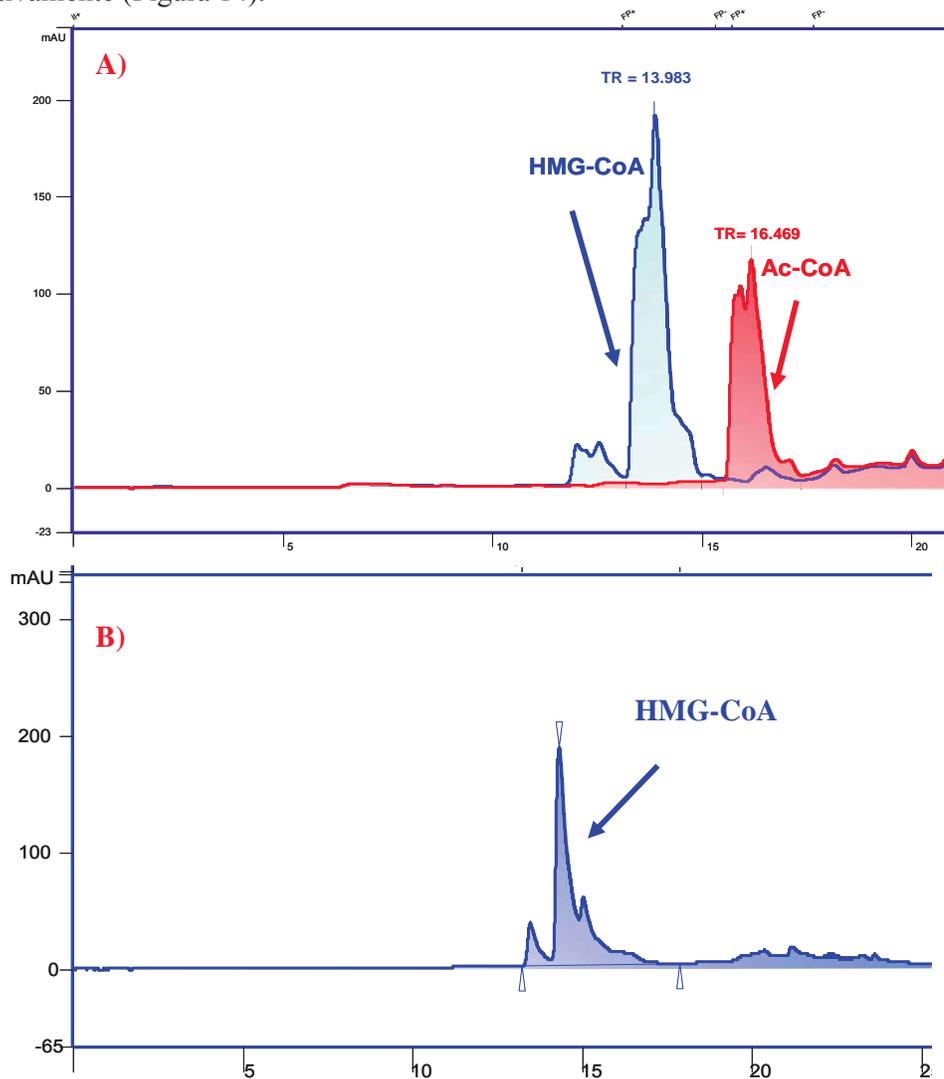


Fig. 14 A) Cromatograma de la determinación de los estándares de HMG-CoA y Acetil-CoA, se inyectaron en el HPLC concentraciones conocidas de los estándares y B) control negativo, se incubó LiuE previamente desnaturalizada por calor (95 °C), y la fracción soluble de la muestra se inyectó en el HPLC.

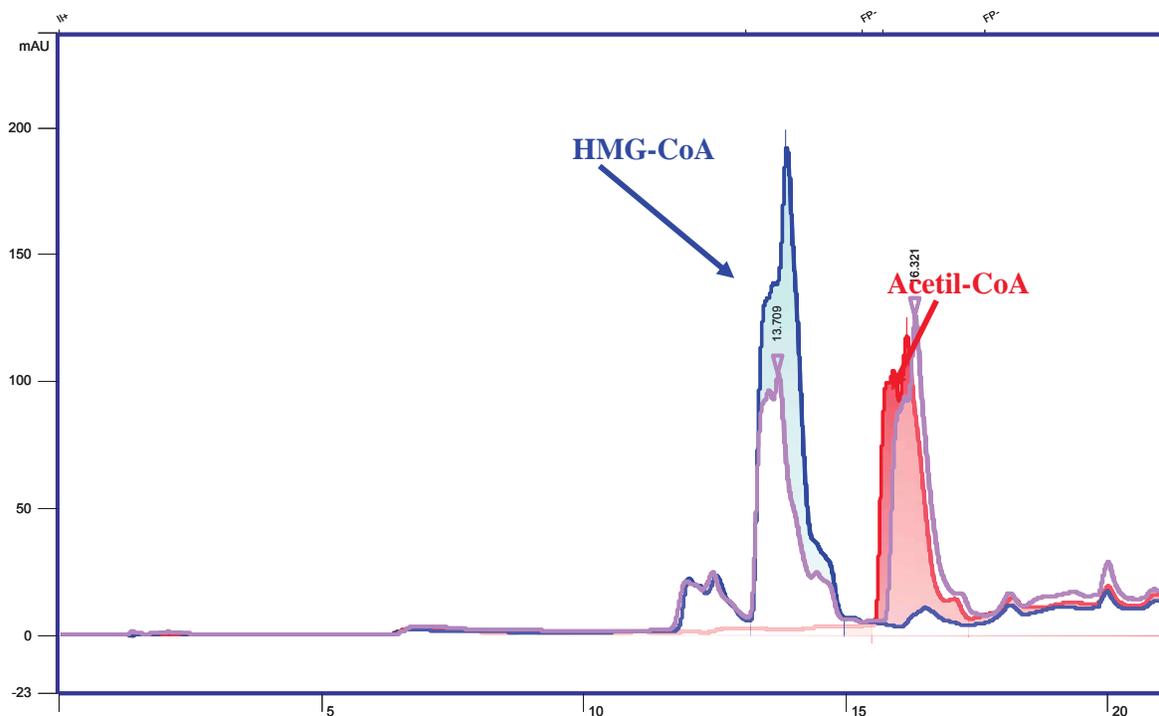


Fig.15 Determinación de la actividad de la HMG-CoA liasa. En el cromatograma se observa en color azul el estándar del HMG-CoA, en rojo el estándar del Acetil-CoA y en lila el análisis del producto de la reacción observándose un pico con un tiempo de retención de 13.7 min correspondiente al sustrato (HMG-CoA) y otro pico con un tiempo de retención de 16.3 min correspondiente al producto el Acetil-CoA.

El análisis de la reacción enzimática se observa en la figura 15, en la que se aprecia el consumo del HMG-CoA así como la aparición de uno de los productos de la reacción enzimática, el acetil-CoA (cromatograma de color morado), con tiempos de retención de 13.7 y 16.3 minutos, respectivamente. Asimismo, se observan los cromatogramas de los estándares del HMG-CoA (azul) y Acetil-CoA (rojo). Corroborando de esta manera la actividad enzimática.

7.6.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA LA CINÉTICA ENZIMÁTICA

7.6.2.1 Determinación del tiempo óptimo de reacción

La actividad de la HMG-CoA liasa fue ensayada en periodos de incubación de 5, 10 y 15 min. Donde el tiempo óptimo de reacción correspondió a los 5 min ya que la velocidad es proporcional al

tiempo (relación lineal). Por ello se eligió para la realización de las determinaciones enzimáticas un periodo de incubación de 5 min (Figura 16).

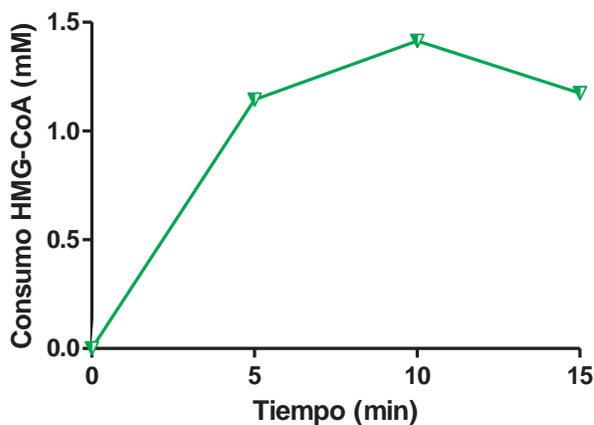


Fig. 16 Efecto del tiempo de reacción en la actividad relativa de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se incubaron las mezclas de reacción a diferentes periodos de tiempo, se analizaron las fracciones solubles de cada determinación y se analizaron mediante HPLC.

7.6.2.2 Determinación de la concentración óptima de proteína

Para establecer la concentración óptima de la proteína purificada de HMG-CoA liasa en el medio de reacción, las condiciones utilizadas fueron 0.157-10 μg de proteína. La concentración óptima de proteína fue 1 μg , ya que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de proteína (Figura 17). Por lo que las subsecuentes determinaciones fueron realizadas con esta concentración.

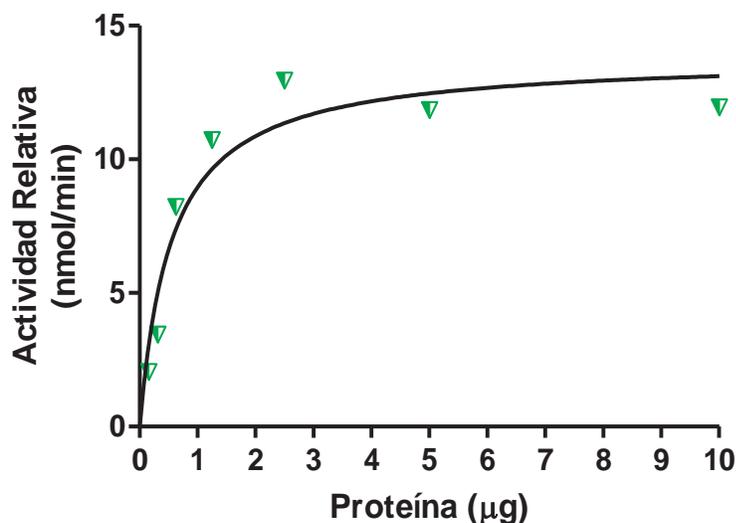


Fig. 17 Efecto de la concentración de la proteína sobre la actividad de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se incubaron las mezclas de reacción durante cinco minutos con diferentes concentraciones de proteína, se analizaron las fracciones solubles de cada determinación y se analizaron mediante HPLC.

7.6.2.3 Determinación de la temperatura óptima

La determinación de la temperatura óptima se realizó en un rango de 20-45 °C. La temperatura óptima encontrada fue 37 °C, ya que a esta temperatura la enzima desarrolló la actividad más elevada (Figura 18).

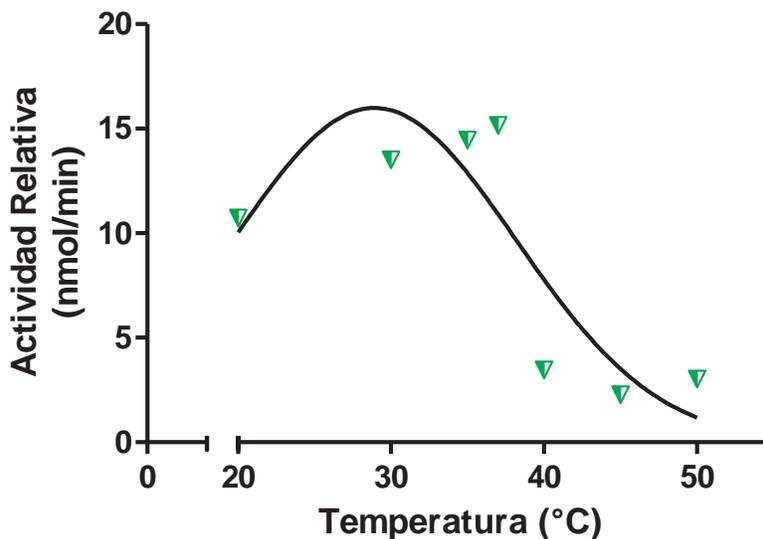


Fig. 18 Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se incubaron las mezclas de reacción a diferentes temperaturas con 1µg de proteína y se incubó durante cinco minutos, se analizaron las fracciones solubles de cada determinación y se analizaron mediante HPLC.

7.6.2.4 Determinación del pH óptimo

La determinación del pH óptimo se realizó en un rango de 6.0-8.0. El pH óptimo para el ensayo enzimático de la HMG-CoA liasa fue 7.0, empleando amortiguador de fosfatos 20 mM (Figura 19). En este análisis se observó que a pH's por debajo de 6.0 y por arriba de 8.0 la actividad enzimática es baja con respecto a la desarrollada con las condiciones óptimas.

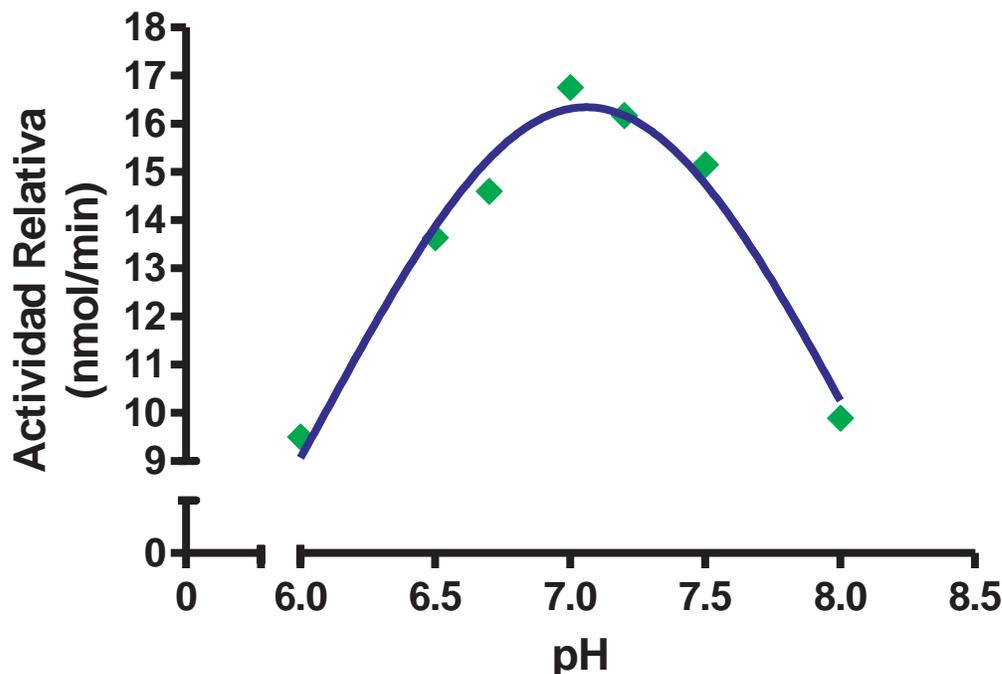


Fig. 19 Efecto del pH sobre la actividad de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se incubaron las mezclas de reacción a diferentes pH's con 1µg de proteína y se incubó durante cinco minutos a 37 °C, se analizaron las fracciones solubles de cada determinación y se analizaron mediante HPLC.

7.6.2.5 Efecto de cationes divalentes y de los agentes reductores sobre la actividad de la HMG-CoA liasa

Se ha reportado que la actividad de la HMG-CoA liasa homólogas es dependiente de un catión divalente, por lo que se emplearon al $MgCl_2$ o al $MnCl_2$ como posibles cofactores para saber si la de *P. aeruginosa* es una metaloenzima, observándose una actividad ligeramente mayor empleando al $MgCl_2$. Al utilizar $MnCl_2$ se observó un 18 % menos de actividad con respecto a la obtenida con $MgCl_2$, sin embargo, cuando a la mezcla de reacción no se le adicionó el catión divalente se observó la ausencia de actividad enzimática. Asimismo, al adicionar a la mezcla de reacción un agente quelante como el EDTA a concentraciones de 4 mM, 8 mM, la actividad enzimática se vió afectada drásticamente en un 68 % de la actividad alcanzada en la reacción control. Sin embargo, cuando se usó una concentración 40 mM de EDTA se apreció ausencia de la actividad enzimática (Figura 20). Por lo que se determinó que la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* es una metaloenzima.

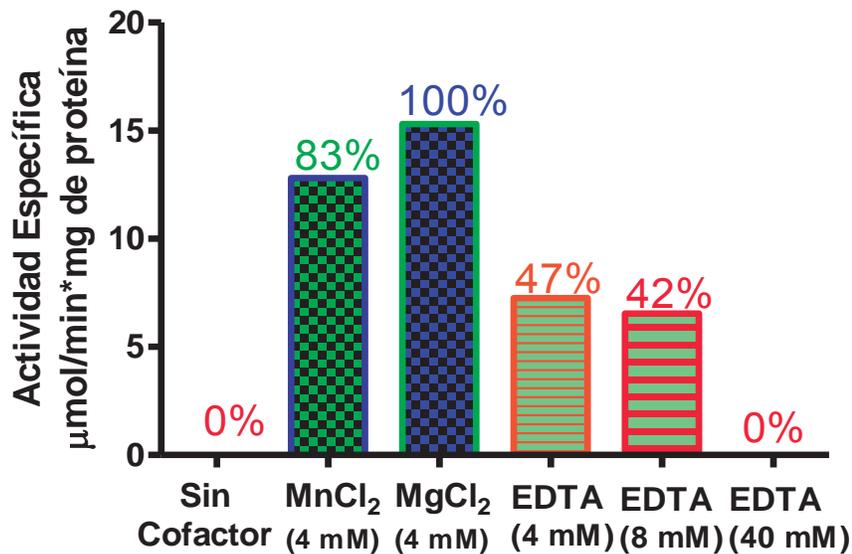


Fig. 20 Efecto de los cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. En la figura se observan las diferentes condiciones a las cuales fue sometida la determinación de la actividad enzimática. En presencia de MgCl₂ y MnCl₂ la actividad enzimática desarrolla una velocidad de 15.3 y 12.8 μmol/min*mg de proteína respectivamente, al adicionar un agente quelante se observa una disminución de la actividad enzimática y en ausencia de cofactor no se observa actividad enzimática.

Al someter a la reacción a un agente tiol exógeno como el ditioneitol (DTT), no se observó un efecto sobre la actividad de la HMG-CoA liasa (datos no mostrados), por lo que la enzima no es sensible a regulación por agentes reductores.

7.6.3 EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD

La determinación del efecto de la variación en la concentración del sustrato HMG-CoA se realizó en el rango de 0.125-5 mM con el propósito de determinar el comportamiento enzimático, el cual resultó ser no Michaeliano como se puede observar en las figuras 21 y 22.

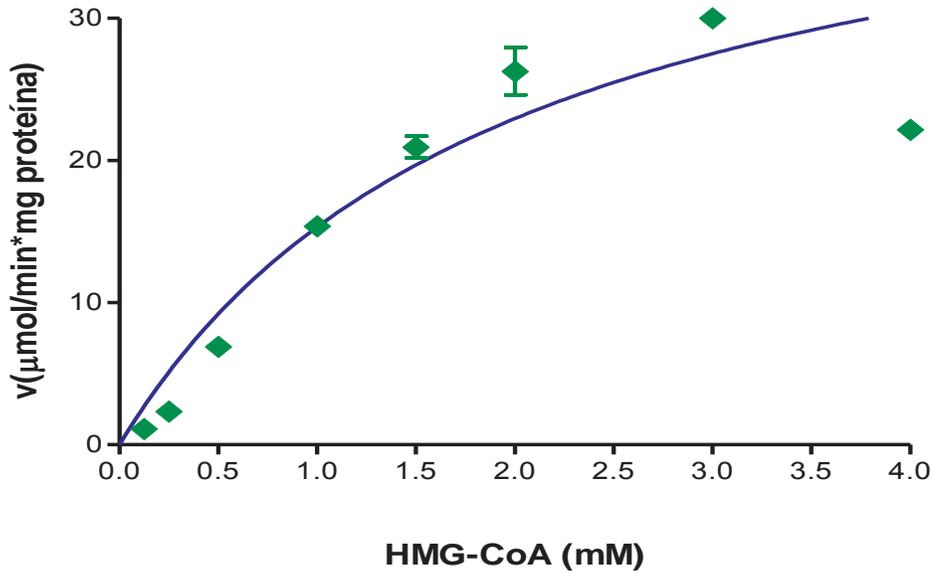


Fig. 21 Determinación del efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se incubaron las mezclas de reacción a diferentes concentraciones del HMG-CoA con 1 μg de proteína y se incubó durante cinco minutos a 37 °C a pH 7.0, se analizaron las fracciones solubles de cada determinación y se analizaron mediante HPLC. Los datos observados presentaron un coeficiente de correlación con la ecuación de Michaelis-Menten (R^2 0.9. n=3.

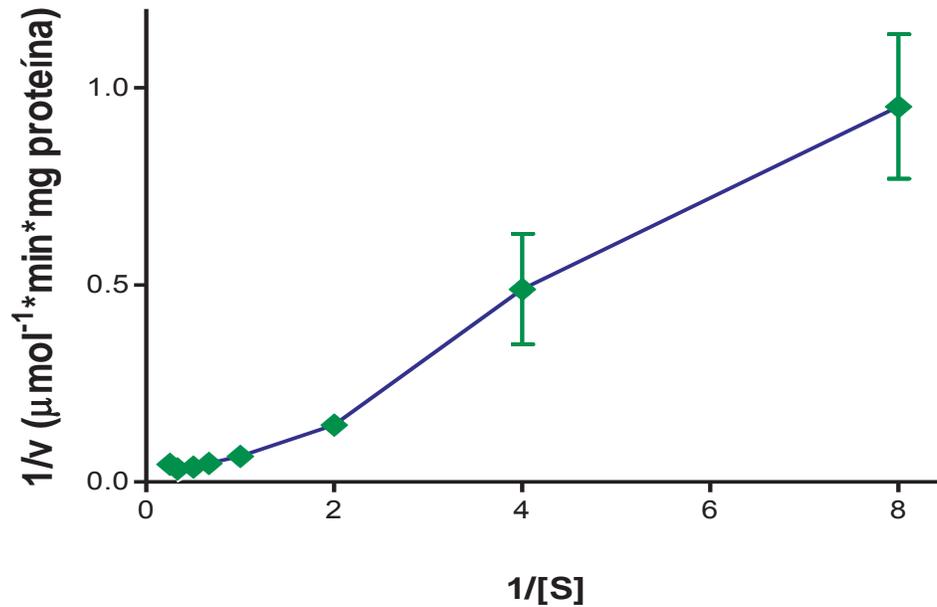


Fig. 22 Análisis de Lineweaver-Burk del efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se incubaron las mezclas de reacción a diferentes concentraciones del HMG-CoA con 1 μg de proteína y se incubó durante cinco minutos a 37 °C a pH 7.0, se analizaron las fracciones solubles de cada determinación y se analizaron mediante HPLC. Los datos observados presentaron un coeficiente de correlación con la ecuación de Michaelis-Menten (R^2 0.86. n=3.

Como se observa en la figura 22, al realizar el análisis de Lineweaver-Burk se aprecia una curvatura en el trazo de la recta, a concentraciones elevadas del sustrato, sugiriendo que el comportamiento enzimático es no Michaeliano debido a que estos puntos se desvían de la linealidad, formando una hipérbola, mostrando un coeficiente de correlación lineal de 0.86.

7.6.3.1 Análisis de Hill

Debido a que el comportamiento de la enzima no se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten ($R^2=0.9$) y por ende a la de Lineweaver-Burk ($R^2=0.86$), se empleó otro modelo matemático que explicará el comportamiento enzimático por lo cual se realizó el análisis de Hill con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos V_{max} y K_m aparente.

En la figura 23, se observa un trazo sigmoide característico de una enzima alostérica, que correlaciona con el modelo matemático de Hill presentando un coeficiente de correlación de $R^2=0.958$. Con la cual se puede determinar el número de sitios activos (número de Hill), los cuales son determinados por el punto de inflexión de la curva. Los datos de los parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Hill sugieren que la enzima es al menos un homodímero debido a que la n calculada fue de 2.37, una V_{max} de $26.26 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, y posee una constante de afinidad aparente $K_{0.5}=0.79 \text{ mM}$.

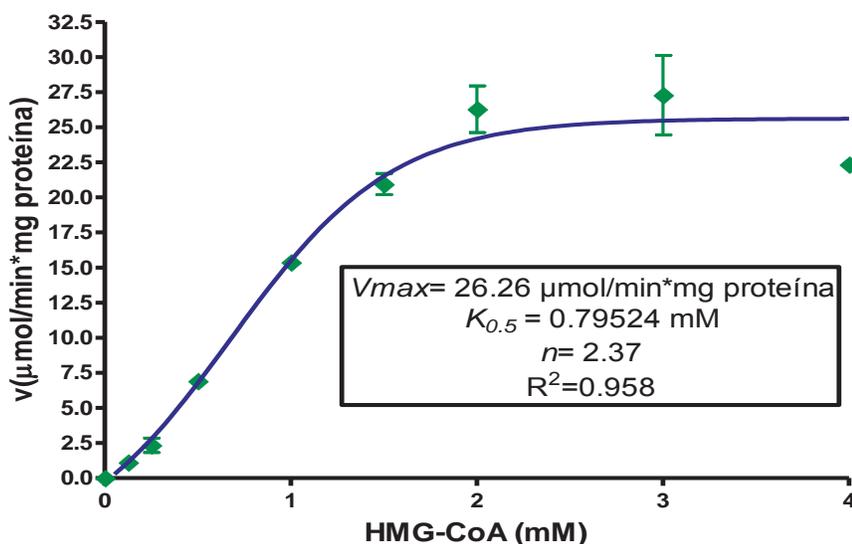


Fig. 23 Análisis de los datos cinéticos de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* con el modelo de Hill. En el gráfico se puede observar un trazo sigmoide característico de una cinética alostérica cooperativa.

Como parte del refinamiento de los parámetros cinéticos obtenidos mediante el análisis de Hill se procedió a realizar la determinación de la constante aparente ($K_{0.5}$), para lo cual se realizó el análisis de Lineweaver-Burk para enzimas alostéricas, en este análisis primero se eleva a la n (número de sitios activos) las concentraciones del sustrato. Se obtuvo un valor de 0.74 mM para la $K_{0.5}$ y una V_{max} de 27.32 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína (Figura 24), la $K_{0.5}$ se empleó posteriormente para la determinación del número de subunidades que conforman a la enzima activa, bajo este modelo se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de $R^2= 0.9796$, lo que nos confirma que la enzima posee un comportamiento alostérico.

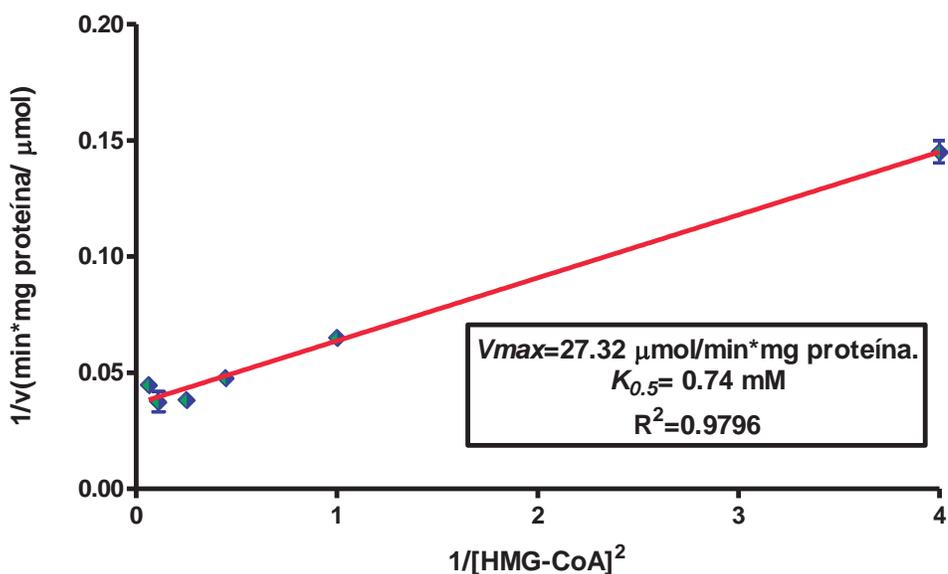


Fig. 24 Análisis de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* mediante el modelo de Lineweaver-Burk para enzimas alostéricas. En este modelo matemático indirectamente se determina el número de subunidades que posee la holoenzima, si se mejora el grado de correlación con el modelo matemático se infieren el número de subunidades de la misma.

7.6.3.1.1 Análisis de Hill en su forma logarítmica para la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*

Con datos experimentales, el gráfico de Hill usualmente deriva de la linearidad a velocidades específicas bajas, en donde los complejos contienen menos moléculas de sustrato que el número de subunidades contribuyendo significativamente a la velocidad inicial. La pendiente limitante a bajas concentraciones es 1.0. Sin embargo, si la enzima contiene sitios regulatorios no catalíticos los cuales deben de ser ocupados antes de que el sustrato pueda unirse al sitio catalítico, la pendiente del gráfico de Hill podría incrementarse conforme la concentración del sustrato disminuye. *A concentraciones muy bajas de sustrato, la pendiente podría aproximarse al número de sitios que deben de ser ocupados antes de que cualquier reacción ocurra.* Derivaciones de la linearidad a alas

concentraciones de sustrato también son comunes, principalmente debido a la dificultad en la detección de cambios pequeños en la velocidad conforme la concentración del sustrato va incrementado, pero también si los sitios catalíticos de diferentes afinidades contribuyen a la velocidad observada (Figura 25) [45]. El número de subunidades que integran a la holoenzima fué de 2.15.

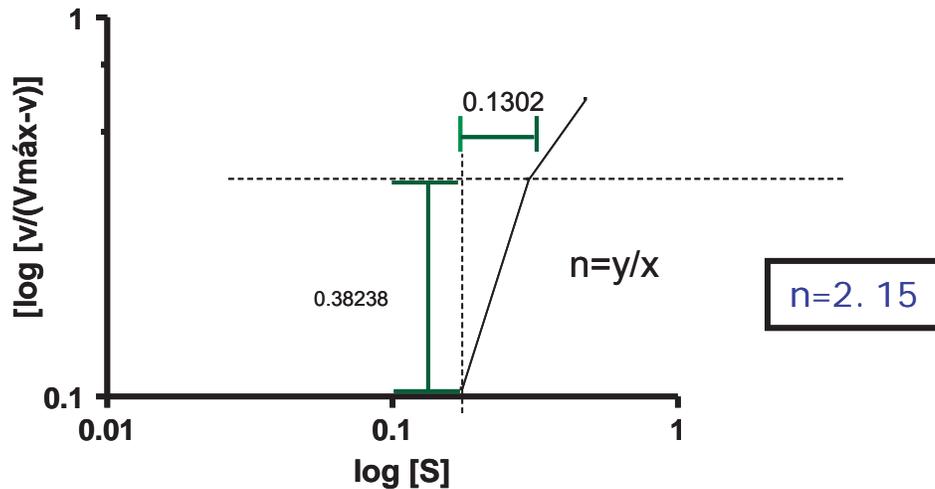


Fig. 25 Análisis de Hill en su forma logarítmica (determinación del número de subunidades) para la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se graficó el logaritmo de base diez de la concentración del sustrato en el eje de las abscisas contra el logaritmo de base diez del cociente de la velocidad sobre la diferencia de la velocidad máxima menos la velocidad inicial en el eje de las ordenadas, para cada uno de los puntos de determinación de la actividad enzimática.

7.7 RENATURALIZACIÓN DE LiuE

Con la finalidad de determinar de manera experimental el estado de oligomerización obtenido con el protocolo de renaturalización descrito en Materiales y Métodos, y para corroborar la información obtenida de los modelos matemáticos se empleó la herramienta del Blue Native PAGE (BN-PAGE) para determinar la estructura cuaternaria de la enzima purificada y renaturalizada (Figura 26).

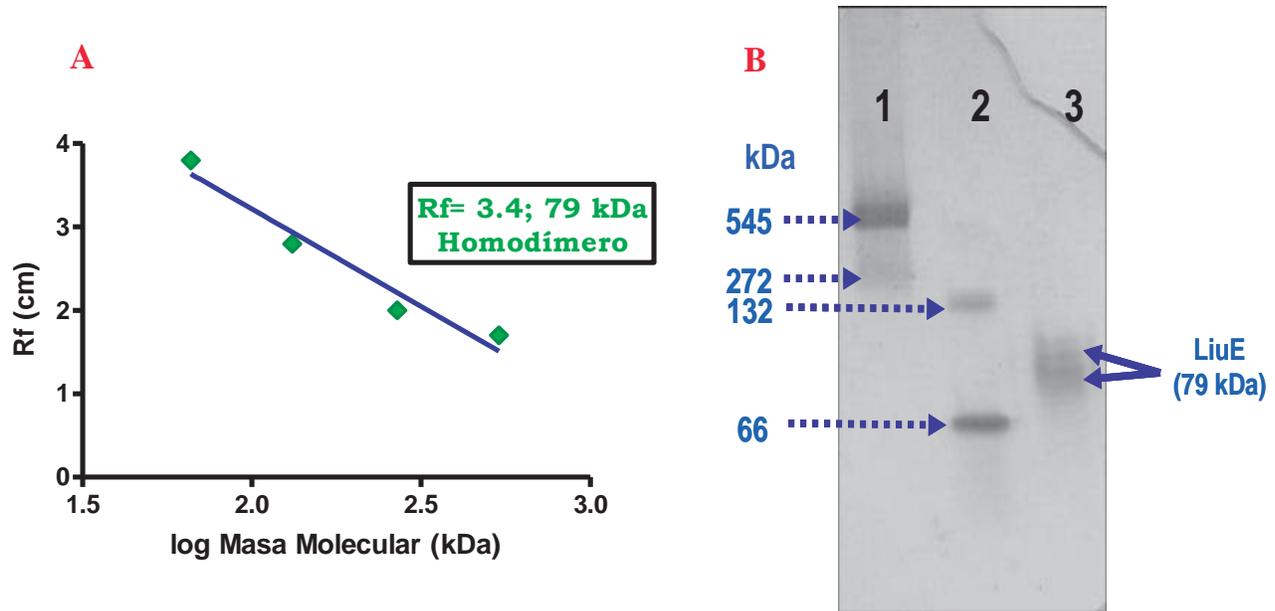


Fig. 26 Panel A: Curva de calibración de la masa molecular. La distancia de migración de las bandas de las proteínas relativas al frente de corrida (Rf) fueron graficadas contra el log de las masas moleculares de las mismas $R^2=0.953$. Panel B: fotografía del corrimiento electroforético de un gel BN-PAGE. Carril 1 Marcador de estado de oligomerización, Urea de Jack Bean (trímero 272 kDa, hexámero 545 kDa), carril 2 Albúmina Sérica Bovina (monómero 66 kDa, dímero 132 kDa), carril 3 LiuE (79 kDa).

Una curva de calibración de peso molecular para un gel BN-PAGE del 4-20 % fue deducida de las distancias de migración y los pesos moleculares conocidos de las proteínas empleadas como marcadores de estado de oligomerización. En la Figura 26 panel A se observa claramente que casi todos los polipéptidos empleados tienen una relación logarítmica-lineal entre el peso molecular y la movilidad electroforética, y por lo tanto todas las proteínas son adecuadamente separadas en base al peso molecular. En la Figura 26 panel B se determinó una masa molecular relativa de 79 kDa para LiuE, aunque este resultado no corresponde con precisión a la masa molecular calculada para la conformación homodimérica (79 kDa vs 70 kDa) este dato experimental sugiere que la enzima existe como un dímero. Sin embargo, en el carril 3 se observó un corrimiento difuso de la proteína, se desarrolló un patrón de bandeado que posiblemente sea debido a la presencia de isoenzimas de la proteína con una conformación distinta o con modificaciones en su estructura.

7.8 DETERMINACIÓN DEL pI de LiuE MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Con el objetivo de determinar si el corrimiento electroforético difuso observado en el BN-PAGE fue debido a la presencia de isoformas de la enzima o modificaciones en su estructura se realizó electroforesis bidimensional. Con la finalidad de determinar el pI de las isoformas de la HMG-CoA liasa observadas en el análisis bidimensional, se realizó una curva de calibración del pI con los marcadores empleados (Figura 28), en el cual se observa que existe una relación lineal entre el pI de las proteínas y la movilidad electroforética (Rf).

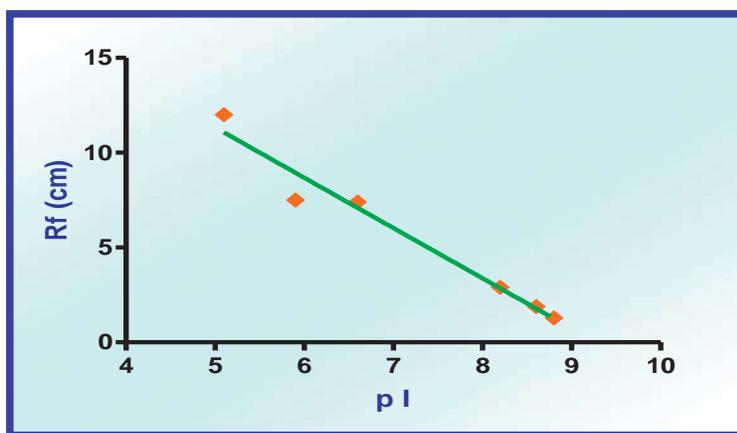


Fig. 27 Curva de calibración para la determinación del pI. Se graficó el pI de los marcadores estándar contra el corrimiento electroforético (cm). Los estándares empleados para la determinación fueron la β -lactoglobulina A (pI=6.1) anhidrasa carbónica II y I (pI= 5.9 y 6.6, respectivamente) y la lectina (la cual posee tres isoenzimas con pI=8.2, 8.6 y 8.8, respectivamente) $R^2=0.956$.

En el análisis bidimensional de la enzima HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1 se observó que esta posee al menos cinco isoenzimas con puntos isoeléctricos de 5.9, 6.2, 6.5, 6.8 y 7.0 respectivamente. Una de las manchas corresponde al pI teórico de la proteína recombinante, el cual es de 5.9 (Figura 28). Con esto se comprueba que el corrimiento difuso de la proteína en condiciones nativas se debe a modificaciones químicas o post-traduccionales en su estructura, originándose isoenzimas.

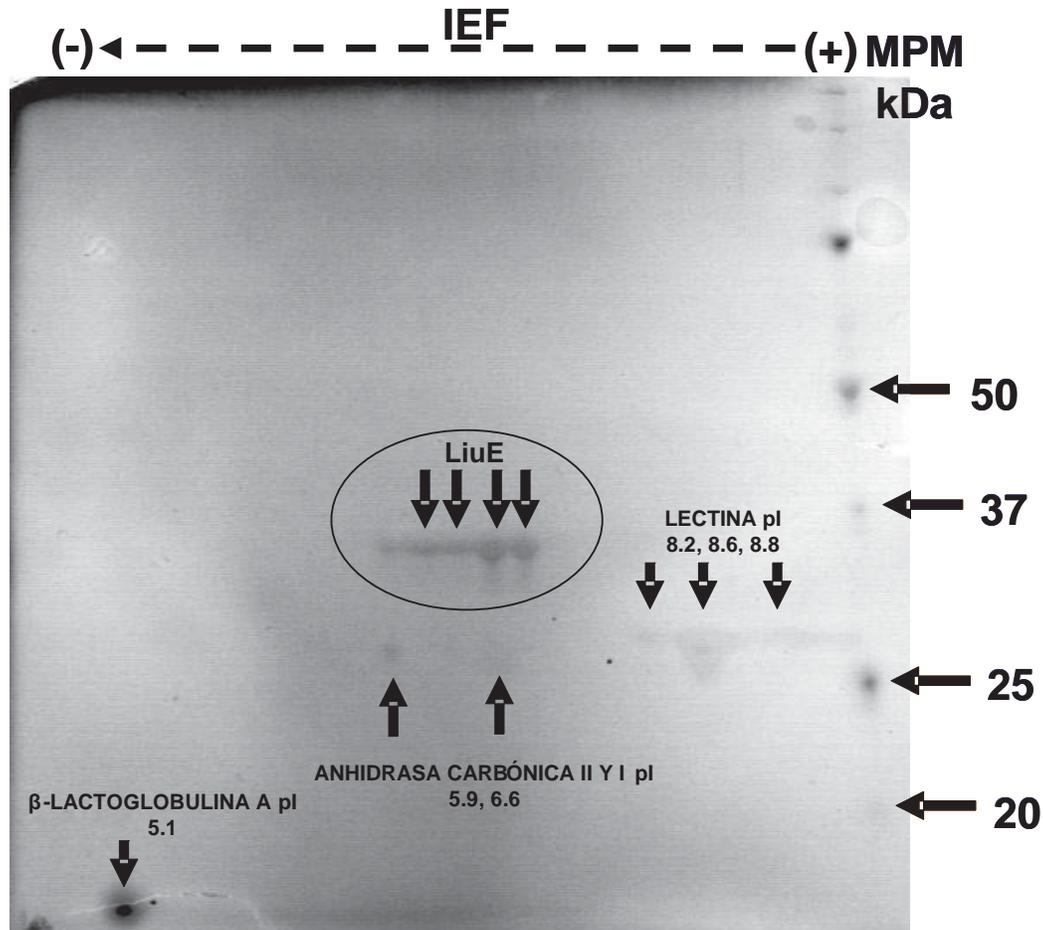


Fig. 28 Determinación del punto isoeléctrico de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* (LiuE). Fotografía de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12 %. Se observan los marcadores de pI, β-lactoglobulina A (pI=6.1), anhidrasa carbónica II y I (pI= 5.9 y 6.6, respectivamente) y la lectina (la cual posee tres isoenzimas con pI=8.2, 8.6 y 8.8, respectivamente). La enzima HMG-CoA liasa (LiuE) se indica en un óvalo. La flecha punteada indica la dirección en la cual fue sometido el IEF. MPM, marcador de peso molecular.

7.9 EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA HMG-CoA LIASA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Debido a que se observó disminución de la actividad enzimática de la HMG-CoA liasa en la determinación del comportamiento enzimático, al usar concentraciones elevadas del sustrato (4 mM de HMG-CoA) y observando un comportamiento enzimático del tipo alostérico, se procedió a determinar si el efecto de inhibición encontrado fue causado por inhibición por producto. Se determinó el efecto de los productos de la reacción enzimática, acetyl-CoA y acetoacetato. Las concentraciones probadas

fueron 1, 5 y 7.5 mM de acetyl-CoA y 1 y 10 mM de acetoacetato. Se realizaron pruebas de inhibición de la enzima a diferentes concentraciones tanto del sustrato como del inhibidor. Se encontró que el acetoacetato a una concentración de 10 mM causó una inhibición de la actividad enzimática menor al 2 % con respecto al control. Mientras que el acetyl-CoA mostró un efecto bifásico sobre la actividad enzimática, es decir, a bajas concentraciones se incrementó la actividad enzimática comportándose como un agente activador y a elevadas concentraciones de acetyl-CoA disminuye la actividad enzimática actuando como un agente inhibidor, mostrando una inhibición de hasta el 100 % como se observa en la fig. 29. Se realizó el análisis del efecto inhibitorio del acetyl-CoA empleando el modelo matemático de Lineweaver-Burk para enzimas alostéricas (Figura 30) donde se observa que la tendencia de las rectas es interceptarse en el eje de las “X” tipo de intercepto típico para un inhibidor competitivo.

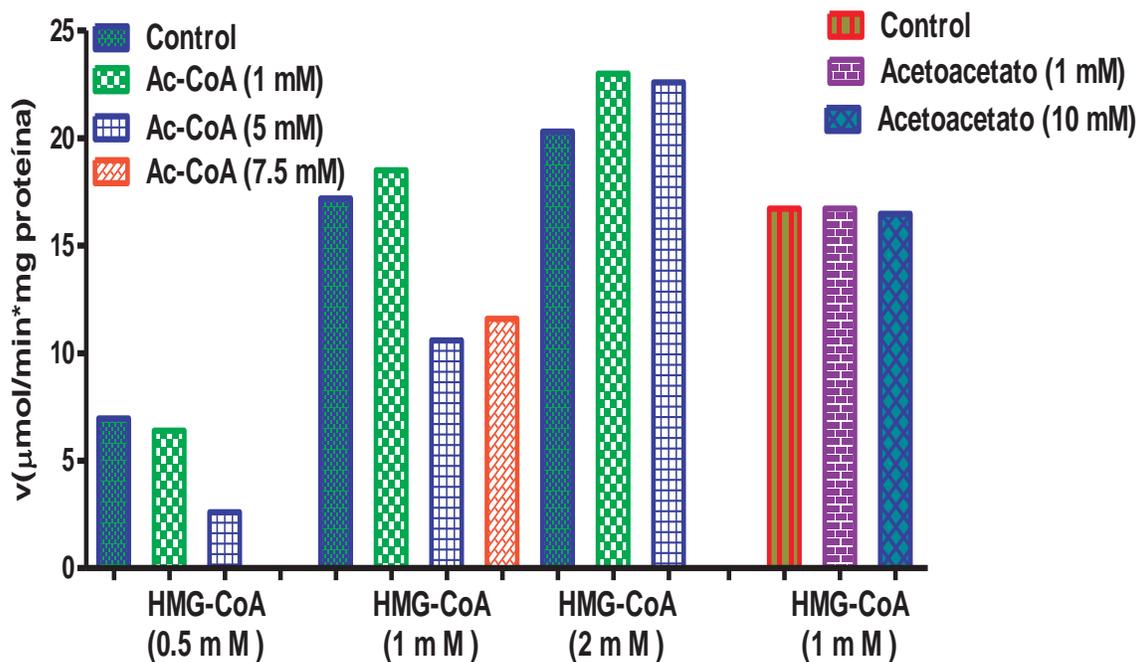


Fig. 29 Efecto del acetyl-CoA y del acetoacetato sobre la actividad enzimática de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Se realizaron análisis de la actividad enzimática en ausencia y en presencia del Acetyl-CoA o Acetoacetato a concentraciones del HMG-CoA a 0.5, 1 y 2 mM con 0, 1, 5 y 7.5 de Acetyl-CoA o 1 mM de HMG-CoA con 1 y 10 mM de Acetoacetato; se incubaron las mezclas de reacción con las condiciones anteriormente citadas.

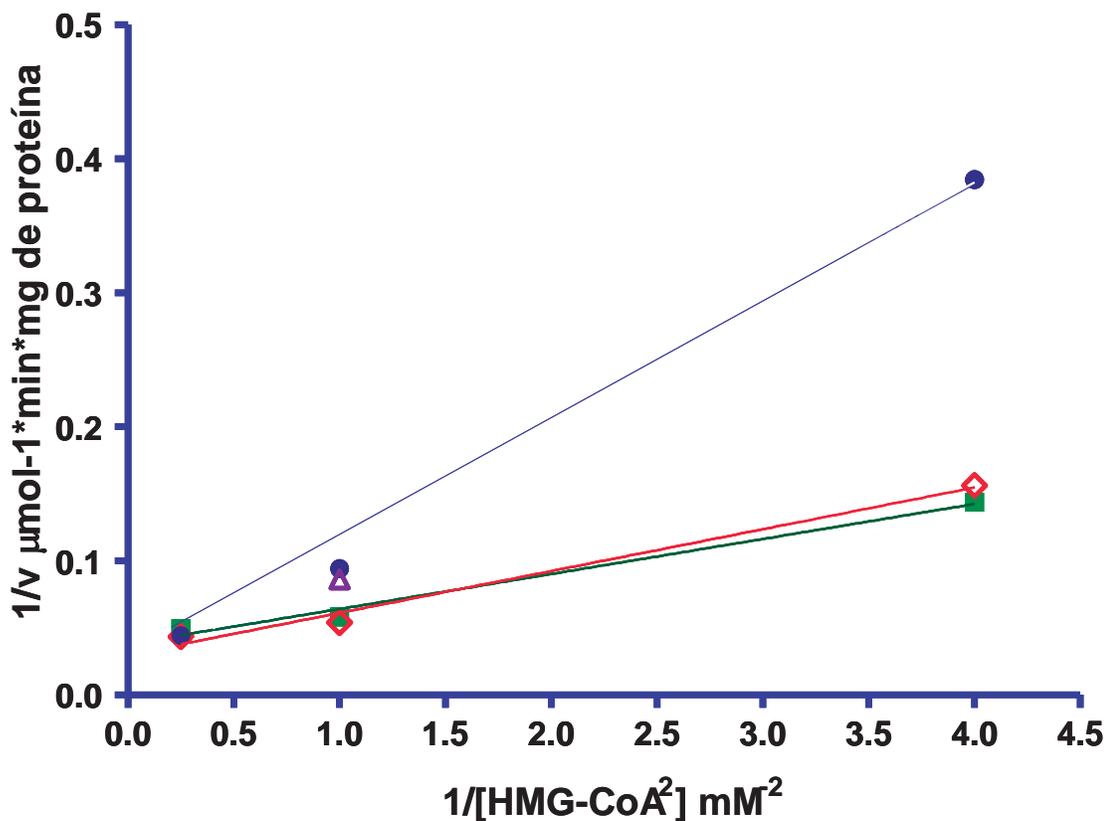


Fig. 30 Análisis del efecto del acetil-CoA sobre la actividad enzimática de la HMG-CoA de *P. aeruginosa* liasa con el modelo matemático de Lineweaver-Burk para enzimas alostéricas. ■ Reacción control, ◇ reacción adicionada con 1 mM de Acetil-CoA ● reacción adicionada con 5 mM de Acetil-CoA y △ reacción adicionada con 7.5 mM de acetil-CoA.

7.10 COMPORTAMIENTO BIFUNCIONAL DE LA PROTEÍNA LiuE

Para determinar la participación de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA liasa en la vía catabólica de los terpenos acíclicos se planteo sintetizar el probable sustrato (3-hidroxi-isohexenil-glutaril-CoA). Sin embargo, dicha síntesis no pudo llevarse a cabo, se diseñaron dos experimentos para evaluar el papel de la HMG-CoA liasa en el catabolismo de los terpenos acíclicos como se describe en Materiales y Métodos.

7.10.1 Determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa en extractos de *P. aeruginosa*

Se ha descrito que *P. aeruginosa* al ser crecidas en glucosa con citronelol como fuente de carbono y energía es capaz de expresar las proteínas codificadas en los operones *atu* y *liu* (Aguilar *et al.*, 2006), por lo que se llevó a cabo la determinación de la actividad de HIHG-CoA liasa de LiuE mediante reacciones acopladas siguiendo las reacciones de la figura 31, para lo cual se emplearon extractos celulares de la cepa silvestre (PAO1) así como la cepa mutante en el gen *liuE* (PAM*liuE*).

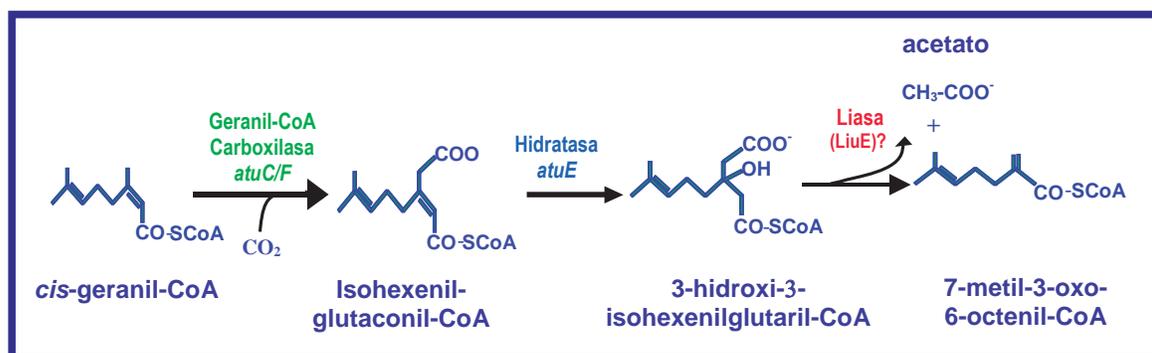


Fig. 31. Diagrama de las reacciones acopladas para la determinación de la actividad 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa. En la figura se muestra el catabolismo de los terpenos acíclicos a partir del paso de carboxilación del *cis*-geranil-CoA llevado por la geranil carboxilasa codificada en los genes *atuC/atuF*, el cual puede ser hidratado por la hidratasa codificada en el gen *atuE* generando 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA, sustrato que posiblemente es reconocido por LiuE y fragmentado en acetato y 7-metil-3-oxo-6-octenil-CoA.

Como se observa en la figura 32, cuando a la mezcla de reacción se le adicionaron los extractos celulares de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 wt se consumieron 34 nmol de *cis*-Geranil-CoA; sin embargo, al adicionarse a la mezcla de reacción los extractos celulares de *P. aeruginosa* PAO1 wt más la proteína LiuE purificada se consumieron 54 nmol de *cis*-Geranil-CoA aumentando un 58.8 % el consumo del sustrato. Al emplearse los extractos celulares de la *P. aeruginosa* PAM*liuE* el consumo de *cis*-Geranil-CoA disminuyó un 63 % (12.5 nmol), sin embargo, al adicionarse a la mezcla de reacción los extractos celulares de la *P. aeruginosa* PAM*liuE* más la proteína LiuE purificada el consumo del *cis*-Geranil-CoA aumentó un 180 % (35 nmol) con respecto al consumo con los extractos celulares de la *P. aeruginosa* PAM*liuE*. Estos resultados nos sugieren que LiuE tiene una implicación en el catabolismo de los terpenos acíclicos siendo probable su participación en la fragmentación del 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA.

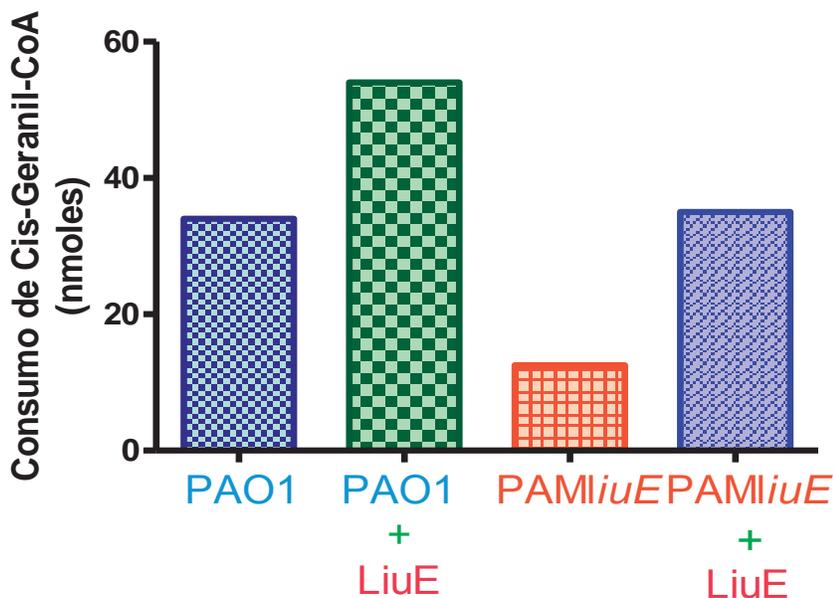


Fig. 32 Determinación de la actividad de HIHG-CoA liasa en extractos celulares de *P. aeruginosa*. PAO1, cepa silvestre; PAMliuE, mutante en *liuE* procedente de PAO1 (Díaz-Pérez *et al.*, 2004). n=2. Se determinó el consumo del *cis*-Geranyl-CoA empleando los extractos celulares antes mencionados en ausencia o en presencia de LiuE, mediante el análisis de las fracciones solubles de cada una de las determinaciones mediante HPLC.

7.10.2 Determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa empleando reacciones acopladas con las enzimas recombinantes geranyl-CoA carboxilasa e isohexenil glutaconil-CoA hidratasa

Debido a los datos obtenidos en el experimento con los extractos celulares de las *Pseudomonas* silvestre y mutante (Figura 32), se purificaron las proteínas involucradas en la degradación de los terpenos acíclicos (Figura 33), para posteriormente llevar a cabo la renaturalización de las mismas como se describe en materiales y métodos.

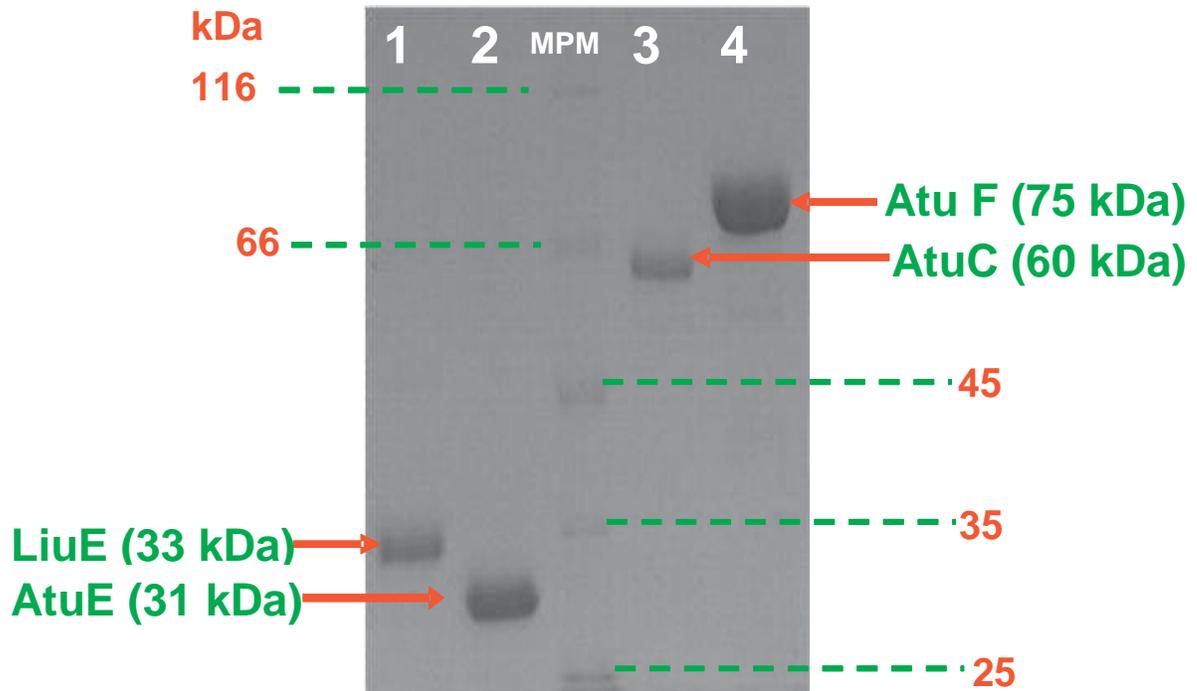


Fig. 33 Purificación de las proteínas usadas en la reacción acoplada de HIHG-CoA liasa. Fotografía del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). MPM marcador de peso molecular (Fermentas), carriles 1) LiuE purificada, 2) AtuE purificada; 3) AtuC purificada y 4) AtuF purificada.

Una vez obtenidas las proteínas purificadas y renaturalizadas se llevó a cabo la determinación de la actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa, empleando reacciones acopladas, las determinaciones fueron realizadas como se describe en materiales y Métodos, las reacciones acopladas son ilustradas en la figura 31. Observándose que cuando en la mezcla de reacción se adicionaron la geranyl-CoA carboxilasa (AtuC/AtuF), la isohexenil glutaconil-CoA hidratasa (AtuE) sin la proteína LiuE se consumieron 1.59 nmol de *cis*-geranyl-CoA. Mientras que cuando a la mezcla de reacción es adicionada LiuE además de la geranyl-CoA carboxilasa y la isohexenil glutaconil-CoA hidratasa el consumo del sustrato aumentó a 17.82 nmol (datos no mostrados). Estos resultados sugieren la participación de LiuE en la ruta catabólica de los terpenos acíclicos.

VIII DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el presente estudio y con la finalidad de realizar la caracterización bioquímica de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa (LiuE) de *P. aeruginosa* fue necesario purificar la proteína, para lo cual se planteó la estrategia de amplificar, clonar y subclonar el gen *liuE*, en el vector de expresión pTrcHis-2A. Como característica principal, el vector pTrcHis-2A adiciona un epítipo denominado *myc*, el cual es útil para inmunodetectar la proteína recombinante, y un hexapéptido de seis histidinas a la proteína recombinante para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad (resina metálica). Otra de las características del vector es que posee un promotor inducible (regulado por el operador de lactosa), el cual permite la expresión de la proteína fusionada en cantidades suficientes para llevar a cabo su posterior purificación y caracterización.

Al obtenerse el vector recombinante pTLE2011, con el gen de interés en el vector de expresión pTrcHis-2A, se transformó con él la cepa *E. coli* JM101 y se determinó el periodo de inducción de la cepa recombinante. Se observó que a partir de las 20 h post-inducción la proteína recombinante LiuE fué sobre-expresada en los extractos celulares, indicándo que el periodo mayor a 20 h es el óptimo para llevar a cabo la purificación.

El método de purificación que se empleó fue el sistema en lote, el cual a diferencia del sistema en columna, permite manipular la interacción del complejo resina-proteína, ya que al mantenerse en agitación constante, se le imprime energía cinética a las moléculas interactuantes, facilitando de esta manera el rompimiento de las interacciones inespecíficas y al mismo tiempo facilitando la interacción con la proteína recombinante, la cual desplaza a las proteínas que se unen a la resina de forma inespecífica. La forma en la cual se realizó la purificación de LiuE fue empleando condiciones nativas, para obtener la proteína funcional, es decir, con actividad catalítica. Fue necesario determinar la concentración de la sal del imidazol necesaria para llevar a cabo los lavados o remoción de las proteínas inespecíficas del complejo resina-proteína sin afectar la interacción de la proteína de interés; para lo cual se realizó un gradiente de imidazol empleando concentraciones de 10 mM, 15 mM y 20 mM y se determinó que la concentración adecuada de la sal para realizar dichos lavados fue 15 mM. De la misma manera se realizó un gradiente de la sal para determinar la concentración adecuada para eluir la proteína LiuE, las concentraciones probadas de imidazol fueron 100 mM, 150 mM y 200 mM, obteniéndose la mayor parte de la proteína empleando la concentración de 150 mM de imidazol.

Una vez obtenida la proteína purificada fue necesario implementar un método para evaluar la actividad enzimática de la probable HMG-CoA liasa midiendo el consumo del sustrato o la aparición del (los) producto(s), por lo que se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa los tiempos de retención de los estándares tanto del sustrato (HMG-CoA) como de uno de los productos (Acetil-CoA). Para poder evaluar la actividad enzimática, se montó un método empleando como solvente acetonitrilo del 10-80 % en amortiguador de acetato de amonio 25 mM/ ácido acético 0.5 %; sin embargo, el área del acetato del amortiguador empleado fue muy grande, y debido a que éste pudiese estar enmascarando los productos de la reacción enzimática se cambió al amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.7, con un flujo de 1 ml/min. Los ésteres de CoA fueron detectados a 260 nm, obteniendo tiempos de retención para el HMG-CoA y el Acetil-CoA de 13.9 min y 16.4 min, respectivamente. El intervalo de tiempo de retención entre cada uno de los analitos es suficiente para poder cuantificar la desaparición del HMG-CoA (sin que uno afecte al otro) y de esta forma evaluar la actividad enzimática de LiuE.

El rompimiento del HMG-CoA puede seguirse espectrofotométricamente empleando ensayos enzimáticos acoplados que miden la producción de uno de los dos productos de la reacción, acetil-CoA (ensayo enzimático acoplado a citrato sintasa) ^[28, 29] o acetoacetato (ensayo enzimático acoplado a β -hidroxibutirato), mientras que el método directo para la determinación de la actividad de la HMG-CoA liasa consiste en marcar con carbono radioactivo (^{14}C) al HMG-CoA con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método para el estudio (estimando el rompimiento del sustrato midiendo la conversión de la radioactividad ácido-estable). Para la determinación de la actividad de la proteína recombinante de la isoforma mitocondrial de humanos y para la enzima de *Pseudomonas mevalonii*, el ensayo espectrofotométrico acoplado a citrato sintasa se ha empleado rutinariamente ^[29]. Sin embargo, en el presente trabajo se implementó un nuevo método de determinación directo, el cual es altamente sensible para evaluar la actividad catalítica de la HMG-CoA liasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En éste método se determina la cantidad de sustrato consumido durante la reacción enzimática empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Haciendo más sensible y precisa la determinación de la actividad catalítica de la enzima.

Dentro de los parámetros que se determinaron para llevar a cabo la caracterización de LiuE se encuentran la concentración de proteína, el tiempo de reacción, el pH, la temperatura y la dependencia de cofactores.

Con respecto a la concentración de proteína se determinó que una concentración de 1 µg de proteína desarrolla una relación lineal con respecto a la actividad enzimática, relación que se encontró al incubar la mezcla de reacción durante cinco minutos, por lo que se emplearon estos valores para la determinación del pH y la temperatura óptima.

La temperatura imparte energía cinética a las moléculas reactantes generando colisiones más productivas por unidad de tiempo. Si las moléculas absorben demasiada energía la estructura terciaria podría afectarse y la enzima podría ser desnaturalizada, perdiendo la actividad catalítica ^[45]. En los ensayos realizados con LiuE se determinó que la temperatura óptima fué de 37 °C, dato que concuerda con la clasificación de *P. aeruginosa* como un microorganismo mesófilico.

Los sitios activos de las enzimas son frecuentemente conformados de grupos ionizables, los cuales deben estar en la forma iónica correcta para mantener la conformación del sitio activo, la unión del sustrato o la catálisis de la reacción enzimática. ^[45] Por lo que se determinó este parámetro para LiuE de *P. aeruginosa*. Stegink y Coon 1968, han sugerido que un pH alcalino podría facilitar la pérdida de un protón de un residuo cisteinil o tirosil o de un grupo amonio presente en el sitio activo, formando un nucleófilo capaz de iniciar el rompimiento del HMG-CoA. Sin embargo, en el caso de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1, se determinó que el pH óptimo fue de 7.0. Los perfiles del pH contra actividad de la enzima aviar y bacteriana (*P. mevalonii*) mostraron que la máxima actividad enzimática ocurre en un rango de pH entre 8.5-9.0, y que a pH por debajo de 7 no muestra actividad significativa; este dato sugiere que se necesita la deprotonación de una base para que se lleve a cabo la catálisis, proponiéndose que un residuo cisteinil tiolato podría realizar dicho papel. Sin embargo, la posibilidad de cambios significativos en los valores de pK de los aminoácidos como resultado del microambiente en el sitio activo tiene que ser interpretado con mucha precaución. Este es el primer reporte en el que se encontró que el pH óptimo para el desarrollo de la actividad enzimática es neutro y no alcalino, sugiriendo propiedades diferentes de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a las proteínas homólogas a LiuE.

Los iones metálicos juegan un papel esencial en un tercio de las enzimas. Estos iones pueden modificar el flujo de electrones en el sustrato o en la enzima controlando la reacción enzimática. Además pueden servir para enlazar y orientar al sustrato con respecto a los grupos funcionales en el sitio activo y de esta manera proveer un sitio para la actividad redox si el metal tiene varios estados de oxidación ^[6, 21]. Kramer y Mizioroko anticiparon que la HMG-CoA liasa es una metaloenzima; se ha propuesto que el rompimiento del HMG-CoA ocurre mediante una catálisis ácido-base y requiere la

presencia de cationes divalentes tal como magnesio y manganeso. Con respecto al requerimiento de cationes divalentes, se determinó que la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1 desarrolla casi el mismo gado de actividad empleando como cofactor al Mg^{+2} o al Mn^{+2} (un 18 % menos actividad con respecto al Mg^{+2}) a concentraciones de 1 mM. Este dato no es sorprendente, debido a que el Mg^{+2} tiene mayor preferencia que el Mn^{+2} de interactuar con residuos de aminoácidos que contienen oxígeno, como grupos carbonilos o hidroxilos, dato que concuerda con el mecanismo de acción propuesto para dicha enzima (en el que se plantea que el catión divalente interactúa con el oxígeno de un grupo carbonilo de la enzima y con el oxígeno del grupo hidroxilo del sustrato) [9, 16, 20, 36]. Sin embargo, el Mn^{+2} se comporta de manera similar excepto que no tiene una afinidad tan marcada por ligandos que contienen nitrógeno como el Mg^{+2} . Tuinstra *et al.*, en el 2003 determinaron que el cambio del ácido glutámico por alanina en la enzima homóloga humana mitocondrial, tuvo como resultado el aumento de la constante de afinidad por el Mg^{+2} y el Mn^{+2} , 26 y más de 200 veces mayor, con respecto a la proteína WT, reforzándose así la afinidad de la enzima por el Mg^{+2} como cofactor preferencial.

Se presume que el catión divalente se liga a un átomo de oxígeno del grupo carboxilo y al grupo 3-hidroxilo del HMG-CoA enlazando a la enzima con el sustrato; formándose así un complejo ternario, facilitando la enolización y por lo tanto la estabilización de un carbanión intermediario. Un posible mecanismo de reacción involucra la deprotonación del grupo hidroxilo del C3 llevada a cabo por una base, seguido de la ruptura del enlace C-C y una enolización del acetyl-CoA asistida por un catión divalente para estabilizar la carga negativa que podría desarrollarse sobre el C2, después de la ruptura del enlace C-C. La reacción es complementada por la protonación del C2 por un ácido proponiéndose que se emplean residuos de aminoácidos básicos y ácidos situados en lados opuestos de la unión al sustrato.

La presencia de secuencias conservadas (-HXH y CXXXC-) en las HMG-CoA liasas, sugieren que estos residuos potencialmente actúan como ligandos al catión. En humanos, se ha propuesto que los residuos H235, D42 y E72 permiten la unión del catión con la proteína, mediante estudios de densidad electrónica se encontró un sitio de unión a un catión divalente en la proteína, determinándose que el catión interactuante más probable es el Mg^{+2} . El sitio de unión al ligando muestra una coordinación octaédrica utilizando cuatro residuos y dos moléculas de agua.

En *P. mevalonii*; se encontró que la enzima en presencia de 1 mM de EDTA es inactiva, mientras que a concentraciones bajas de Mn^{+2} posee baja actividad y a concentraciones saturantes (arriba de 1 mM) de Mg^{+2} o Mn^{+2} desarrollaron la misma velocidad. A concentraciones mayores de 50

mM de Ca^{+2} tiene bajo nivel de actividad y en presencia de Zn^{+2} y Cu^{+2} la enzima no mostró actividad significativa [46]. Narasimhan *et al.* (1992), demostraron que la enzima de *P. mevalonii*, empleando el Mn^{+2} como cofactor desarrolla solamente el 40 % de la actividad enzimática con respecto a la actividad que alcanza empleando al Mg^{+2} .

En la HMG-CoA liasa de *P. mevalonii* se realizaron estudios de la dependencia de la concentración de estos cationes divalentes (Mg^{+2} y Mn^{+2}) para determinar las constantes de activación (K_a), las cuales fueron de 2 μM y 6.8 mM respectivamente. También se observó que concentraciones de Mn^{+2} tan altas como 100 μM inhibieron la actividad enzimática, mientras que a concentraciones menores de 300 μM de Mg^{+2} no se estimuló la actividad enzimática.

Si se mantiene una concentración constante de la enzima y se varía la concentración del sustrato se podrá determinar el comportamiento de la enzima con respecto a sus parámetros cinéticos. Un aumento en la concentración de sustrato, puede producir un aumento rápido de la velocidad de reacción, al aumentar la concentración del sustrato, la velocidad de reacción comenzará a disminuir, a este punto se dice que los centros activos de la enzima se encuentran saturados.

Las propiedades catalíticas de la HMG-CoA liasa han sido estudiadas de manera directa e indirecta en fuentes procarióticas (*P. mevalonii*) y eucarióticas (isoformas mitocondrial y peroxisomal de humanos y aves).

Scher *et al.*, (1988) determinaron que la K_m para la enzima recombinante de *P. mevalonii* fue de 100 μM para el (S)-HMG-CoA, de 10 a 30 veces mayor que las de origen animal. Sin embargo, Chakravarthy *et al.*, (1992) demostraron la dependencia de la actividad de la enzima recombinante de *P. mevalonii* por la concentración del sustrato indicando una constante de Michaelis-Menten $K_m=20$ μM .

Roberts *et al.*, (1996) determinaron que la K_m para la enzima recombinante de humano fue de 24 μM para el sustrato, este dato es 4 veces menor que la homóloga de *P. mevalonii*. En el 2003, Tuinstra *et al.*, determinaron que la actividad específica de la HMG-CoA liasa de humanos es de 160 U/mg con una K_m de 48 μM . Carrasco *et al.*, (2007) determinaron que la K_m para la HMG-CoA fue de 70 μM con una actividad específica de 168 U/mg, las diferencias en los datos encontrados por ambos autores posiblemente son debidos al cofactor empleado en cada uno de los ensayos enzimáticos; Tuinstra empleo como cofactor al Mn^{+2} , mientras que Carrasco uso Mg^{+2} .

Como anteriormente se había comentado se puede alcanzar la misma V_{max} empleando a cualquiera de los cationes divalentes (magnesio o manganeso), sin embargo, se obtiene una constante de Michaelis diferente debido a las implicaciones estructurales que se originan en la formación del complejo ternario al emplear diferentes cofactores, por lo que nuevamente se demuestra que el cofactor de preferencia para la enzima es el Mg^{+2} .

La enzima HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1, a diferencia de las enzimas homólogas, posee una actividad catalítica de carácter alostérico regulada negativamente (inhibición competitiva por uno de los productos, el Acetil-CoA), y posee las siguientes propiedades catalíticas: $K_{0.5}$ 855 μ M, V_{max} 30.33 U/mg proteína y un valor de $n=2$ (estado de oligomerización). Sin embargo, se requieren concentraciones mayores de Acetil-CoA para apreciar con mayor claridad el efecto bifásico del inhibidor competitivo, es decir, se espera que el agente inhibidor competitivo a bajas concentraciones actúe como un activador y a elevadas concentraciones como un inhibidor. Por lo que se requieren obtener más datos experimentales con concentraciones mayores del inhibidor (arriba de 4 mM) a las empleadas en el presente estudio para obtener las constantes de inhibición y realizar un análisis más preciso de los parámetros cinéticos.

Como se mencionó con anterioridad, los datos cinéticos experimentales sugieren que la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* es una enzima mulimérica (homodímero) y siendo el estado de oligomerización uno de los factores determinantes en el comportamiento enzimático, se determinó el número de subunidades o protómeros que conforman a la holoenzima. Mediante un análisis en BN-PAGE se determinó que la holoenzima HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1 en condiciones nativas probablemente es un homodímero.

En el caso de las HMG-CoA liasas homólogas de humano, Fu *et al.*, en el 2006 reportaron que la isoforma mitocondrial en solución, genera homodímeros y que también se pueden llegar a formar homotetrámeros, siendo la forma homodimérica la más estable en condiciones fisiológicas. Tuinstra *et al.*, en el 2002 reportaron que la isoforma peroxisomal es homodimérica. En la homóloga aviar se determinó mediante cromatografía de filtración en gel que la enzima existe como un homodímero.

Forouhar *et al.*, 2006 cristalizaron las enzimas homólogas de *Brucella melitensis* y *Bacillus subtilis*, encontrando que la liasa de *B. subtilis* en solución existe en dos formas, una homodimérica

(90 %) y una homotetramérica (10 %), siendo la forma homodimérica la más estable en condiciones fisiológicas; la de *B. melitensis* existe en una forma homodimérica.

Con relación al mecanismo de oligomerización de las enzimas hómologas a LiuE, se han realizado análisis de las secuencias de los aminoácidos que la conforman. Las HMG-CoA liasas animales tienen en el extremo carboxilo una secuencia C323-K/R324-L325. El entrecruzamiento de proteínas y mediciones de la actividad sugieren que la actividad enzimática es regulada por enlaces inter-subunidades mediadas por las C323 de las subunidades adyacentes de la isoforma mitocondrial. En este intercambio reversible de grupos tioles por puentes disulfuro, solamente la forma reducida de la enzima muestra actividad catalítica substancial. En la enzima homóloga aviar se demostró que la actividad enzimática es estimulada por la adición de agentes tioles exógenos. Datos cristalográficos de la HMG-CoA liasa de la isoforma mitocondrial no muestran la formación de puentes disulfuro por lo que la generación de oligómeros de la isoforma mitocondrial no está mediada por la formación de dichos puentes. Las HMG-CoA liasas bacterianas no contienen una cisteína en la región carboxilo terminal y parecen no ser sensibles a la regulación por intercambio de grupos tioles a puentes disulfuro. Scher *et al.*, (1988) determinaron que la HMG-CoA liasa de *P. mevalonii* fue sensible a concentraciones de 0.1-5.0 mM de DTT, alcanzando una actividad en ausencia del agente reductor menor al 1 % de la actividad alcanzada en presencia del agente reductor. Sin embargo, Narasimhan *et al.*, (1992) determinaron que la HMG-CoA liasa de *P. mevalonii* aislada en amortiguadores que contienen grupos tioles endógenos, mostró un incremento en la actividad cerca de dos veces en presencia de 5 mM de DTT.

En el análisis de BN-PAGE de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* se determinó que la enzima probablemente es homodimérica, sin embargo, en el análisis electroforético se observó un corrimiento electroforético difuso, sugiriendo que la enzima podía presentar alteraciones en su estructura (modificaciones químicas o post-traduccionales), por lo que se realizó un análisis bidimensional para elucidar esta conjetura. Se encontró que la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* codificada en el gen *liuE* posee al menos cinco isoenzimas, de las cuales, una corresponde al pI teórico. La enzima posee dos isoenzimas mayoritarias cuyos puntos isoeléctricos son 6.8 y 7.0, sugiriendo que estas isoenzimas pudieran ser el resultado de modificaciones químicas originadas durante el análisis bidimensional, o bien, ser producto de una modificación post-traducciona, sugiriendo este último que la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* pudiera desarrollarse como un punto de regulación metabólica, mediada por fosforilaciones o defosforilaciones ya que se encontraron 10 sitios probables de fosforilación (dato no mostrado).

CARACTERIZACIÓN DE LiuE DE *P. aeruginosa*, UNA ACIL-CoA LIASA INVOLUCRADA EN EL CATABOLISMO DE LEUCINA Y DE TERPENOS ACÍCLICOS

Las enzimas homólogas a LiuE son específicas para su sustrato, es decir, catalizan la ruptura de un solo sustrato, y muestran constantes de afinidad pequeñas denotando la gran afinidad por su sustrato, además poseen un comportamiento enzimático Michaeliano. A diferencia la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* PAO1, mostró un comportamiento enzimático alostérico al interactuar con el HMG-CoA. LiuE posee una elevada constante de afinidad por el HMG-CoA con respecto a su homóloga bacteriana (*P. mevalonii*) sugiere que podría ser capaz de reconocer más de un sustrato; estos datos reforzaron la hipótesis de que la enzima LiuE es una enzima bifuncional que es capaz de reconocer al 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA (HIHG-CoA) e hidrolizarlo. Utilizando reacciones acopladas empleando extractos celulares de la *P. aeruginosa* PAO1 WT y de la *P. aeruginosa* PA mliuE, y con la adición de LiuE a la mezcla de reacción, se observó que la adición de la HMG-CoA liasa aumentó la cantidad de cis-geranil-CoA consumido con respecto a su control (reacción llevada a cabo con los extractos celulares de la cepa silvestre y la mutante) un 58.8 % y 180 % en extractos celulares de la cepa silvestre y mutante respectivamente. Lo anterior arrojó más evidencia acerca de la actividad bifuncional de la enzima, misma que se comprobó al realizar reacciones acopladas empleando la cis-geranil-CoA carboxilasa (AtuC/AtuF) y la isohexenil glutaconil-CoA hidratasa (AtuE), purificadas y renaturalizadas, observando un consumo pobre de cis-geranil-CoA (1.59 nmol consumidos) al estar ausente LiuE en la mezcla de reacción, mientras que al agregar a la reacción la proteína LiuE activa el consumo del cis-geranil-CoA aumento 11 veces (17.82 nmol de cis-geranil-CoA consumidos). Con lo anterior se recaba evidencia para sugerir que LiuE tiene participación en las rutas catabólicas de la leucina y de los terpenos acíclicos, mediante el reconociendo y fragmentación de los respectivos intermediarios metabólicos (el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA y el 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA) de ambas rutas, respectivamente.

IX CONCLUSIONES

- El gen *liuE* (ORF PA2011) de *P. aeruginosa* PAO1 codifica para la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa (E.C. 4.2.3.4) con actividad adicional de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA liasa (E.C. 4.1.2.26).
- LiuE es una enzima bifuncional que participa en el catabolismo de Leucina y de los Terpenos Acíclicos.

X PERSPECTIVAS

- Sintetizar y purificar el 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA para llevar a cabo la determinación de los parámetros bioquímicos de la función dual de LiuE como HIHG-CoA liasa (E. C. 4.2.1.2.26).

XI ANEXO

11.1 PREPARACIÓN DE LOS AMORTIGUADORES EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO

11.1.1 AMORTIGUADOR DE ACETATOS DE POTASIO (20 mM)

Para preparar los amortiguadores de acetatos se pesaron 0.01963 g y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada estéril y se ajustaron los pH's con ácido acético glacial concentrado (99.9 %).

11.1.2 AMORTIGUADOR TRIS-HCl (20 mM)

Para preparar los amortiguadores de Tris-HCl se pesaron 0.0242 g de tris base y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada estéril y se ajustaron los pH's con ácido clorhídrico (HCl) 1 N.

11.1.3 AMORTIGUADOR DE FOSFATOS DE POTASIO (20 mM)

Para preparar los amortiguadores de fosfato de potasio se pesaron las sales monobásicas y dibásicas de acuerdo al pH deseado, y éste se ajustó con una disolución de HCl 1 N.

11.1.3.1 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 6.0

Para preparar el amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.0 se pesaron 0.0236 g y 0.0046 g de las sales mono y dibásicas respectivamente, y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada estéril.

11.1.3.2 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 6.5

Para preparar el amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.0 se pesaron 0.0182 g y 0.0115 g de las sales mono y dibásicas respectivamente, y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada estéril.

11.1.3.3 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 7.0

Para preparar el amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.0 se pesaron 0.0105 g y 0.0214 g de las sales mono y dibásicas respectivamente, y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada estéril.

11.1.3.4 Amortiguador de fosfatos de potasio (20 mM) pH 7.5

Para preparar el amortiguador de fosfatos de potasio pH 6.0 se pesaron 0.0045 g y 0.0029 g de las sales mono y dibásicas respectivamente, y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada estéril.

11.2 PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

- a) En tubos eppendorf se realizó la adición de alícuotas de 0, 5, 10, 15 y 20 μ l de BSA (Sigma) y 10 μ l de la proteína purificada, las cuales se llevaron a un volumen final de 100 μ l con NaCl.
- b) Se les adicionó 1 ml de azul brillante de Coomassie, se agitó y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- c) Se determinó la absorbencia a 595 nm. La lectura se realizó en el espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis.
- d) Se empleó la curva estándar para la determinación de la concentración de proteína purificada.

11.2.1 Preparación del azul brillante de Coomassie

- a) Se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G250 en 50 ml de EtOH al 95 %.
- b) Se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85 %.
- c) Se aforo a 1 l con agua.
- d) Posteriormente se filro a través de un papel filro Whatman No. 1.
- e) El azul brillante de Coomassie se almacenó a 4 °C.

Para elaborar un gel desnaturalizante al 10 % se ensamblaron las placas de vidrio, seguido de eso, se preparó el gel con las siguientes disoluciones:

11.3 ELABORACIÓN DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES AL 10 %

11.3.1 Gel separador al 10 %

Se preparó una disolución mezclando las siguientes soluciones: 2.2 ml de agua destilada, 1.66 ml de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30 %, 1.26 ml de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 50.4 µl de SDS al 10 %, 25.6 µl de persulfato de amonio (PSA) al 10 % y 4.5 µL de N,N,N,N-Tetrametil-Etilendiamina (TEMED). Se mezcló vigorosamente cada vez que se agregó cada disolución, se vació en las placas de vidrio y se agregó una capa de agua con la finalidad de obtener un gel plano en su superficie, dejándolo polimerizar por aproximadamente 30 minutos.

11.3.2 Gel concentrador al 4 %

Se preparó una disolución mezclando las siguientes soluciones: 1.22 ml de agua destilada, 0.27 ml de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30 %, 0.5 ml de 1 M Tris-HCl pH 6.8, 19.8 µl SDS al 10 %, 10.8 µl de PSA al 10 % y 2.7 µl de TEMED. Se mezcló cada vez que se agregó cada reactivo, se vació en los vidrios, se colocó el peine de teflón y se dejó polimerizar aproximadamente 20 minutos.

11.3.3 Preparación de la muestra y de los marcadores de peso molecular

Se mezcló en una relación 1:4 (v/v) el amortiguador de carga para geles desnaturalizantes con la muestra a analizar (2-10 µg), así como los marcadores de peso molecular (Fermentas) y calentarlos en baño María a 95 °C durante 10 minutos.

11.3.4 Tinción de azul de Coomassie

- 1.- Se agregaron 20 ml (o el volumen necesario para cubrir el gel) de la solución de tinte para proteínas azul de Coomassie, y se agitó constantemente durante 30 minutos.
- 2.- Se recuperó el colorante y se lavó con agua destilada.
- 3.- Se adicionó la solución de destintado, y se dejó destintado el gel durante aproximadamente 3 h.

11.3.5 Amortiguador de corrida (tris-glicina) desnaturalizante

Se prepara 1 litro del amortiguador a una concentración final de 25 mM Tris base (3.0285 g), 192 mM Glicina (14.4113 g) y 3.46 mM SDS (1 g) homogenizar la disolución y almacenar a 4 °C.

11.3.6 Amortiguador reductor de SDS (carga de muestra)

Para preparar 8 ml de amortiguador de carga mezclar: 3.8 ml de H₂O destilada, 0.5 ml del amortiguador Tris HCl pH 6.8 0.5 M, 0.8 ml de Glicerol, 1.6 ml SDS 10 % (p/v), 0.4 ml de 2-β-mercaptoetanol y 0.4 ml de azul de bromofenol 0.005 % (p/v). Alicuotear en tubos eppendorf y almacenar a -20 °C.

11.3.7 Solución de desteñido

Para preparar 1 l de disolución mezclar 400 ml de MeOH, 1000 ml de ácido acético glacial y 500 ml agua destilada.

11.4 PREPARACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE UN BN-PAGE

11.4.1 Preparación de la muestra y de los marcadores de estado de oligomerización

Mezclar en una relación 1:1 el amortiguador de carga no reductor con la muestra a analizar (2-10 µg), así como los marcadores de estado de oligomerización, 2.5 µg de Albúmina sérica bovina, 5 µg de Ureasa Jack-Bean (Sigma).

11.4.2 Amortiguador de corrida (tris-glicina) nativo

Se prepara 1 l del amortiguador a una concentración final de 25 mM Tris base (3.03 g) y 192 mM Glicina (14.41 g), se homogenizó la disolución y se ajustó el pH del amortiguador a 8.3. Se almaceno a 4 °C.

11.4.3 Amortiguador de Carga No reductor

Se preparó el amortiguador con la siguiente composición: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 40 % Glicerol y 0.01 % azul de Bromofenol.

11.4.4 Solución de desteñido

Para preparar 1 l de disolución se mezclaron 400 ml de MeOH, 70 ml de ácido acético glacial y 530 ml agua desionizada.

11.5 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

11.5.1 Preparación del amortiguador “O” (EQUILIBRIO)

Para preparar 200 ml del amortiguador “O” se mezclaron 1.45 g de Tris Base (concentración final 0.06 M pH 6.5), 4 g de SDS (2 %), 10 ml de β -mercaptoetanol (5 %), 20 ml de Glicerol (10 %).

11.5.2 Preparación del amortiguador “L” (LISIS)

Para preparar 1 ml del amortiguador “L” se mezclaron 730 μ l Urea 9.5 M, 20 μ l NP-40 (2 %), 100 μ l anfolitas [3-10 y 5-8] (20 %) y 50 μ l β -mercaptoetanol (5 %).

La función del buffer de lisis es convertir todas las proteínas a una sola conformación, prevenir diferentes estados de oxidación y agregados proteicos, obtener proteína de carácter hidrofóbico en solución, desactivar proteasas, romper puentes disulfuro y puentes de hidrógeno ^[30].

11.5.3 Preparación del amortiguador “K” (CUBIERTA)

Para preparar 1 ml del amortiguador “K” se mezclaron 631 μ l de Urea 9.5 M (Concentración final de Urea 8 M), anfolitas [3-10 y 5-8] (20 %) y aforar a 1 ml con agua desionizada.

11.5.4 Preparación de los amortiguadores de corrida

11.5.4.1 Amortiguador del ánodo

Para preparar 1 l de disolución 0.001 M de H₃PO₄ se mezclaron 680 µl de H₃PO₄ al 85.5 % en 999.32 ml de agua desionizada.

11.5.4.2. Amortiguador del cátodo

Para preparar 1 l de disolución 0.002 M de NaOH se pesó 0.8 g de NaOH y se disolvieron en agua desionizada.

11.6 ELABORACIÓN DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES AL 12 %

11.6.1 Preparación de los geles en condiciones desnaturalizantes al 12 %

11.6.1.2 Gel separador 12 %

Para preparar 150 ml del gel separador al 12 % se mezclaron las siguientes soluciones: 59.85 ml de acrilamida al 30 % (acrilamida 29 %, N,N-metilen-bis-acrilamida 1 %), 28.5 ml de Tris-HCl 2M pH 8.8, 1.5 ml de SDS al 10 %, 675 µl de PSA al 10 %, 75 µl de TEMED y 59.4 ml de agua desionizada.

11.6.1.2 Gel concentrador 4 %

Para preparar 50 ml del gel concentrador al 4 % se mezclaron las siguientes soluciones: 6.5 ml de acrilamida al 30 % (acrilamida 29 %, N,N-metilen-bis-acrilamida 1 %), 3.125 ml de Tris-HCl 2M pH 6.8, 500 µl de SDS al 10 %, 325 µl de PSA al 10 %, 25 µl de TEMED y 39.525 ml de agua desionizada.

11.7 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TINCIÓN DE PLATA

11.7.1 Preparación de la solución fijadora

Se preparó la solución a una concentración final del 40 % de MeOH, 59.95 % de agua desionizada y 0.05 % de formaldehído al 37 %.

11.7.2 Preparación de la solución de sensibilización

Se preparo una solución al 2 % de tiosulfato de sodio 50X (1 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua desionizada).

11.7.3 Preparación de la solución de nitrato de plata al 0.1 %

Se disolvieron 0.15 g de AgNO_3 en 150 ml de agua desionizada y se puso a enfriar hasta el momento de su uso

11.7.4 Preparación de la solución reveladora

Para preparar la solución reveladora se mezclaron 18 ml de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) al 25 %, 1.5 ml de tiosulfato de sodio 100X (2 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua desionizada), 162 μl de formaldehído al 37 % y se aforó a 150 ml con agua desionizada.

11.7.5 Preparación de la solución de paro de reacción.

Para preparar 150 ml de la solución de paro de reacción se mezclaron 1.5 ml de ácido acético glacial gado analítico con 148.5 ml de agua desionizada.

XII BIBLIOGRAFÍA

- 1. Aguilar J. A., Zavala A. N., Díaz-Pérez 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2070-2079.
- 2. 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*. *J. Bacteriol.* 190: 4888-4893.
- 3. Anderson M. D., Che P. Song J., Nikolau B. J. y Wurtele E. S. 1998.** 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase is a component of the mitochondrial leucine catabolic pathway in plants *Plant Physiol.* 118: 1127-1138.
- 4. Anderson D. H. y Rodwell, V. W. 1989.** Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase gene of *Pseudomonas mevalonii*. *J. Bacteriol.* 171: 6468-6472.
- 5. Ausubel F. M., R. Brent R. E. Kingston, D.D. Moore, J. G. Seidam, J.A., Smith, K. Struhl. 1999.** *Short protocols in Molecular Biology*.
- 6. Bock C. W., Kaufman Katz A., Markham G. D. y Glusker, J. P. 1999.** Manganese as replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 7360-7372.
- 7. Campos-García J., E. A., Vázquez-Duhal 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3730-3734.
- 8. Cantwell S. G., Lau. E. P., Watt D.S. y Fall R. Ray. 1978.** Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 135: 324-333.

9. Carrasco P., Menao. S., López-Viñas E., Santpere G., Clotet J., Sierra A.Y., Gatacós E., Puisac B., Gómez-Puertas P., Hegardt F. G., Pie J. y Casals N. 2007. C-terminal end and aminoacid Lys48 in HMG-CoA lyase are involved in substrate binding and enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 91: 120-127.
10. Casals N., Gómez-Puertas P., Pié J., Mir C., Roca R., Puisac B., Aledo R., Clotet J., Menao S., Serra D., Asins G., Till J., Elias-Jones A. C., Cresto J. C., Chamoles N. A., Abdenur J. E., Mayatepek E., Besley G. Valencia A. y Hergadt, F. G. 2003. Structural ($\beta\alpha$)₈ TIM barrel model of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Lyase. *J. Biol. Chem.* 278: 29016-29023.
11. Chevallet M., Luche S. y Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols.* 4: 1852-1858.
12. Díaz-Pérez A. L. 2003. Identificación de los genes de *Pseudomonas aeruginosa* involucrados en la biodegradación del isoprenoide citronelol. *Tesis IIQB.* UMSNH.
13. Díaz-Pérez A. L., Román-Doval. C., Díaz-Pérez C., Cervantes C., Sosa-Aguirre C. R., López-Meza J. E. y Campos-García J. 2007. Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 309-316.
14. Díaz-Pérez A. L., Zavala-Hernández. A. N., Cervantes C., y Campos-García J. 2004. The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5102-5110.
15. Fall R. R., Brown J. L., y Schaeffer T. L. 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 715-722.
16. Forouhar F., M. Hussain., Farid R., Benach J., Abashidze M., Edstrom W. C., Vorobiev S. M., Xiao R., Acton T. B., Fu Z., Kim J-J P., Mizioroko H. M., Montelione G. T. y Hunt J. F. 2006. Crystal structures of two bacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyases suggest a common catalytic mechanism among a family of TIM-Barrel metalloenzymes cleaving carbon-carbon bonds. *J. Biol. Chem.* 281: 7533-7545.

17. Förster-Fromme K., Höschle B., Mack C., Bott M., Armbruster W. y Jendrossek D. 2006. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4819-4828.
18. Förster-Frome K. y Jendrossek D. 2006. Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 264: 25-31.
19. Friedmann S., Birgit. E. A. y Fuchs G. 2007. Properties of R-citramalyl-CoA lyase and its role in the autotrophic 3-hydroxypropionate cycle of *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.* 189: 2906-2914.
20. Fu Z., Runquist J. A., Forouhar F., Hussain M., Hunt J. F., Mizioro H. M. y Kim J-J. P. 2006. Crystal structure of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase, insights into catalysis and the molecular basis for hydroxymethylglutaric aciduria. *J. Biol. Chem.* 281: 7526-7532.
21. Glusker J. P., Katz A. K. y Bock C. W. 1999. Metal Ions in Biological Systems *The Rigaku Journal* 16: 8-16.
22. Guan X., Diez T., Prasad T. K., Nikolau B. J. y Wurtele E. S. 1999. Geranoyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 362: 12-21.
23. Hector M. L. y Fall, R. R. 1976. Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem.* 15. 3465-3472.
24. 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.
25. Höschle Birgit. y Jendrossek 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.

26. Huz P. W. y Miziorko H. M. 1992. Avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase: sensitivity of enzyme activity to thiol/disulfide exchange and identification of the proximal reactive cysteines. *Protein Sci.* 1: 1144-1153.
27. Huz P. W., Narasimham C. y Miziorko H. M. 1992. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase: affinity labeling of the *Pseudomonas mevalonii* enzyme and assignment of cysteine-237 to the active site. *Biochemistry* 31: 6842-6847.
28. Kramer P. R. y Miziorko H. M. 1980. Purification and characterization of avian liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A lyase. *J. Biol. Chem.* 255: 11023-11028.
29. Miziorko H. M. y Chakravarty N. 2000. *Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxi-3—methylglutaryl-CoA lyase. *Methods Enzymol.* 324: 139-146.
30. López J. L. 2007. Two dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatog. B* 849: 190-202.
31. Narasimhan C. y Miziorko H. M. 1992. *Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxi-3-methylglutaril-CoA lyase: characterization of the isolated recombinant protein and investigation of the enzyme's cation requeriments. *Biochemistry* 31: 11224-11230.
32. Narasimhan C., Roberts J. R. y Miziorko H. M. 1995. *Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: testing the function of the site cysteine by site-directed mutagénesis. *Biochemistry* 34: 9930-9935.
33. O'Farrel P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
34. Pacheco-Lamas H. R. 2006. Clonación y expresión heteróloga de los genes *atuC* y *atuF* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Tesis Fac. Biología. UMSNH.
35. Pié J., Casals N., Puisac B. y Hergardt F. G. 2003. Molecular basis of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J. Physiol. Biochem.* 59: 311-322.

36. Pié J., López-Viñas E., Puisac B., Menao S., Pié A. Casale C., Ramos F. J., Hegardt F. G., Gómez-Puertas P. y Casals N. 2007. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 92: 198-209.
37. Pirnik M. P., Atlas R. M. y Bartha R. 1974. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *J. Bacteriol.* 119: 868-878.
38. Roberts J. R., Narasimham C., Huz P. W., Mitchell G. A. y Miziorko H. M. 1994. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: expression and isolation of the recombinant human enzyme and investigation of a mechanism for regulation of enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 269: 17841-17846.
39. Roberts J. R., Mitchell G. A. y Miziorko H. M. 1996. Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue. *J. Biol. Chem.* 271: 24604-24609.
40. Rodríguez J. M., Ruíz-Salas P., Ugarte M. y Peñalva M. Á. 2004. Fungal metabolic model for type I 3-methylglutaconic aciduria. *J. Biol. Chem.* 279: 32385-32392.
41. Sambrook J., Fritsch J. E. y Maniatics T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2a ed. Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
42. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 742-746.
43. Schägger H. y Von Jagow G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complex in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
44. Schägger H. Cramer W. A. y Von Jagow G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230.
45. Segel I. H. 1993. Enzyme Kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems *Editorial Wiley Classics Library.*

46. Scher D. S. y Rodwell V. 1988. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase from *Pseudomonas mevalonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1003: 321-326.
47. Tuinstra R. L., Burgner J. W. II y Miziorko H. M. 2002. Investigation of the oligomeric status of the peroxisomal isoform of human 3-hydroxi-3-methylglutaryl-CoA lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* 408: 286-294.
48. Tuinstra R. L. y Miziorko H. M. 2003. Investigation of conserved acidic residues in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *J. Biol. Chem.* 278: 37092-37098.
49. Tuinstra R. L., Wang. C. Z., Mitchell G. A. y Miziorko H.M. 2004. Evaluation of 3-hydroxi-3-methylglutaril-CoA lyase arginine-41 as a catalytic residue: use acetyldithio-coenzyme A to monitor product enolization. *Biochemistry* 43: 5278-5295.
50. Wanders R. J. A., Schutgens R. B. H. y Zoeters P. H. M. 1988. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxi-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin. Chim. Acta* 171: 95-102.
51. Witting I., Braun H-P. y Schägger H. 2006. Blue Native Page *Nature Protocols* 1: 418-428.
52. Wong S. M. y Mekalanos J. J. 2000. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:10191-10196.
53. Yanish-Perron C., Vieyra J. y Messing. 1985. Improved M13 Phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13 pUC18 and pUC9 vectors. *Gene* 33:103-109.