UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

Efecto de RhlA en la producción de ramnolípidos y polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)

Biología molecular

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Tejeda Díaz Valentín

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gloria Soberón Chávez

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR INTERNO:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

México, D. F. 2012

DEDICATORIAS

A mis padres por su inmenso amor, constante apoyo, fuerza, fortaleza, comprensión y un largo etcétera.

A mi madre por cuidarme, por estar siempre a mi lado, por ser ejemplo de vida, gracias.

A mi padre por las cosas buenas que he aprendido de ti, por siempre apoyarme gracias.

A mi hermano, por tu compañía y por tu influencia en mi vida.

Al Sacerdote Héctor Lavalle, por haber sido parte de mi formación y guía espiritual.

A mis amigos con los que compartí esta etapa, a Urióstegui, Cristóbal, Pavel, Esteban, Esmeralda, Michel, Ivette, Daniel, Víctor, Ana Iris, Emir y Christian.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por darme una formación profesional tanto humana como técnica.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por haberme aceptado en su laboratorio, por su asesoría y por lo que esto significa en mi formación, muchas gracias.

A la M. en C. Alejandra Abigail González Váldez por su ayuda y asesoría tanto en la parte experimental como teórico siendo parte fundamental del desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Victoria Grosso por brindarme apoyo y consejos en la parte experimental del trabajo.

A mis sinodales por sus observaciones en este trabajo: M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez, Dr. Juan José Rodríguez Mercado, Dr. Justo Salvador Hernández Avilés y Biól. María Cristina Alvarado Domínguez.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Dra. Gloria Soberón Chávez del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM financiado por el proyecto DGPA-UNAM PAPIIT IN202510.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS **1**

RESUMEN **2**

INTRODUCCIÓN **3**

MARCO TEÓRICO **5**

Pseudomonas 5
Pseudomonas aeruginosa 6
Factores de virulencia *7*
Sistema sensor de quórum *8*
Biosurfactantes 9
Ramnolípidos. 10
Propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos *10*
Función de ramnolípidos *10*
Estructura de los ramnolípidos *11*
Aplicación biotecnológica de los ramnolípidos. *12*
Ruta biosintética de los ramnolípidos. *12*
Medio ambiente y crecimiento *13*
Polihidroxialcanoatos 13
Polihidroxialcanoatos y su relación con los ramnolípidos. *13*
Estructura de los polihidroxialcanoatos *14*
Ruta biosintética de los polihidroxialcanoatos. *14*
Aplicación biotecnológica de los polihidroxialcanoatos *15*
Antecedentes inmediatos 16

JUSTIFICACIÓN **18**

HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN **19**

OBJETIVO GENERAL **19**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **19**

METODOLOGÍA **20**

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS **22**

Efecto de la sobreexpresión de RhlA en la producción de ramnolípidos. 22
Efecto de la sobreexpresión de RhlA en la producción de polidroxialcanoatos. 24
Efecto de la sobreexpresión de RhlA en una mutante *phaG* en la producción de ramnolípidos. 25
Efecto de la sobreexpresión de RhlA en una mutante *phaG* en la producción de polihidroxialcanoatos. 26
Efecto de la sobreexpresión de RhlA en la producción de mono y di-ramnolípidos 27

CONCLUSIONES **28**

PERSPECTIVAS **29**

BIBLIOGRAFÍA **29**

APENDICE **33**

ABREVIATURAS

ACP	Proteína acarreadora de grupo acilo.
CoA	Grupo coenzima A. Un ácido pantoténico que contiene nucleótido y que funciona en el metabolismo de los ácidos grasos, cuerpos cetónicos y aminoácidos.
dTDP-L-ramnosa	Nombre del compuesto desoxi-timidina-di-fosfato-L-ramnosa, precursor en las síntesis de los lipopolisacáridos y de los ramnolípidos en *P. aeruginosa*
HAAs	Nombre en inglés (3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids) del dímero de ácidos grasos β-hidroxidecanoil β-hidroxidecanoato. Precursor esencial en la síntesis de los ramnolípidos (rhls) en *P. aeruginosa*.
lasRI	Primer sistema regulatorio (*lasI*/*lasR*) en la respuesta sensora de quórum en *P.aeruginosa*. Activa al sistema rhl y estos dos sistemas forman una cascada regulatoria.
LasI	Proteína codificada por el gen *lasI*, se encarga de producir la señal química o autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona, en *P. aeruginosa*.
LasR	Activador transcripcional dependiente de la densidad celular que es codificado por el gen *lasR*. Se une al autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona para activar al sistema rhl y la síntesis de algunos factores de virulencia en *P. aeruginosa*.
phaC	Gen que codifica para la síntesis de la PHA polimerasa (PhaC), cuya función es la de polimerizar los polihidroxialcanoatos.
phaG	Gen que codifica para la síntesis de la transacilasa PhaG, cuya función es la de transferir el grupo ACP de la molécula 3-hidroxiacil-ACP por el grupo CoA.
PHAs	Abreviación de los polihidroxialcanoatos, que son polímeros que se almacenan dentro de las células de *P. aeruginosa*.
PPGAS	Nombre del medio líquido de cultivo que favorece la producción de los ramnolípidos en *P. aeruginosa*.
rhlRI	Segundo sistema regulatorio (*rhlI*/*rhlR*) en la respuesta sensora de quórum en *P.aeruginosa*. Depende del sistema *las* para activarse y estos dos sistemas forman una cascada regulatoria.
RhlI	Proteína codificada por el gen *rhlI*, se encarga de producir la señal química o autoinductor N-butiril-L-homoserin-lactona en *P. aeruginosa*.
RhlR	Activador transcripcional dependiente de la densidad celular codificado por el gen *rhlR*. Se une al autoinductor N-butiril-L-homoserin-lactona para activar la síntesis de algunosfactores de virulencia en *P. aeruginosa*
rhlA	Gen que codifica la síntesis de la proteína RhlA, cuya función es formar el dímero de ácidos grasos (HAAs) que se emplean como sustrato en la síntesis de ramnolípidos en *P.aeruginosa*.
rhlAB	Operón que codifica las enzimas para la síntesis de mono-ramnolípidos en *P. aeruginosa*.
rhlB	Gen que codifica la síntesis de la proteína RhlB, que se encarga de transferir la ramnosa de la dTDP-Lramnosa al dímero de ácidos grasos (HAAs) para sintetizar los mono-ramnolípidos en *P.aeruginosa*
rhlC	Gen que codifica la síntesis de la proteína RhlC, cuya función es sintetizar los di-ramnolípidos en *P. aeruginosa*.
Rhls	Abrebiatura de los ramnolípidos, que son biosurfactantes glicolípidos excretados al medio y producidos por *P. aeruginosa*.
rmlBDAC	Operón que codifica las enzimas para la síntesis de la dTDP-L-ramnosa.

RESUMEN

El biosurfactante ramnolípido (rhl) factor asociado de virulencia y los polihdroxialcanoatos (PHAs) compuestos de almacenamiento energético, ambos con aplicaciones potenciales biotecnológicas son producidos desde un precursor en común por *Pseudomonas aeruginosa* a través de dos rutas de síntesis estrechamente relacionadas. Debido a las utilidades potenciales de los rhls se han diseñado estrategias de ingeniería genética para aumentar los niveles de producción sobreexpresando tanto en *Pseudomonas* como en hospederos heterólogos (*E. coli*) las dos primeras enzimas de la ruta de síntesis RhlA y RhlB obteniendo un aumento en los niveles de síntesis, en este trabajo se encontró que hay una disminución de rhls al sobreexpresar únicamente a RhlA indicando que un aumento de esta enzima no incrementa los niveles del biosurfactante. Por otro lado se encontró que RhlA puede participar en la ruta de los PHAs ya que estos aumentaron al sobreexpresar a esta enzima indicando que RhlA puede sintetizar un precursor común en ambas rutas, además se sugiere que RhlA tiene actividad transacilasa esto es transfiere la proteína acarreadora de grupo acilo (ACP) que está unido a los ácidos grasos 3-hidroxi por el grupo Coenzima A (CoA), ya que también se observó un aumento de PHAs al sobreexpresar a esta enzima en una mutante *phaG* (gen que codifica para la enzima con actividad transacilasas PhaG formando parte en la ruta de síntesis de los PHAs).

INTRODUCCIÓN

Las bacterias forman parte de los procariontes, las células procariotas carecen de estructuras delimitadas por membrana llamadas orgánulos, dentro de los procariontes hay dos grupos las arqueas y bacterias. Aunque estos dos grupos comparten una estructura de tipo procariota se diferencian entre sí por su historia evolutiva, las arqueas generalmente viven en condiciones extremas de temperatura o salinidad y no se conoce ningún patógeno humano, mientras que las bacterias establecen relaciones frecuentemente con los eucariontes (Madigan *et al*., 2003).

Durante siglos se aislaron bacterias relacionadas tanto con el desarrollo de enfermedades en el hombre como en su uso en biotecnología, por ejemplo en la industria de los alimentos, entre otras, y se les clasificó según algunas propiedades morfológicas tales como bacilos, cocos o espiroquetas; de tinción, por ejemplo la coloración de Gram, siendo Gram postiivas las bacterias que se visualizan de color moradas y Gram negativas las bacterias que se tiñen de color rosa debido a las diferencias en sus paredes celulares (Fig. 1) y sus propiedades bioquímicas como la utilización de fuentes de carbono. Esta clasificación no permitía, sin embargo, establecer relaciones taxonómicas entre estos organismos, ni su relación evolutiva con los organismos eucariontes (www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap1/).

Esto cambió cuando se usaron las secuencias de algunas moléculas presentes en todas las células como relojes moleculares y se pudo establecer un árbol filogenético de todos los seres vivos. La molécula usada como reloj molecular de la que hay más información disponible es el RNA de la subunidad pequeña de los ribosomas (srRNA). Mediante la medición de la tasa de cambio de esta molécula entre distintos organismos se ha podido construir un verdadero árbol de la vida en la que se distinguen tres grandes dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (Delong y Pace, 2001)

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que tiene importancia para el hombre tanto porque le representa problemas como porque le puede ser útil. Esta bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, agua, así como de plantas, animales y hasta de personas sanas. Todos estamos cotidianamente en contacto con ella, como con otras bacterias sin embargo, al ser un patógeno oportunista, infecta a personas con bajas defensas, tales como individuos con quemaduras, pacientes en terapia intensiva, con SIDA y con gran frecuencia los pulmones de pacientes con fibrosis quística, un padecimiento genético. En muchos de estos casos la infección es mortal pues tiene una alta resistencia natural a diversos antibióticos. Todas estas características conllevan a que las infecciones por *P. aeruginosa* representen un problema de salud importante.

Esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Así, se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar compuestos contaminantes como los alcanos de cadena ramificada, ya que produce el biosurfactante ramnolípido que es útil para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados. Por otra parte, *P. aeruginosa* produce los ramnolípidos de una manera coordinada con diversos factores que intervienen en la virulencia de la bacteria. Así que entender la regulación de la producción de

ramnolípidos permite entender los mecanismos de virulencia de la bacteria y proponer estrategias para combatir sus infecciones.

Desde un enfoque básico *P. aeruginosa* representa un modelo de gran interés que ha sido estudiado desde múltiples enfoques. De hecho es una de las bacterias más estudiadas en el nivel molecular y el genoma de varias cepas ha sido secuenciado. Esta bacteria representa, pues, un modelo fascinante que nos permite estudiar desde problemas básicos de su biología y evolución como abordar aspectos de interés biotecnológico y médico (www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/).

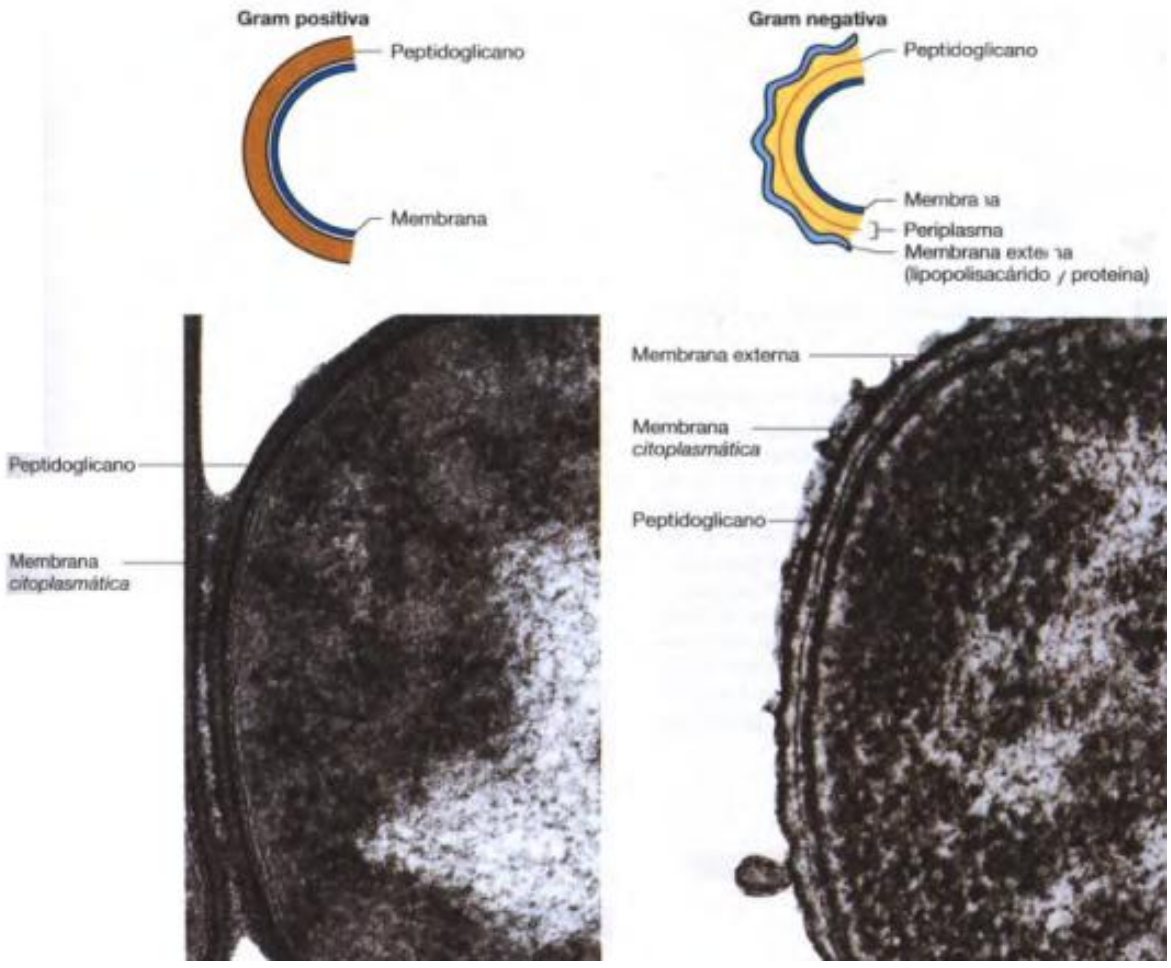

Fig. 1 Paredes celulares de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Madigan *et al*., 2003).

MARCO TEÓRICO

Pseudomonas

Dentro del dominio Bacteria la división Proteobacteria es el phylum más amplio y diverso, son bacterias Gram negativas, con una gran diversidad metabólica y representan la mayoría de las bacterias con importancia clínica industrial o agrícola. Está formado por 5 grupos que han sido denominados por las letras griegas alfa, beta, gamma, delta y épsilon. En el grupo gamma se encuentra el género *Pseudomonas* que son bacilos rectos o curvados, aerobios que crecen a pH neutro en un rango mesofílico de temperatura (Madigan *et al*., 2003).

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y en situaciones específicas tienen un comportamiento patógeno. Por lo tanto, *Pseudomonas* puede ocupar prácticamente cualquier nicho ecológico incluyendo hospederos vivos tales como organismos unicelulares, plantas, insectos y animales incluyendo al hombre (Ramos y Levesque, 2004).

Es un género muy diverso son positivos a la prueba de la catalasa también normalmente a la oxidasa, y son raramente inmóviles. Las células pueden poseer un único flagelo o bastantes flagelos polares. Los flagelos laterales son raros. Miembros de este género son muy adaptables a diferentes substratos de carbono y nitrógeno, así como a mínimas cantidades de compuestos orgánicos. Frecuentemente dominan en ambientes aerobios, no pueden crecer en ausencia de oxígeno a menos que haya un útil aceptor de electrones como el nitrato; además están presentes en un intervalo limitado de substratos de carbono orgánico para su utilización (Cullimore, 2000).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo recto o ligeramente curvo, mide de 0.5 a 0.8 µm x 1.5 a 4 µm y suele presentarse en forma individual, aunque ocasionalmente se le puede observar en pares o en cadenas cortas (Fig. 2). Posee un flagelo polar único que le confiere una gran movilidad, la cual aumenta en algunas cepas en las que se evidencian hasta tres flagelos polares; esta especie no es capsulada ni esporulada y en frotis teñidos es indiferenciable de las enterobacterias (Fernández, 1998), crece con facilidad en diversos medios y produce en ocasiones un olor dulce y forma colonias lisas redondas (Valdez, 1998).

Fig. 2 Bacilos de *Pseudomonas aeruginosa* (www.pseudomonas.com).

P. aeruginosa tiene tres formas principales de movilidad en función de la viscosidad del medio. *P. aeruginosa* utiliza su único flagelo polar para nadar en medios acuosos y en bajas concentraciones de agar. La bacteria también posee pili tipo IV para realizar la motilidad por contracción sobre superficies sólidas o interfaces. Además de la natación y las contracciones, se ha observado recientemente la motilidad de swarming en superficies semisólidas o viscosas. Las bacterias swarmer se diferencian en que son alargadas e hiperflageladas con dos flagelos polares. Esta forma de movilidad requiere los flagelos, los pili tipo IV y la producción de biosurfactante (Yeung *et al*., 2011).

P. aeruginosa produce pigmentos que difunden en el medio; el principal es la piocianina (del griego "pus azul") y corresponde a una fenacina no fluorescente de color azul-verdoso con pH neutro o ligeramente alcalino; otro pigmento es la pioverdina (fluoresceína) que es de color amarillo o amarillo-verdoso. Cabe señalar que la piocianina sólo es producida por este tipo de bacterias (Fernández, 1998).

Pseudomonas utiliza eficazmente una amplia gama de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y nitrógeno (Yeung *et al*., 2011). Cuando el oxígeno no está disponible, una alternativa como aceptor de electrones incluye el nitrato, nitrito o el óxido nitroso. En condiciones anoxigénicas la arginina puede ser catabolizada por fosforilación en el nivel de sustrato y servir como fuente de energía para el crecimiento anaerobio (Filiatrault *et al*., 2006).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ambiental que puede ser asilada de muchos hábitats diferentes, incluyendo el agua y el suelo, pero es también un patógeno oportunista que causa serias infecciones nosocomiales (Soberón-Chávez *et al*., 2005a). Es muy hábil para causar infecciones en muchos tipos de hospederos como insectos tales como *Drosphila melanogastes*, plantas como en *Arabidopsis thalliana* y animales por ejemplo *Caernorhabdtis elegans*, incluyendo al hombre (Delgado, 2009).

Pseudomonas aeruginosa es un importante patógeno oportunista humano que es responsable de numerosos infecciones agudas y crónicas, presenta un problemas considerable para los pacientes con quemaduras graves, fibrosis quística, y otros estados de inmunodeficiencia, esta bacteria Gram-negativa es el patógeno predominante en la fibrosis quística, ya que induce graves inflamaciones que destruyen el tejido huésped sano (Yeung *et al*., 2011) y es la principal causa de mortalidad en estos individuos (Filiatrault *et al*., 2006).

Las infecciones por *P. aeruginosa* son particularmente difíciles de tratar debido a la resistencias intrínseca de la bacteria a un amplio espectro de agentes antimicrobianos y a su repertorio de factores de virulencia (Yeung *et al*., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que en el huésped infectado, las bacterias residen en biofilms, que son también muy resistentes al tratamiento con antibióticos. Por estas razones, la identificación de nuevos objetivos para la terapia se ha vuelto extremadamente importante (Filiatrault *et al*., 2006).

La cepa PAO1 tiene un cromosoma circular con un tamaño de 6 264 403 nucleótidos. Su contenido de guanina-citosina (G+C) es alto, ya que cuenta con 66.7% de éstos dos nucleótidos respecto al total (www.pseudomonas.com).

Factores de virulencia

Un patógeno debe tener la capacidad de reconocer a su huésped específico, asociarse con él, explotar sus reservas de nutrientes y combatir sus respuestas de defensa. Para realizar estas tareas, los patógenos utilizan un extenso arsenal de factores relacionados con la virulencia. En *P. aeruginosa* la comprensión de como infecta es sólo rudimentario aún queda mucho por aprender acerca de los agentes infecciosos individuales esenciales para la patogenecidad y el mecanismo por el cual estos elementos trabajan juntos durante la infección (Rahme *et al*., 2000). Aunque ya han sido identificados los genes correspondientes a una gran variedad de estas causas de virulencia o los genes que regulan la expresión de estos agentes (Rahme *et al*., 1997).

El proceso de infección de *P. aeruginosa* está mediada por un conjunto de factores de virulencia asociados con las células y productos secretados (Prithiviraj *et al*., 2005). Los asociados a la célula incluyen pili, flagelos, lipopolisacárido, un sistema de secreción tipo lll y alginato. Los productos secretados incluyen toxinas de bajo peso molecular, tales como fenacinas, ramnolípidos, proteasas y fosfolipasas. Además de proteínas necesarias para la expresión o la secreción de estas moléculas, a menudo en respuesta a determinados estímulos ambientales (Choi *et al*., 2002).

La síntesis de varios factores de virulencia extracelulares de *P. aeruginosa* son regulados por los estímulos ambientales y nutricionales (Rahme *et al*., 2000). La producción del biosurfactante

ramnolípido por *P. aeruginosa* es modulada por el carbono y las fuentes de fosforo disponible. Del mismo modo, la inducción del sistema de secreción tipo lll, un factor clave de infección, puede ser regulada por el nivel de calcio presente además muchos de estos factores están regulados por sistema sensor de quórum (Palmer *et al*., 2005).

Sistema sensor de quórum

Se ha demostrado que muchas bacterias se comunican mediante un proceso conocido como respuesta sensora de quórum para coordinar el comportamiento de la población en respuesta a señales ambientales. Pequeñas moléculas, denominadas autoinductoras, son producidas por la célula bacteriana y se acumulan en el medio ambiente en una alta densidad de población. Una vez que el nivel umbral intracelular de un autoinductor se alcanza, la molécula autoinductora se une a su proteína reguladora transcripcional para activar o reprimir los genes blancos (Fig. 3). Este comportamiento ha sido implicado en la regulación del comportamiento celular y de virulencia (Wagner *et al*., 2003).

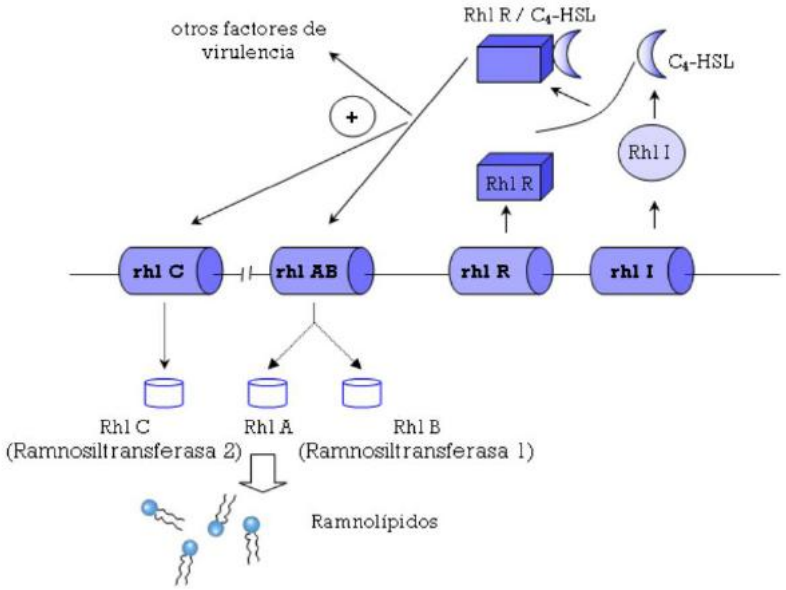

Fig. 3 Sistema sensor de quórum *rhlR.* El sistema *lasRI* (no mostrado) regula a *rhlR* que a su vez regula la expresión de genes involucrados en factores de virulencia entre ellos los ramnolípidos (Sánchez, 2010).

P. aeruginosa posee una respuesta sensora de quórum, con dos sistemas completos que han sido identificados, *lasRI* y *rhlRI.* Estos sistemas están entrelazados de una manera jerárquica, el sistema de *lasR* controla a el sistema *rhlR,* tanto en nivel transcripcional como postraduccional (Wagner *et al*., 2003). La cascada sensora de quórum de *P. aeruginosa* está mediada por autoinductores del tipo homoserin lactonas que son sintetizadas por los productos de los genes *lasI* y *rhlI*. La cascada regulatoria es como sigue: la homoserin lactona sintetizada por LasI se une al producto de *lasR* activándolo por lo que activa la expresión de varios genes entre ellos *rhlR* y *rhlI*, RhlI produce una

homoserina lactona que se une al producto del gen *rhlR* activando la expresión de una variedad de exoproductos relevantes para la patogénesis de *P. aeruginosa; entre ellos activa* la expresión de los ramnolípidos (Rahme *et al*., 2000).

Biosurfactantes

Los surfactantes son compuestos anfifílicos que contienen varios sitios hidrófilos y lipófilos. Debido a su naturaleza dual, los surfactantes tienden a reducir la tensión superficial y estabilizar nuevas superficies creadas, pueden ser derivados tanto químicamente (surfactantes químicos o surfactantes sintéticos) como de fuentes biológicas (biosurfactantes), es decir, de una planta, animal o microorganismo, pero este término se utiliza a menudo en un sentido más amplio para incluir surfactantes sintetizados a partir de materias primas naturales (Xu *et al*., 2011).

Los surfactantes biológicos son moléculas que pueden ser producidos extracelularmente o como parte de la membrana celular de levaduras, bacterias y hongos (Fontes *et al*., 2010). Las principales funciones de los biosurfactantes incluyen solubilización, emulsificación, dispersión, espumas y la capacidad de detergente, así como actividad antimicrobiana en algunos casos (Xu *et al*., 2011).

En comparación con sus equivalentes sintetizados químicamente los biosurfactantes ramnolípidos tienes muchas ventajas, son amigables al medio ambiente, biodegradables, menos tóxicos y no son peligrosos. Tienen una mejor formación de espuma y alta selectividad. Son activos a temperaturas extremas, pH y salinidad también, y pueden ser producidos a partir de residuos industriales y de sus subproductos (Pacwa-Plociniczak *et al*., 2011). Casi todos los surfactantes que se utilizan actualmente son derivados químicos del petróleo, sin embargo, el interés en surfactantes microbianos ha ido en constante aumento (Desai y Banat, 1997). Los biosurfactantes han sido utilizados en diversas industrias solos o mezclados con otros biosurfactantes sintéticos para ofrecer características de rendimiento deseado. En la industria alimentaria, los biosurfactantes proporcionan múltiples funciones: actúan como emulsionante, agentes espumantes, estabilizantes, antioxidantes y antiadhesivos. El medio ambiente y la agricultura son las principales áreas de utilización de biosurfactantes, donde juegan un papel importante en la recuperación de suelos, recuperación de petróleo, y la eliminación de patógenos de plantas. Los biosurfactantes también han encontrado aplicaciones en detergentes, pinturas, revestimientos, cosméticos y productos farmacéuticos (Xu *et al*., 2011).

Los biosurfactantes se clasifican principalmente por su composición química y su origen microbiano. En general, su estructura incluye un resto hidrófilo compuesto de aminoácidos o péptidos, aniones o cationes, mono-, di-, o polisacáridos, y un resto hidrófobo compuesto de ácidos insaturados, o ácidos grasos; en consecuencia, las principales clases de biosurfactantes incluyen glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, surfactantes poliméricos y partículas de surfactantes (Desaia y Banat, 1997).

La mayoría de biosurfactantes conocidos son glicolípidos. Son carbohidratos en combinación con un acido alifático de larga cadena o ácidos hidroxialifáticos. Entre los glicolípidos, los más conocidos están los ramnolípidos, trehalolípidos y los soforolípidos (Desai y Banat, 1997).

Ramnolípidos.

Propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos

Son solubles en agua y en disolventes polares como metanol, cloroformo y éter etílico y en disoluciones alcalinas, y estabilizan las emulsiones de compuestos hidrofóbicos en agua como aceites, alcanos, compuestos aromáticos, petróleo o queroseno.

Los ramnolípidos poseen grupos carboxílicos ionizables que hacen que se comporten como tensoactivos aniónicos a valores de pH > 4 mientras que a pH < 2 el anillo de azúcar se degrada completamente (Sánchez, 2010).

Función de ramnolípidos

Aunque los ramnolípidos han sido ampliamente estudiados, su función natural sigue siendo muy especulativa. En realidad parecen desempeñar múltiples funciones tales como la toma de nutrientes, patogénesis y en un tipo de motilidad celular (Soberón- Chávez *et al*., 2005b), debido a sus características tensoactivas promueven la captación de sustratos hidrofóbicos, especialmente hidrocarburos tales como n-alcanos (Fig. 4) (Zhang y Miller, 1995).

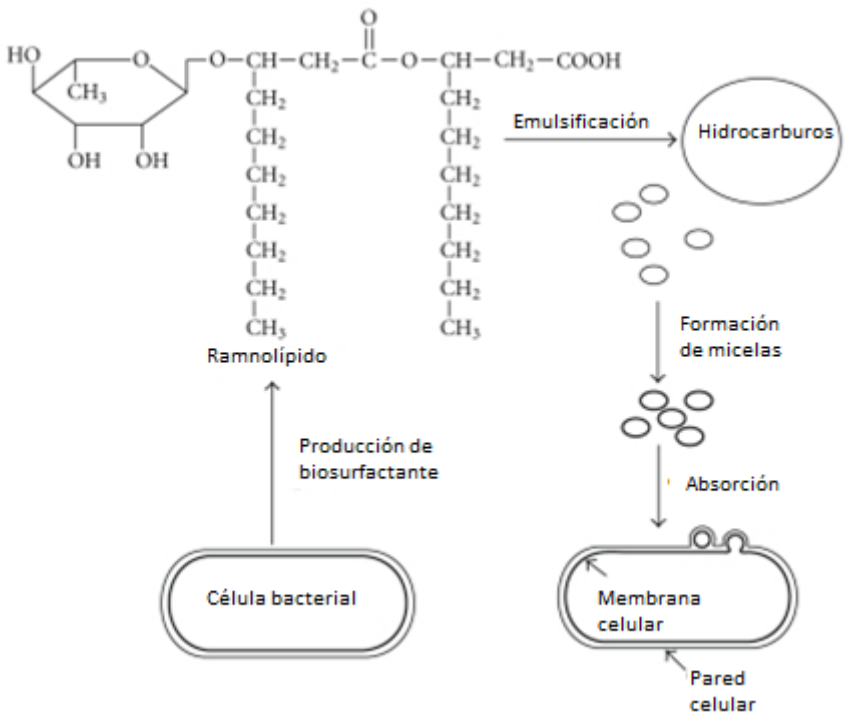

Fig. 4 Participación de los ramnolípidos en la absorción de hidrocarburos (Das y Chandran, 2011).

Los ramnolípidos muestran actividad antibacteriana contra la mayoría de Gram-positivas y también algunos Gram-negativos. Además es antiviral, antifúngico, micoplasmicida, algicida, zoosporicida, y se han reportado con actividad antiamíbico (Soberón-Chávez *et al*., 2005b).

Los ramnolípidos funcionan como un factor de virulencia (hemolisinas estables al calor) ya que están regulados por respuesta sensora de quórum, mecanismos que controla la producción de la mayoría de los factores de virulencia en *P. aeruginosa* (Smith e Iglewski, 2003).

Los dímeros de ácidos grasos (HAAs) componentes de los ramnolípidos que también tienen propiedades tensoactivas son requeridos para la motilidad de swarming (movilidad en superficies semisólidas o viscosas, que además requiere flagelos y pili tipo lV); se ha propuesto que este comportamiento está relacionado con el desarrollo de biopelículas, por lo que al ser los HAAs parte de los ramnolípidos se ha propuesto que este biosurfactante juega un papel central en la formación de las biopelículas (Soberón-Chávez *et al*., 2005b).

Estructura de los ramnolípidos

Los ramnolípidos están típicamente constituidos de un dímero de ácidos grasos 3-hidroxi (HAAs) unidos por un enlace beta glicosidico a una o dos ramnosas (Fig. 5), los ramnolípidos mas abundantes en cultivos líquidos de *Pseudomonas aeruginosa* son los formados por el dímero de ácido graso β-hidroxidecanoil β-hidroxidecanoato unido a una molécula de ramnosa (mono-ramnolípidos) o a dos moléculas de ramnosa (di-ramnolípidos) (Déziel et al, 1999).

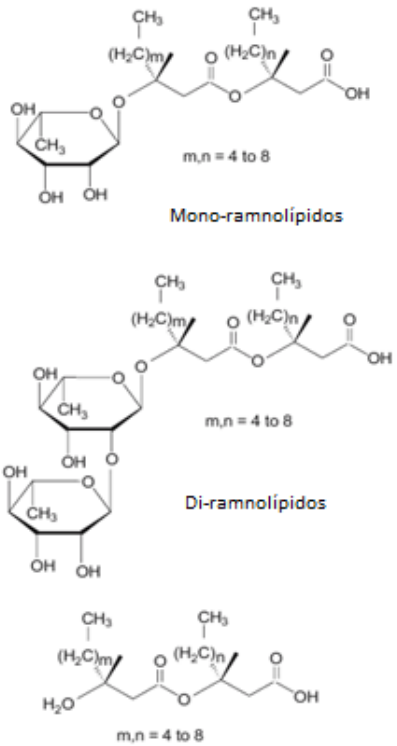

Fig. 5 Estructura química de ramnolípidos y el dímero de ácidos grasos (HAAs) (Soberón-Chávez et al, 2005b).

Aplicación biotecnológica de los ramnolípidos.

Los ramnolípidos son atractivos como una alternativa para sustituir los surfactantes sintetizados químicamente debido a su compatibilidad ambiental, por su posible producción mediante fermentación, por su gran aplicación industrial y ambiental debido a sus propiedades tensoactivas. Sin embargo, son poco competitivos con los productos químicos establecidos debido a su alto costo de producción

Los ramnolípidos son utilizados ampliamente en diversas áreas como en la producción de químicos finos, para caracterizar superficies y capas superficiales, en la elaboración de productos cosméticos y farmacéuticos, en el tratamiento como aditivos para la remediación ambiental y como agentes de control biológico

Los ramnolípidos en particular han sido empleados en grandes cantidades como aditivos en las industrias de cosméticos y de cuidados de la salud para hacer una gran variedad de productos incluyendo liposomas y emulsiones, repelentes de insectos, antiácidos, cojinetes para el acné, productos anti-caspa, soluciones para lentes de contacto, productos para pintar y cuidar el cabello, desodorantes, productos para las uñas, lápices labiales, sombras para ojos, mascarillas, pasta dental, aclaradores dentales, antitranspirantes, condones lubricados, productos para bebes, productos para el cuidado de los pies, antisépticos, productos para afeitar, depilar y en humidificadores. Además, tienen actividad biológica como agentes de biocontrol debido a su efecto sobre plantas y plagas de éstas (Delgado, 2009).

Ruta biosintética de los ramnolípidos.

En la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* la porción lipídica y la glicídica son sintetizadas de *novo*. En la ruta biosintética de los ramnolípidos actúan como moléculas precursoras (dTP-L-ramosa) procedente de la gluconeogénesis y β-hidroxiácidos procedentes de la síntesis de *novo* de ácidos grasos. La parte hidrofóbica del glicolípido incluye la acción de RhlA que cataliza la transferencia de grupos β-hidroxialcanoilo desde la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) para dar lugar a los HAA generalmente con diez átomos de carbono.

La glucosa procedente de la gluconeogénesis tras sucesivas reacciones se produce dTP-L-ramosa y tienen lugar dos reacciones de glicosilación (Fig. 6) llevadas a cabo por dos enzimas ramnosiltransferasas específicas, RhlB o ramnosiltransferasa 1 (Rt1) y RhlC o ramnosiltransferasa 2 (Rt2) (Sánchez, 2010).

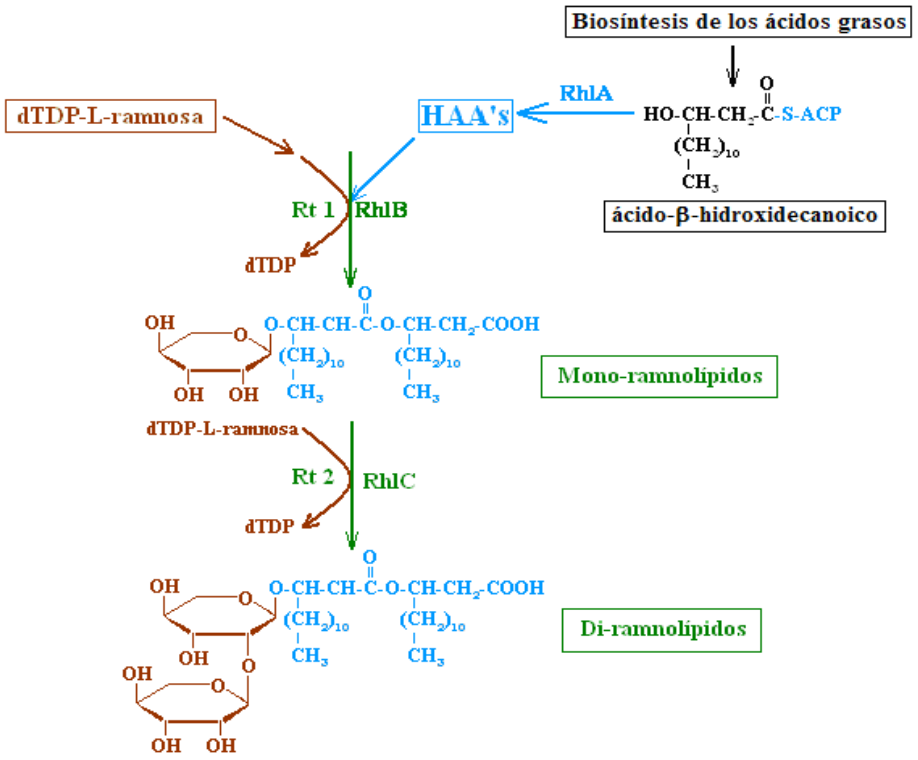

Fig. 6 Ruta de biosíntesis de los ramnolípidos (Delgado, 2009).

Los polipéptidos RhlA y RHlB están codificados en el operón *rhlAB* (Ochsner *et al*., 1994), mientras que la proteina RhlC no forma parte del operón *rhlAB*. El operón *rhlAB* y el gen *rhlC* están regulados a nivel transcripcional a través de la respuesta sensora de quórum por RhlR (Rahim *et al*., 2001).

Las enzimas involucradas en la síntesis del precursor ramnolípido dTDP-L-ramnosa están codificadas por los genes *rmlA*, *rmlB*, *rml* y *rmlD* formando el operon *rmlBDAC* (Rahim *et al*., 2000) y se ha visto que el precursor dTDP-L-ramnosa es el substrato limitante de RhlB para la producción de ramnolípidos en *Eschcerichica coli* que expresan el operon *rhlAB* (Cabrera-Valladares *et al*., 2006).

Medio ambiente y crecimiento

La producción de ramnolípidos es máxima en la fase estacionaria de crecimiento (Zhu y Rock, 2008), parece posible con muchas fuentes de carbono que soportan el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en aceite de origen vegetal como la soya, maíz, la canola y olivo proporciona la mayor productividad (Soberón- Chávez *et al.*, 2005b).

Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos y su relación con los ramnolípidos.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) compuestos de almacenamiento de energía y carbono (Fig. 7) sintetizados por una amplia variedad de especies bacterianas ya sea Gram-positivas y Gram-

negativas (Madison y Huisman, 1999), están cercanamente relacionados con los rhls ya que en sus rutas de síntesis utilizan los mismos substratos ácidos grasos (Soberón-Chavez *et al*., 2005a).

Fig. 7 Gránulos de PHAs en *Pseudomonas aeruginosa* (Timm y Steinbüchel, 1990).

Estructura de los polihidroxialcanoatos

Los PHAs son compuestos carbonados formados por polímeros lineales que se acumulan dentro de la célula llegando a niveles de hasta el 90% del peso seco celular (Fig. 8). Estos polímeros están hechos de monómeros de ácidos grasos 3-hidroxi, con carbonos que ranquean de 6 a 14 átomos teniendo una masa molecular que está entre 50 000 a 1 000 000 Da (Madison y Huisman, 1999).

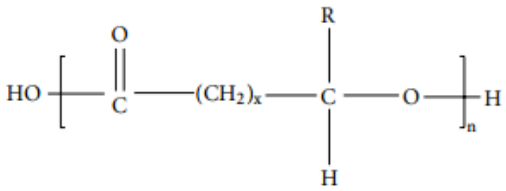

Fig. 8 Estructura química del monómero de los polihidroxialcanoatos; (R=C1-C13, X=1-4 y n=100-300 000) (Kabilan *et al*., 2012).

Ruta biosintética de los polihidroxialcanoatos.

En *Pseudomonas aeruginosa* los intermediarios 3-hidroxi unidos a la proteína portadora de grupo acilo (ACP) producto de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, son los sustratos de PhaG, una transacilasa que realiza la transferencia del grupo ACP a la coenzima A (CoA), después el producto es tomado por PhaC, enzima encargada de la polimerización que genera los PHAs (Fig. 9) (Fiedler et al, 2000). La composición de los PHA depende de la PHA sintasa, la fuente de carbono y la ruta metabólica. Cuando se utiliza como única fuente de carbono ácidos graso de longitud de cadena media la oxidación es la principal ruta, mientras que cuando se utiliza fuentes no relacionadas de carbono como son la fructosa, glucosa o acetato la síntesis de *novo* de ácidos grasos es la principal ruta (Huijberts *et al*., 1999).

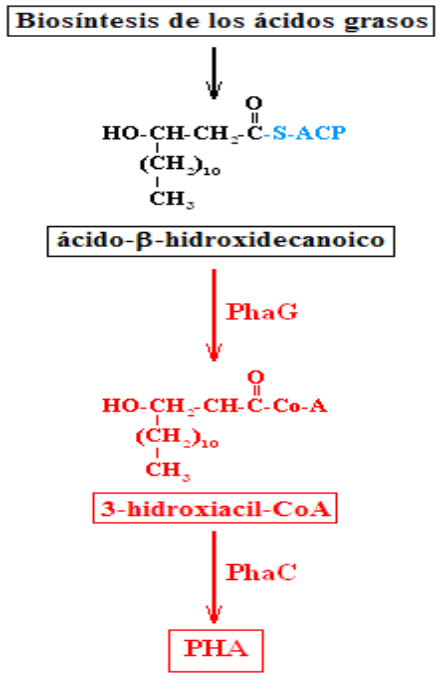

Fig. 9 Ruta de biosíntesis de los polihidroxialcanoatos (Delgado, 2009).

Aplicación biotecnológica de los polihidroxialcanoatos

Los PHAs son de importancia biotecnológica ya que pueden ser usados para producir plásticos biodegradables y así sustituir los polímeros petroquímicos (Fig. 10). También pueden ser utilizados como fuente de pequeñas moléculas por su fácil hidrólisis obteniendo monómeros que se pueden convertir en moléculas con aplicaciones potenciales como por ejemplo en la producción de solventes biodegradables, además que su costo de producción se puede disminuir ya que se puede utilizar recursos renovables derivados de la agricultura para ser producidos (Madison y Huisman, 1999).

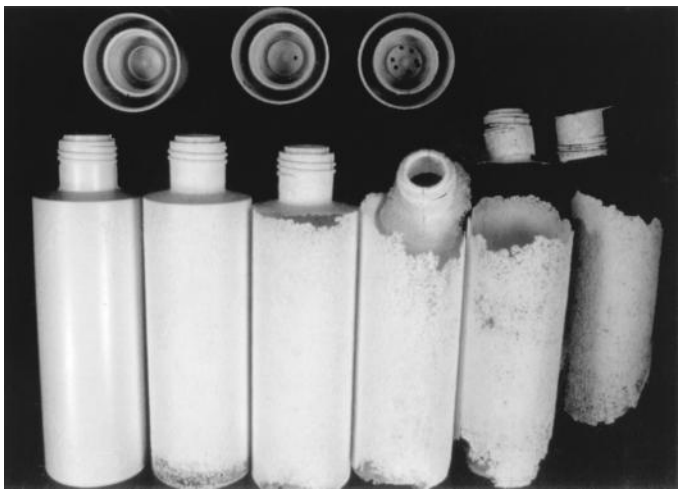

Fig. 10 Plásticos biodegradables generados a partir de polihidroxialacanoatos (Madison y Huisman, 1999).

Antecedentes inmediatos

Aunque RhlA es un paso necesario en la formación de la fracción lipídica de los ramnolípidos, el rol bioquímico preciso del producto del gen *rhlA* sigue sin estar claro (Zhu y Rock, 2008).

Se ha observado que en una *rhlB* mutante de *P. aeruginosa* produce HAAs libres, mientras que una *rhlA* mutante no lo hace, indicando que la enzima está involucrada en la síntesis de estos compuestos y que junto con los ramnolipidos son liberados al medio de cultivo mostrando también propiedades tensoactivas (Déziel *et al*., 2003; Lépine *et at*., 2002).

En investigaciones previas se propuso que los substratos de RhlA son hidroxiácidos grasos unidos a ACP y sus productos son dímeros de hidroxiácidos grasos unidos a CoA, los cuales son los precursores HAAs. Es decir se propuso que RhlA es el responsable de la síntesis del ácido graso unido a CoA, que es a su vez es un HAAs y precursor de los ramnolípidos. Este rol propuesto de RhlA está basado en su homología con PhaG enzima involucrada en la síntesis de PHAs que convierte ácidos grasos unidos a ACP a derivados unidos a CoA (Déziel *et al*., 2003).

En una investigación anterior cuyo objetivo fue producir monoramnolípidos en *E.coli*, expresando el operon *rhlABRI* y los genes involucrados en la síntesis del precursor ramnosa, se confirmó que el producto de la actividad enzimática de RhlA es el dímero de ácido graso. De igual manera se demostró que la expresión de *rhlABRI* en *E.coli* permite la expresión de los mismos ramnolípidos y HAAs observados en *P. aeruginosa,* indicando que RhlA es la enzima responsable para la síntesis de HAAs y de la parte ácido graso de los ramnolípidos, además que RhlA es la responsable del tipo de ácido graso que será incorporado en los HAAs y no la abundancia relativa de ácidos grasos en la célula.

También se determinó que RhlAB cataliza la síntesis de ramnolípidos en *E.coli* a partir de glucosa o ácido oleico como única fuente de carbono, sugiriendo que RhlAB Puede usar dímeros grasos unidos a ACP como a CoA en la producción de ramnolípidos.

En otro estudio previo se reportó que RhlA no solo juega un rol en la síntesis del biosurfactante ramnolípidos sino también en la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) (Soberón-Chavez *et al*., 2005a).

Se encontró que existe una relación metabólica cercana en la síntesis de ramnolípidos y PHAs en *P. aeruginosa* ya que en ambas rutas utilizan los mismos derivados ácidos grasos como precursores (Fig. 11) (Rehm *et al*., 2001).

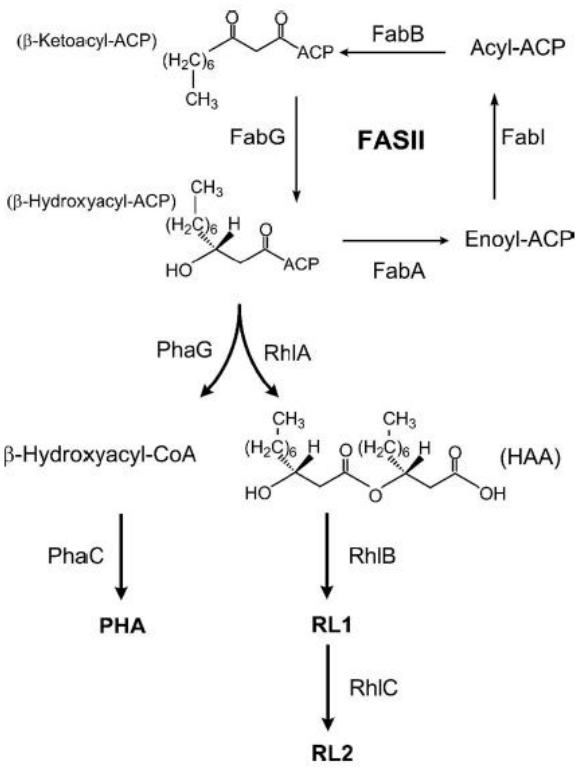

Fig. 11 Relación metabólica entre la ruta de síntesis de los ramnolípidos y polihdroxialcanoatos. Ambas rutas utilizan el mismo intermediario graso (Zhu y Rock, 2008).

Al considerar la relación anterior descrita en la síntesis de ramnolípidos y PHAs, se reportó que RhlA puede participar en la síntesis de un precursor común de estos compuestos y propusieron que la enzima RhlA tiene la actividad catalítica de formar dímeros de ácidos grasos β-hidroxi unidos a CoA y dímeros de ácidos grasos β-hidroxi unidos a ACP que pueden ser usados por RhlB para formar mono-ramnolípidos. Además se sugiere que los dímeros ácidos grasos sintetizados por RhlA pueden ser usados como substratos para producir PHAs (Soberón-Chavez *et al*., 2005b).

En este reporte se dice además que la expresión del operón *rhlAB* en un plásmido podría llevar a una alta producción de ramnollípidos o PHAs dependiendo de la cepa de *P. aeruginosa* que se utilice (una cepa silvestre, o una mutante en el gen *rhlA* respectivamente). A partir de lo anterior sugieren que el flujo de las reacciones que conducen a los 3 productos que dependen de la actividad de la enzima RhlA (HAAs, rhls y PHAs) está determinado por la actividad de las enzimas que usan los dimeros de ácidos grasos β-hidroxi unidos a CoA o ACP como substrato y a la relativa concentración de estos metabolitos.

Los datos mostrados en esta sección nos permiten tener un mejor entendimiento de la función que tiene la enzima RhlA en la producción de ramnolípidos y del papel central en la ruta metabólica de este biosurfactante.

JUSTIFICACIÓN

Los biosurfactantes ramnolípidos tienen ventajas como son baja irritabilidad, compatibilidad con la piel, posible producción por fermentación y compatibilidad ambiental comparados con los surfactantes de origen químico. Con base en el gran potencial que los biosurfactantes ramnolípidos tienen en aplicaciones industriales y en el medio ambiente como en remediación de suelos contaminados por hidrocarburos y metales pesados, es importante entender de forma precisa las rutas de biosíntesis en *Pseudomonas* que permitan un aumento en la producción con el fin de poder construir por ingeniería genética cepas eficientes en la síntesis de estas moléculas, y así puedan ser utilizados a gran escala y competir con los surfactantes de origen químico. Así como la posible relación de su ruta biosintética con otras rutas de biosíntesis de moléculas con potencial biotecnológico como los PHAs.

Se ha reportado que las rutas de síntesis de los rhls y PHAs están cercanamente relacionadas, ya que en ambas se utilizan los mismos substratos ácidos grasos; además, en una investigación en la que aumentaron la cantidad de ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa* al sobreexpresar las enzimas RhlA y RhlB se propuso que los dímeros de ácidos grasos producto de RhlA también pueden ser utilizados por las enzimas involucradas en la síntesis de PHAs. Por último aunque se ha identificado que RhlA forma los HAAs no se saben cuál es su papel bioquímico preciso, se ha propuesto que debido a su homología con PhaG, también tiene actividad transacilasa.

Con estos antecedentes se generan los objetivos de este trabajo que son estudiar el efecto que tiene la sobreexpresión únicamente de la enzima RhlA en la producción de rhls proponiendo que habrá un aumento de rhls indicando que la cantidad de esta enzima es limitante en la abundancia de los rhls, estudiar el efecto que tiene la sobreexpresión de la enzima RhlA en la síntesis de PHAs esperando un aumento de estos lo cual indicaría que la enzima RhlA puede participar en su ruta de síntesis y estudiar el efecto que tiene la sobreexpresión de la enzima RhlA en la síntesis de rhls y PHAs en una mutante *phaG* esperando que RhlA pueda complementar la función de la enzima PhaG y así indicar que tiene capacidad transacilasa.

HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Ya que RhlA tiene un papel central en la producción de ramnolípidos (rhls) debido a que es la primera enzima de la ruta de síntesis de estas moléculas, responsable de formar los dímeros de ácidos grasos (HAAs) que forman la parte acil de ellas, se propone que al sobreexpresar a RhlA en *Pseudomonas aeruginosa* habrá una mayor abundancia de su producto, los HAAs, teniendo más sustrato que podrá ser llevado a la ruta de síntesis aumentando los niveles del biosurfactante, indicando que la abundancia de la enzima se relaciona con un aumento o disminución en la cantidad de los rhls, es decir es limitante en la producción. Además, debido a que los HAAs están formados por ácidos grasos que sirven como substrato para la síntesis de los PHAs, se propone que la enzima puede participar en la ruta de síntesis de estos compuestos.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto de RhlA en la producción de ramnolípidos y polihidroxialcanoatos sobreproduciendo esta enzima en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar el gen estructural *rhlA* en el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T.

- Expresar la enzima RhlA a diferentes concentraciones de arabinosa (0, 0.1 y 1 %) en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en medio PPGAS a 37°C por 24 horas y cuantificar la producción de ramnolípidos y polihidroxialcanoatos.

- Expresar la enzima RhlA a diferentes concentraciones de arabinosa (0, 0.1 y 1 %) en *Pseudomonas aeruginosa* y en una mutante *phaG* en medio PPGAS a 37°C por 24 horas y cuantificar la producción de ramnolípidos y polihidroxialcanoatos.

METODOLOGÍA

Todos los kits mencionados se usaron bajo las recomendaciones del proveedor.

Diseño de oligonucleótidos para amplificación del gen *rhlA*

Se diseñó dos oligonucleótidos o primers (ver apéndice) con el programa FastPCR que se unen en el inicio y término del gen estructural *rhlA* (oligonucleótido directo y oligonucleótido reverso) que contiene adyacentes al codón de inicio y codón de término los sitios de restricción (BspHl y HindIII respectivamente), se amplificó el gen *rhlA* por PCR y digirió con las mismas enzimas de restricción al vector de expresión y al gen *rhlA* amplificado y así se ligó los productos de digestión.

Amplificación del gen *rhlA* y ligación en el vector pTZ57R/T

Se amplificó el gen estructural *rhlA* con la enzima phusion hot start (FINNZYMES) bajo las recomendaciones del proveedor se usó como molde DNA cromosomal de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 BW, el producto de PCR se limpio usando el kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" se ligó con el vector de clonación pTZ57R/T marca fermentas. Se transformó el plásmido **pTZ-rhlA** usando el método de transformación química en *E. coli*.

Purificación de plásmidos e identificación del vector PTZ57R/T con *rhlA* clonado

Se tomó clonas (colonias) de la placa con células trasformadas, se cultivó en 15 ml de medio LB y se dejó toda la noche a 37°C y a 220 RPM (revoluciones por minuto). Después de 12 hrs se purificó los plásmidos de cada colonia seleccionada por el kit "Bench Protocol: QIApreq Spin Miniprep Kit". Se realizó un mapa de restricción digiriendo a los plásmidos con HindIII que corta una sola vez en el vector unido al gen y así se identificó los plásmidos que contienen a *rhlA* por un patrón de bandeo distinguible en gel en base al tamaño del vector unido al gen que es de 3774 nucleótidos (pTZ57 R/T tiene 2886 nucleótidos y *rhlA* tiene 888) con una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de digestión.

Ya que se identificó los plásmidos purificados de las clonas seleccionadas que tenían a *rhlA* se eligió uno de estos plásmidos y secuenció al Instituto de Biotecnología de la UNAM, a dicha secuencia se realizó un alineamiento con el gen *rhlA* de PAO1 silvestre para observar si no existía mutaciones en *rhlA* clonado en el plásmido.

Subclonación de pTZ-*rhlA* al vector de expresión pHERD20T

Se transformó el plásmido pTZ-*rhlA* usando el método de transformación química a una cepa de *E. coli* que no metila ya que era necesario tener el DNA no metilado para poder liberar el fragmento ya que la enzima BspHl es sensible a metilación.

Se purificó el plásmido pTZ-*rhlA* con el kit Miniprep QUIAGEN, se realizó una digestión con las enzimas de restricción BspHI y HindIII que reconocen las secuencias adyacentes a *rhlA* y se clono en los sitios NcoI y HindIII del vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T.

Para corroborar que la clonación fue exitosa se realizó un patrón con la enzima HindIII utilizando como control el vector pHERD20T previamente digerido con la misma enzima de restricción. Y se verificó nuevamente que no hubiera ninguna mutación o cambio mandando a secuenciar el plásmido pHER20T-*rhlA* y haciendo un alineamiento con el genoma de PAO1.

Transformación de pHERD20T-*rhlA* a *Pseudomnas aeruginosa* PAO1 BW y *Pseudomnas aeruginosa* mutante *phaG*. Cuantificación de ramnolípidos y polihidroxialcanoatos

Ya comprobado que los plásmidos purificados de la clona seleccionada tenían el gen *rhlA* sin ninguna mutación se transformó a células de *P. aeruginosa* PAO1 BW y *P. aeruginosa* mutante *phaG* usando el método de transformación química y se realizó una curva de expresión con 0, 0.1 y 1% de arabinosa en medio PPGAS a 37°C durante 24 horas y se cuantificaron los ramnolípidos y polihdroxialcanoatos (Apéndice).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A todos los datos se les realizo los siguientes análisis estadísticos: Test de Levene , ANOVA y test de Tukey en el paquete MATLAB 7.11.0

Efecto de la sobreexpresión de RhlA en la producción de ramnolípidos.

Para conocer si la arabinosa afecta en la cuantificación de los rhls, se midió la cantidad del biosurfactante en el control PAO1 BW y en PAO1 BW con pHERD20T, ambos con 0, 0.1 y 1% de arabinosa.

Los resultados mostrados en la grafica (fig. 12) indican que a 0 y 0.1% de inducción de arabinosa no hay cambio en la producción de rhls, pero a 1% hay un aumento en la detección estadísticamente significativo tanto en la PAO1 sin pHERD20T ($F_{2,7}$=25.4, P<0.01) como en la PAO1 con pHERD20T ($F_{2,8}$=51.92, P<0.01), mostrando que a este porcentaje de arabinosa sí hay interferencia en la medición (se detectan los ramnolípidos por la presencia de azúcares reductores después de la hidrólisis) y por lo tanto no es un valor fiable.

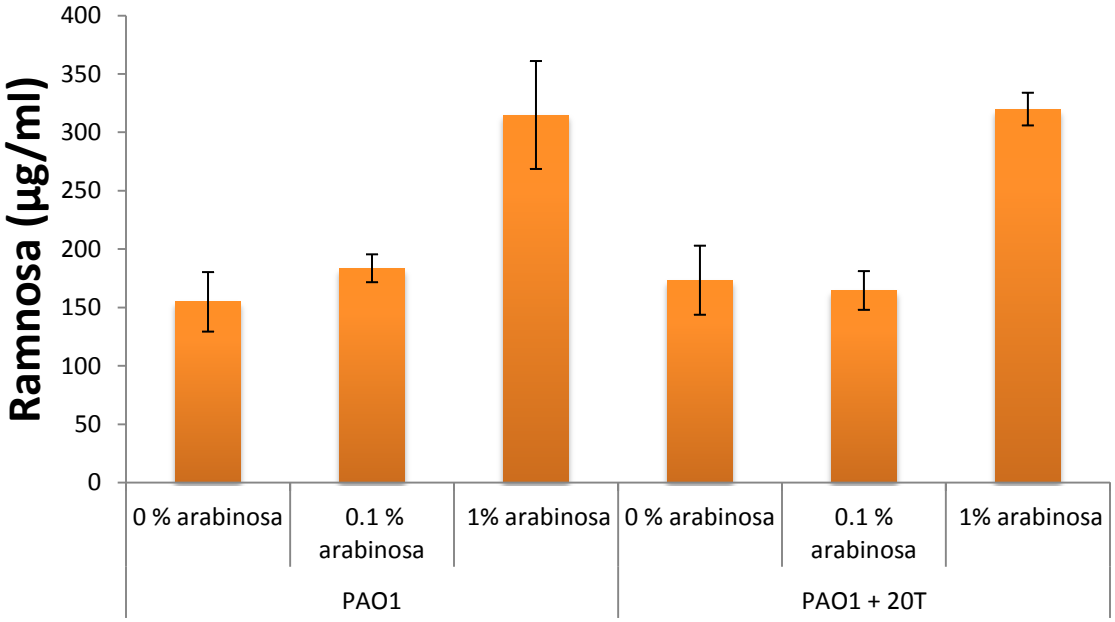

Fig. 12 Producción de ramnolípidos en los controles de *P. aeruginosa* PAO1 BW y en PAO1 BW con el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T ambos con 0, 0.1 y 1% de arabinosa en medio PPGAS, 24hrs a 37 °C.

Para saber si al aumentar la enzima RhlA incrementa la síntesis de rhls se midieron los niveles de producción del biosurfactante en el control PAO1 BW y en PAO1 BW transformado con el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T que lleva el gen clonado *rhlA* sin inducir (0 % de arabinosa) e induciendo la síntesis de RhlA a 0.1%.

En los resultados obtenidos que se observan en la Fig. 13 se muestra que a 0% de arabinosa no hay diferencia en la cantidad de rhls con respecto al control, mientras que a 0.1% los niveles de rhls disminuyen en un 61% siendo este grupo significativamente menor a los demás ($F_{2,7}$=13.4, P<0.01). Esto indica que una mayor cantidad de RhlA no aumenta la síntesis de rhls debido probablemente a que el dímero de ácidos grasos (HAAs) sintetizado por RhlA se está dirigiendo a la ruta de los PHAs esto basándose en lo que Soberón-Chavez et al, 2005a ha sugerido que los HAAs producto de la enzima RhlA son un precursor común de los rhls y PHAs explicando así la disminución en la cantidad del biosurfactante.

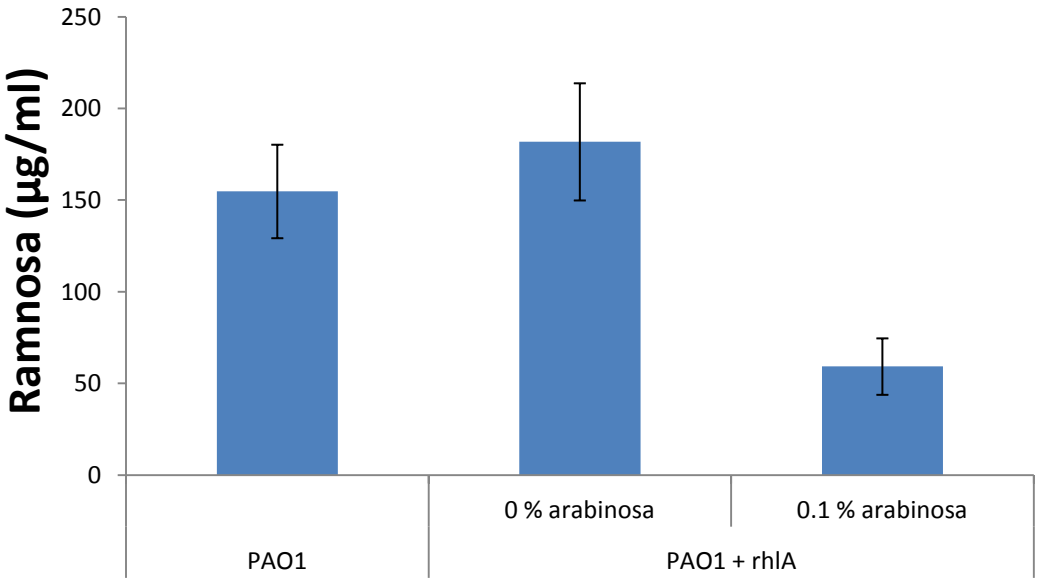

Fig. 13 Producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* PAO1 BW como control y en PAO1 BW con el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T con el gen *rhlA* a 0, 0.1% de arabinosa en medio PPGAS, 24hrs a 37 °C.

Efecto de la sobreexpresión de RhlA en la producción de polidroxialcanoatos.

Ya que encontramos una disminución en la producción de rhls a 0.1% de inducción de la cepa PAO1 BW que contiene el plásmido pHERD20T-*rhlA* y teniendo como antecedente que quizá el producto de la enzima RhlA los HAAs se puede dirigir hacia la ruta de los PHAs se procedió a medir a estos compuestos en las mismas condiciones.

De acuerdo con la Fig. 14 a 0% de arabinosa no hay aumento en los PHAS, mientras que a 0.1% los PHAs son mayores ($F_{2,6}$=10.1, P<0.05) aumentando en un 60% más con respecto a PAO1. Esto indica que probablemente los HAAs producidos al sobreexpresar a RhlA son tomados en la ruta de síntesis de los PHAs.

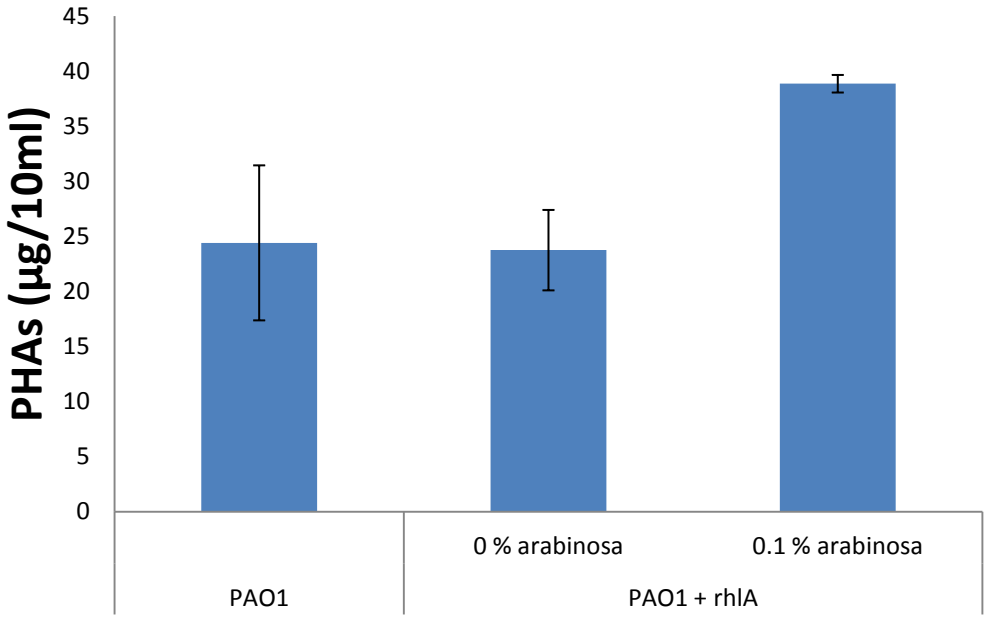

Fig. 14 Producción de polihidroxialcanoatos en *P. aeruginosa* PAO1 BW como control y en PAO1 BW con el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T con el gen *rhlA* clonado con 0 y 0.1% de arabinosa en medio PPGAS, 24hrs a 37 °C.

Efecto de la sobreexpresión de RhlA en una mutante *phaG* en la producción de ramnolípidos.

Al ver que quizá los HAAs formados por la sobreexpresión de RHlA se dirigen a los PHAs ya que hay un aumento de estos polimeros, surge la pregunta de si la enzima RhlA puede tener una función de transacilación, ya que se ha sugerido que tiene funciones similares a PhaG (enzima con función transacilasa de la ruta de los PHAs) debido a su alta homología estructural. Para responder esa interrogante se cuantificó primero los rhls en una mutante *phaG,* así como en la misma mutante *phaG* transformada con pHER20T-*rhlA* sin inducción (0% de arabinosa) e inducido a 0.1 de arabinosa.

Con respecto a los niveles de los rhls en la grafica de la fig. 15 se observa que la mutante *phaG* produce las mismas concentraciones que la PAO1 BW estos datos se corroboran con los resultados de Choi et al, 2011, ya que también encontraron que no hay diferencia en la cantidad del biosurfactante en una PAO1 y en una mutante *phaG.* Sin embargo, en este trabajo encontramos que a 0.1% de inducción disminuyó la producción de rhls en un 66% siendo estadísticamente significativo ($F_{3,9}$=21.2, P<0.01). Estos resultados indican que quizá otra vez el exceso de HAAs se está dirigiendo hacia la ruta de PHAs ya que se observó el mismo comportamiento en los niveles de rhls al sobreexpresar RhlA en la PAO1 BW.

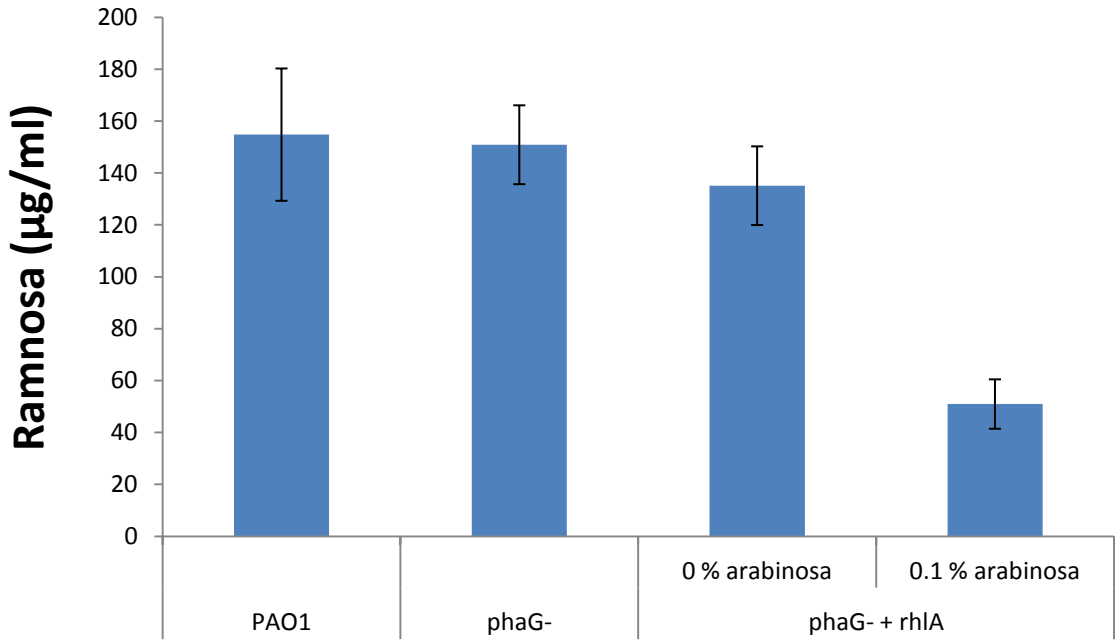

Fig. 15 Producción de ramnolípidos en los controles PAO1 BW y PAO1 mutante *phaG*, y en PAO1 mutante *phaG* con el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T con el gen *rhlA* clonado con 0, 0.1% de arabinosa en medio PPGAS, 24hrs y 37 °C.

Efecto de la sobreexpresión de RhlA en una mutante *phaG* en la producción de polihidroxialcanoatos.

Al encontrar una disminución en los rhls en la mutante *phaG* en la que se sobreexpresó a RhlA, se espera que el exceso de HAAs se estén dirigiendo hacia la ruta de los PHAs, indicando que RhlA complementa la función de la enzima phaG por lo que se procedió a medir los PHAs.

Con respecto a la producción de PHAs se observa en la Fig. 16 que hay una cantidad de PHAs en la mutante *phaG* que es significativamente menor a PAO1 BW dato que concuerda con los resultados de Choi et al, 2011. En la mutante *phaG* transformada sin inducción (0% de arabinosa) no hay diferencia con respecto a la mutante *phaG* pero a 0.1 % de inducción si hay un aumento de 3.5 veces más que es significativamente mayor respecto a los tres grupos anteriores ($F_{3,8}$=34.56, P<0.01), sugiriendo que no solo los HAAs son substrato en la ruta de los PHAs sino que la enzima RhlA tiene función de transacilasa ya que complemento a la mutante *phaG.* Es más, este resultado sugiere que los PHAs que se producen en la mutante *phaG*- son producto de la actividad de RhlA, pues en *P. putida* que no tiene una enzima con la actividad de RhlA, la mutación en *phaG* produce una falta total de producción de PHAs cuando se crece a las células con un azúcar como fuente de carbono (Fiedler et al, 2000).

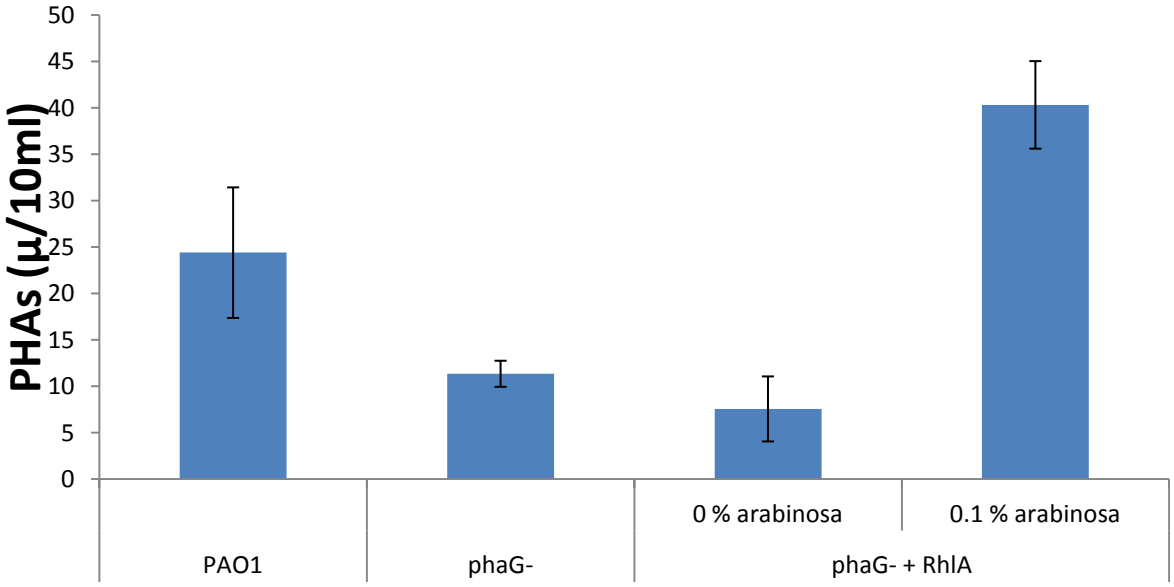

Fig. 16 Producción de polihidroxialcanoatos en los controles PAO1 y PAO1 mutante *phaG,* y en PAO1 mutante *phaG* con el vector de expresión inducible por arabinosa pHERD20T con el gen *rhlA* clonado con 0%, 0.1% de arabinosa en medio PPGAS, a 24hrs y 37 °C.

Efecto de la sobreexpresión de RhlA en la producción de mono y di-ramnolípidos

Se realizó una placa de TLC para determinar de forma cualitativa la proporción entre mono y di-ramnolípido de todas las condiciones de este trabajo. Generalmente el tipo de rhls que más predomina en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* es el diramnolípido.

En la Figura. 17 se observa que hay una mayor proporción de mono-ramnolípido al inducir a 0.1% de arabinosa la expresión de RhlA con respecto a PAO1 y la mutante *phaG.* Esto sugiere que el desbalance de las vías de producción de rhls y de PHAs por el aumento en la actividad de RhlA, afecta también la actividad de RhlC, lo que lleva a una baja en la producción de ramnolípidos totales en 0.1% de arabinosa.

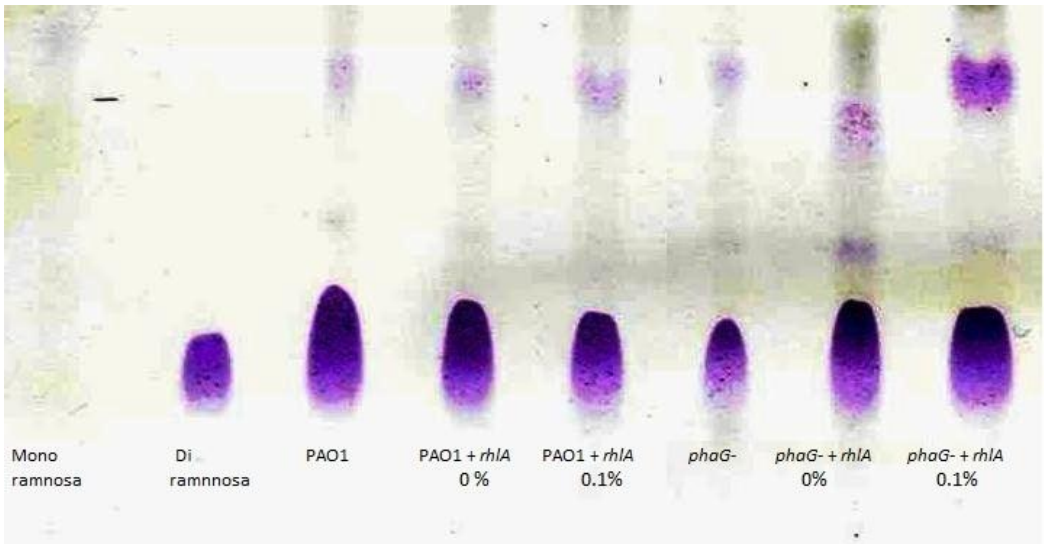

Fig. 17 Placa de TLC (Cromatografía de Placa fina) de los sobrenadantes de todas las muestras de este trabajo y sus controles una ramnosa y una di-ramnosa.

CONCLUSIONES

RhlA no parece ser la enzima limitante en la producción de ramnolípidos

Al sobreexpresar la enzima RhlA en *P. aeruginosa* PAO1 BW no aumentó la producción de ramnolípidos, lo que sugiere que no es la enzima limitante en la ruta. Sin embargo, esto no puede ser concluido totalmente debido al uso del producto de RhlA, los HAAs, en la producción de PHAs. Al contrario de lo esperado, encontramos que los niveles de producción de rhls disminuyeron con respecto al control al sobreexpresar RhlA. El resultado encontrado puede ser explicado por una o más de las razones que se mencionan a continuación: debido a que el incremento de los HAAs se dirijan a otra ruta metabólica (probablemente la de síntesis de PHAs), sean excretados de la célula o que al haber una saturación de HAAs provoquen una disminución de la actividad catalítica de RhlB o de RhlC que son las dos siguientes enzimas en la ruta de síntesis reduciendo los niveles de ramnolípidos.

RhlA participa en la producción de polihidroxialcanoatos.

Es probable que los HAAs formados al sobreexpesar a RhlA se dirijan hacia la ruta de los PHAs ya que estos aumentaron considerablemente con respeto al control, lo que indicaría que el exceso de HAAs que no fueron tomados en la ruta de síntesis de los rhls, esto a partir de la poca producción de los rhls, fueron tomados por alguna de las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de los PHAs (probablemente PhaC1, una de las PHA sintasas) mostrando que el dímero de ácidos grasos (HAAs) producto de RhlA también puede participar en la ruta de los PHAs (por estar unido a CoA).

RhlA tiene función de transacilasa

Al medir los ramnolípidos y polihidroxialcanoatos en la mutante en *phaG* (enzima de la ruta de los PHAs con función transacilasa) al sobreexpresar RhlA hay también una disminución de rhls y un aumento en los PHAs, lo que indica otra vez que los HAAs generados al inducir la enzima rhlA se están dirigiendo hacia los PHAs y que además sugiere que RhlA está realizando la función de la enzima PhaG. Lo cual indica que RhlA sintetiza sustratos que pueden ser utilizados por PhaC (la sintasa de PHAs) indicando que tiene función de transacilación. Esto es, toma como substratos ácidos grasos unidos a ACP y forma dímeros de ácidos grasos unidos a CoA (HAAs-CoA), Sin excluir que RhlA este también produciendo HAAs-ACP (Fig. 18).

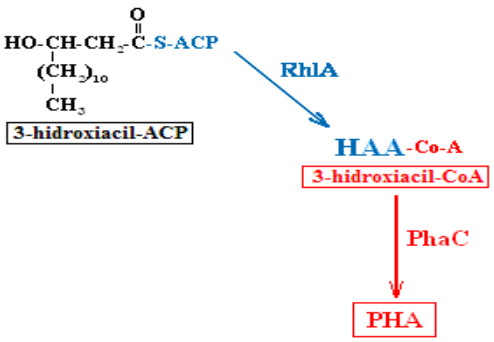

Fig. 18 RhlA participa en la producción de PHAs.

La sobreexpresión de RHlA produce más monoramnolípidos

Al realizar una placa de TLC con las muestras se observó que 0.1% de inducción la proporción de mono-rhls es mayor con respecto a PAO1 BW. Este resultado muestra que el aumento de HAAs y su utilización para producir PHAs, causa un desbalance en la vía de biosíntesis de ramnolípidos que pudiera llegar a inhibir la actividad de RhlC. La inhibición de la actividad de esta ramnosil transferasa podría contribuir en la reducción de la producción de ramnolípidos totales.

PERSPECTIVAS

Para investigaciones futuras que den seguimiento a este trabajo y permitan encontrar rutas que mejoren la producción de ramnolípidos así como la función precisa de la proteína RhlA se sugiere lo siguiente:

Sobreexpresar a la enzima RhlA en *P. putida* (que no produce rhls pero si PHAs) y en su mutante en phAG para confirmar que RhlA puede dar sustrato a la ruta de PHAs y que tiene una función de transacilasa.

Medir la producción de HAAs libres en PAO1, en su mutante *phaG* y en PAO1 junto con su mutante phaG donde se sobreexprese en forma inducible a RhlA para ver hacia donde se dirigen los HAAS.

Sobreexpresar a RhlA y RHlB juntos en *P. aeruginosa* y ver el efecto en la producción de rhls y PHAs para encontrar una ruta de ingeniería genética de sobreproducción de rhls y la relación con la ruta de PHAs.

Construir una doble mutante *rhlA* y *phaG* en *P. aeruginosa* PAO1 para corroborar que ya no produce PHAS, y en ella ver el efecto de la enzima RhlA en la síntesis de PHAs. Esto confirmaría si RhlA tiene una función de transacilasa.

Purificar la enzima RhlA y comprobar en vitro la actividad de transacilasa (dando como substratos 3-hidroxidecanoil-ACP y acetil-CoA y determinando la producción de 3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato-CoA).

.

LITERATURA CITADA

- Austin B, Priest F, 1993, Modernal bacterial taxonomy, Segunda edición, Chapman and Hall, New York, 87.
- Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F, Soberón-Chávez G, 2006, Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host, Appl Microbiol Biotechnol, 73(1):187–194.
- Choi JY, Sifri CD, Goumnerov BC, Rahme LG, Ausubel FM, Calderwood SB, 2002, Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. J Bacteriol, 184(4): 952–961.
- Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho YH, Yoon SC, 2011, Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in Pseudomonas aeruginosa: comparative ^{13}C NRM analysis of the products in wild-type and mutans, J Biotechnol, 151(1):30-42
- Cullimore DR, 2000, Practical atlas for bacterial identification, Lewis, Boca Raton, 13-15.
- Das N, Chandran P, 2011, Microbial degration of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, Biotechnol Rest Int, 2011(1): 1-13
- Delgado CLM, 2009, El papel de la proteína RhlA en la síntesis de ramnolípidos (rhl's) y polihidroxialcanoatos(PHA's) en *Pseudomonas aeruginosa,* Tesis de maestría, Facultad de Química UNAM.
- Delong EF, Pace NR, 2001, Environmental diversity of bacteria and archaea. Syst Biol, 50(4):470-478.
- Desai JD, Banat IM, 1997, Microbial production of surfactants and their commercial potential, Microbiol Mol Biol Rev, 61(1):47-64.
- Déziel E, Lépine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer OA, Villemur R, 1999, Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa strain 57RP grown on mannitol or naphthalene, Biochim Biophys Acta, 1440(2-3):244–252.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R, 2003, rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids, Microbiology, 149(8):2005–2013.
- Fernández TJ, 1998, La actual importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, México.
- Fiedler S, Steinbüchel A, Rehm BH, 2000, PhaG-mediated synthesis of poly(3 hidroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*, Appl Environ Microbiol, 66(5):2117-2124.
- Filiatrault MJ, Picardo KF, Ngai H, Passador L, Iglewski BH, 2006, Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth, Infect Immun, 74(7):4237–4245.

- Fontes GC, Amaral PF, Nele M, Coehlo MA, 2010, Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipoliytica*, J Biomed Biotechnol, 1(1):1-8.
- Huijberts, GN, De Rijk TC, De Waard P, Eggink G, 1994, 13C nuclear magnetic resonance studies of Pseudomonas putida fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. J Bacteriol, 176(6):1661–1666.
- Kabilan S, Ayyasamy M, Jayavel S, Paramasamy G, 2012, Pseudomonas sp, as a Source of Medium Chain Length Polydroxialkanoates for Controlled Drug Delivery: Perspective, Int J Microbiol,1(1) 1-10
- Lépine F, Déziel E, Milot S, Villemur R, 2002, Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures, J Mass Spectr, 37(1):41–46.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock Biología de los Microorganismos. Décima edición, Prentice Hall International, Inc. New Jersey, E.U. 2003, 23,32,75,354,368,369
- Madison LL, Huisman, GW, 1999, Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, Microbiol Mol Biol Rev 63(1):21–53.
- Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J, 1994, Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis, J Biol Chem, 269(31):19787-19795.
- Pacwa-Plociniczak M, Ptaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS, 2011, Environmental aplplicationes of biosurfactants: recent advances, Int J Mol Sci, 12(1):633-654.
- Palmer K L,Mashburn LM , Singh PK, Whiteley M, 2005, Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology, J Bacteriol, 187(15):5267–5277.
- Prithiviraj B, Bais HP, Weir T, Suresh B, Najarro EH, Dayakar BV, Schweizer HP, Vivanco JM, 2005, Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and Caenorhabditis elegans, Infect Immun, 73(9):5319–5328.
- Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB, Lam JS, 2000, Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*, Microbiology, 146(11):2803–2814.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez G, 2001, Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis, Mol Microbiol, 40(3):708–771.
- Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, Mahajan-Miklos S, Plotnikova J, Tan MW, Tsongalis J, Walendziewicz CL, Tompkins RG 2000, Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors, Proc Natl Acad Sci USA, 97 (16): 8815– 8821.

- Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB, Ausubel FM, 1997, Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors, Proc Natl Acad Sci USA, 94(24): 13245–13250.
- Ramos JL y Levesque R, 2004, Vol.4 Pseudomonas, Molecular biology of emerging isuues, Boston, 99.
- Rehm BH, Mitsky TA, Steibuchel A, 2001, Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA and rhamnolipid synthesis by Pseudomonads: Establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*, Appl Environ Microbiol, 67(7):3102–3109.
- Sánchez MM, 2010, Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolípidos biotensioactivos. Tesis de doctorado, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Murcia.
- Smith RS, Iglewski B, 2003, *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence, Curr Opin Microbiol, 6(1):56–60.
- Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramirez, Sánchez R, 2005a, The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production, J Ind Microbiol Biotechnol, 32(11-12): 675-677.
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E, 2005b, Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*, Appl Microbiol Biotechnol, 68(6):718–725.
- Timm A, Steinbüchel A, 1990, Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads, Appl Environ Microbiol , 56(11):3360-3367
- Valdez MJF, 1998, Importancia, aislamiento e identificación del género Pseudomonas en agua purificada para uso Farmacéutico, Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM. México
- Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH, 2003, Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment, J Bacteriol, 185(7):2080–2095.
- www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/ Capítulo 1 y 3
- www.pseudomonas.com/o_aerug.jsp
- Xu Q, Nakajima M, Liu Z, Shiina T, 2011, Biosurfactants for microbubble preparation and application, Int J Mol Sci, 12(1):462-475.
- Yeung AT, Bains M, Hancock RE, 2011, The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, J Bacteriol, 193(4): 918–931.
- Zhang Y, Miller RM, 1995, Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation on n-alkanes, Appl Environ Microbiol, 61(6):2247–2251.
- Zhu K, Rock CO, 2008, RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*, J Bacteriol, 190(9):3147-3154.

APENDICE

Medios de cultivo.

Medio de cultivo PPGAS

Reactivo	**Cantidad en gramos para 1 L**
Cloruro de amonio [0.02M]	1.068
Cloruro de potasio [0.02M]	1.492
Tris-HCl ó MOPS [0.12M]	18.912
Peptona 1%	10
Glucosa 0.5%	25 ml
Sulfato de magnesio [0.0016M]	1.6 ml

Medio Luria – Bertani (LB)

Reactivo	**Cantidad en gramos para 1 L**
Tryptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Bacto agar	5

Técnica para medir ramnolípidos (rhls) (Delgado, 2009)

Preparación de la muestra

1. Sembrar un inóculo de la cepa de interés en el medio apropiado y dejar toda la noche.

2. Al día siguiente subcultivar en medio de cultivo y a las condiciones que se van a determinar los rhls.

3. Tomar 1 ml de medio de cultivo

4. Centrifugar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y desechar el pellet

5. Obtener el sobrenadante y poner 333 µl en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (muestras por triplicado).

Primera extracción

6. Agregar 1 ml de éter y agitar por 30 segundos. Para mezclar perfectamente.

7. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos.

8. Cambiar la fase acuosa superior que lleva los ramnolípidos a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml y dejar destapado en la campana para permitir que se evapore el éter.

Segunda extracción

9. Agregar 1 ml de éter y agitar por 30 seg. para mezclar perfectamente.

10. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos.

11. Cambiar la fase acuosa superior que lleva los ramnolípidos al tubo de la primera extracción y dejar en la campana para permitir que se evapore el éter.

Resuspender

12. Una vez evaporado el éter, agregar 1 ml de agua destilada y agitar para resuspender los ramnolípidos.

Detección

Preparación de la solución de orcinol

Orcinol al 1.6 %.

H_2SO_4 al 60 %.

13. En un nuevo tubo, agregar 100 µl de la muestra resuspendida de ramnolípidos y agregar 900 µl de la solución de orcinol.

14. Calentar a 80°C por 30 minutos.

15. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 421 nm.

Técnica para medir polihidroxialcanoatos (PHAs) (Delgado, 2009)

Preparación de la muestra

1. Sembrar un inóculo de la cepa de interés en el medio apropiado y dejar toda la noche.

2. Al día siguiente subcultivar en medio de cultivo y a las condiciones que se van a determinar los PHAs.

3. Tomar 10 ml de medio de cultivo.

4. Centrifugar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y repetir hasta terminar los 10 ml y obtener el paquete celular o botón.

5. Añadir 1 ml de hipoclorito de sodio comercial (Clorex) al 1.8 %.

NOTA: El cloro comercial (Clorex) sin diluir está al 6 %.

6. Resuspender las células.

7. Incubar por 1 hora a la temperatura óptima de crecimiento.

8. Centrifugar y tirar el sobrenadante.

9. Resuspender el botón en 1 ml de agua ultra pura.

10. Centrifugar y tirar el sobrenadante.

11. Resuspender el botón en 1 ml de acetona.

12. Centrifugar y tirar el sobrenadante.

13. Resuspender el botón en 1 ml de etanol.

14. Centrifugar, tirar el sobrenadante y dejar secar el botón.

NOTA: El botón debe ser blanco.

15. Disolver el botón en 1-2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

16. Calentar por 10 min. a 95ºC.

NOTA: usualmente las muestras se diluyen desde 1:10 – 1:200 en ácido sulfúrico concentrado para obtener lecturas inferiores a 1 UDO.

Lectura

17. Leer en el espectrofotómetro a 235 nm.

Cálculo

Para calcular la cantidad de crotonato se emplea la fórmula $A= (E)(b)(c)$

Donde: A = Absorbancia.

E = Coeficiente de extinción del crotonato.

b = Longitud de la celda = 1cm.

c = Concentración.

Se obtiene un valor = 5.5128 ug/ml, que se multiplica por (Absorbancia)(dilución).

Oligonucleótidos diseñados para amplificación del gen rhlA

Oligo directo

5'TTGGGAGGTGTGTCATGAGGCG3' : BspHl

Oligo reverso

5'TCTTCGCAGGTCAAAGCTTCAG3': Hindlll

Plásmidos usados en este trabajo

Plásmidos	**Características**
pTZ57R/T	Clonación
pHERD20T	Clonación y expresión

Bacterias usadas en este trabajo

Bacteria	**Característica**
PAO1 BW	*Pseudomonas aeruginosa* tipo silvestre (Banco de Washington)
PAO1-*phaG*	*Pseudomonas aeruginosa* mutante *phaG*
E. coli GM	Cepa sin capacidad de metilar
E. coli cepa MC4100	Cepa derivada de *E.coli k-12*
E.coli BW25113	Cepa que no metaboliza arabinosa