

00591

8



295763

Universidad Nacional Autónoma de México



Instituto de Biotecnología

**Caracterización genética de la lipasa producida
por *Pseudomonas aeruginosa* IGB83**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Q.B. Agustino/Martínez Antonio

Cuernavaca, Mor., Agosto del 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, EN EL LABORATORIO DE LA DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM.

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, EL AUTOR RECIBIÓ UNA BECA-CRÉDITO POR PARTE DEL CONACYT, TAMBIÉN RECIBIÓ APOYO POR PARTE DE LA UNAM POR MEDIO DEL PROGRAMA DGEP.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación y compartir su conocimiento y experiencia de una manera generosa. También por todo su apoyo y amistad

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Luis Servín González, Dr. Enrique Merino Pérez, Dr. O. Tonatiuh Ramírez R., por su invaluable ayuda en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes quién fue un tutor generoso durante mis estudios de Maestría.

A los sinodales, por su tiempo y atinadas observaciones para mejorar la redacción de esta tesis y por la claridad para ancontrar nuevas preguntas.

Dra. Esperanza Martínez Romero

Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Agustín López Munguía Canales

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Rafael Vazquez Duhalt

Dr, Baltazar Becerril Luján

A mis compañeros de laboratorio que contribuyeron con un ambiente muy cordial y solidario: Rebeca, Rosalba, Naty, Katy, Cinthía, Jose, Sol, Gerardo. M., Luis G., Gerardo G., L. Gabriel, Miguel C., Daniel, Raúl y Martín.

Un agradecimiento especial a don Eduardo y doña Mary.

Índice general

Página

Resumen

I. Introducción

Estructura de las lipasas	1
Activación interfacial	3
Reacciones catalizadas por lipasas	5
Especificidad de las lipasas	6
Aplicación biotecnológica de las lipasas	7
Identificación de actividad lipolítica	10
Clasificación de las lipasas bacterianas	11
Función fisiológica de las lipasas bacterianas	13
Secreción de las lipasas bacterianas	15
Regulación de los genes que codifican para lipasas en bacterias	20

II. Antecedentes

Origen de la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IGB83	24
Caracterización bioquímica de la lipasa producida por la cepa IGB83	25

III. Justificación

26

IV. Objetivos

27

V. Métodos Experimentales

Cepas, plásmidos y medios de cultivo	28
Movilización de plásmidos	28
Cuantificación de β -galactosidasa	30
Cuantificación de proteínas	30
Cuantificación de actividad lipolítica	30
Enzimas y químicos utilizados	31
Amplificación de ADN por PCR	31
Manipulación del ADN	32
Identificación y clonación del gen <i>lipA</i> en IGB83	32

Obtención de la mutante <i>lipA</i> en IGB83	32
Construcción de la fusión transcripcional <i>lipA::lacZ</i>	33
Purificación de autoinductores de <i>P. aeruginosa</i>	33
Electroforésis en geles de poliacrílamida	33
Análisis computacional de las secuencias de ADN	34
VI. Resultados y Discusión	
Identificación del gen que codifica para la lipasa en IGB83	35
Obtención y análisis de la secuencia de nucleótidos del gen <i>lipA</i>	39
Mutagénesis del gen <i>lipA</i> en IGB83	43
Complementación de la mutación en el gen <i>lipA</i>	46
Identificación del gen que codifica para una segunda lipasa (<i>lipC</i>) en IGB83	49
Análisis de la región reguladora del gen <i>lipA</i>	50
Análisis de la regulación transcripcional del gen <i>lipA</i> en <i>P. aeruginosa</i>	53
Análisis de la fusión transcripcional <i>lipA::lacZ</i> por autoinducción	
<i>P. aeruginosa</i>	56
Análisis de la fusión transcripcional <i>lipA::lacZ</i> en <i>E. coli</i>	58
Consideraciones finales de la regulación de la lipasa A en <i>P. aeruginosa</i>	61
VII. Conclusiones	62
VIII. Perspectivas	63
IX. Referencias Bibliográficas	64
X. Artículo publicado	71

Índice de figuras

	Página
1. Estructura secundaria canónica de las enzimas α/β hidrolasas	2
2. Estructura de las lipasas del grupo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
3. Activación interfacial de enzimas lipolíticas	4
4. Reacciones catalizadas por lipasas	6
5. Secreción y plegamiento de la lipasa en <i>P. aeruginosa</i>	17
6. Resultado del alineamiento de secuencias nucleotídicas que codifican para lipasas y que fueron utilizadas como plantados	36
7. Productos de PCR obtenidos con las secuencias internas de <i>lip</i>	37
8. Fragmento de 6.5 kb en <i>P. aeruginosa</i> IGB83 donde esta <i>lipA</i>	38
9. Construcciones con el fragmento de 6.5 kb	38
10. Hibridación tipo southern con un fragmento interno de <i>lipA</i>	39
11. Análisis de los marcos de lectura en la secuencia obtenida del fragmento de 6.5 Kb de IGB83	40
12. Secuencia nucleotídica y traducción del gen <i>lipA</i>	41
13. Comparación peptídica de las lipasas producidas por diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	42
14. Mutagénesis del gen <i>lipA</i> en IGB83	44
15. Actividad lipolítica en la cepa IGB0 mutada en el gen <i>lipA</i>	45
16. Perfil de proteínas extracelulares en la cepa IGB0 mutada en el gen <i>lipA</i>	46
17. Complementación de la cepa IGB0 con el fragmento de 6.5 kb	47
18. Complementación de las cepas mutadas de PAO1 en los genes <i>lip</i> y <i>lif</i> con el fragmento de 6.5 kb de IGB83	48
19. Perfil de la actividad lipolítica en las cepas PAO1 e IGB83	48
20. Identificación de una segunda lipasa <i>lipC</i> en la cepa IGB83	49
21. Análisis de la región reguladora del gen <i>lipA</i> en IGB83	51
22. Efecto de la mutación <i>rpoN</i> en la actividad de la lipasa	52
23. Construcción de la fusión transcripcional <i>lipA::lacZ</i>	54
24. Actividad de los autoinductores semipurificados a partir de sobrenadantes de cultivos de <i>P. aeruginosa</i>	57
25. Actividad de la fusión <i>lipA::lacZ</i> en <i>P. aeruginosa</i> añadiendo la mezcla de autoinductores semipurificados	58

Abreviaturas empleadas

KD : kilodaltones	PAO1 : cepa tipo de laboratorio de <i>P. aeruginosa</i>
CMC : concentración micelar crítica	IGB83 : cepa silvestre de <i>P. aeruginosa</i> utilizada en este estudio
PPL : lipasa pancreática porcina	IGBO : cepa derivada de IGB83 mutada en el gen <i>lipA</i>
HPL : lipasa pancreática humana	sn : sustitución nucleofílica
RML : <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	pH : potencial de hidrogeniones
NaCl : cloruro de sodio	°C : grados centígrados
TC3 : tripropanoil glicerol	ee : exceso enantiomérico
Lip : lipasa de <i>Pseudomonas</i>	3-D : tres dimensiones
Lif : foldasa específica para lipasa	Dsb : proteínas formadoras del puente disulfuro
PLC : fosfolipasa C	LAF : factor de activación de la lipasa
sec : sistema de translocación en la m.i.	ATP : adenosina trifosfato
PCR : reacción en cadena de la polimerasa	LacZ : enzima β -galactosidasa
DTT : ditioneitol	LPS : lipopolisacárido
EDTA : ácido etilendiamino tetraacético	pI : punto isoeléctrico
ss : secuencia señal	PM : peso molecular
ps : peptidasa señal	UAS : secuencia de activación transcripcional en el ADN
xcp : sistema de secreción	NtrC : proteína reguladora de un sistema de dos componentes
c : citoplasma	
m.i. : membrana interna	
m.e. : membrana externa	
p : periplasma	
HBHL : N- β -hidroxibutanoil homoserina lactona	
oDHL : N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona	
LipR : regulador de la lipasa	
GacA/GacS : sistema de dos componentes	
LasR/LasI : primer sistema de quórum en <i>P. aeruginosa</i>	
RhlR/RhlI : segundo sistema de quórum en <i>P. aeruginosa</i>	
SDS : dodecil sulfato de sodio	
PAGE : gel de poliacrilamida para electroforesis	
FAM : medio mínimo para cultivo de <i>P. aeruginosa</i>	
PPGAS : medio mínimo limitado en fosfatos	
IPTG : isopropil- β -D-tiogalactopiranosido	
X-gal : 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido	
PIA : agar para aislar <i>Pseudomonas</i>	
p-NPP : <i>p</i> -nitrofenilpalmitato	
ONPG : <i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido	
LB : medio complejo de Luria-Bertani	
Kb : mil pares de bases	
Pb : pares de bases	
CTAB : bromuro de hexadecil trimetilamonio	
dNTPS : desoxinucleótidos trifosfato	
ORF : marco abierto de lectura	
ADN : ácido desoxiribonucleico	

Abstract

There is a growing interest on the study of lipolytic enzymes due to their important biotechnological applications as hydrolases, synthases and for transesterification reactions. The fields for their application are multiple due to their catalytic capacities. Lipases produced by pathogenic microorganisms are considered as important virulence factors that, in conjunction with other factors, contribute to their pathogenesis. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunist pathogen that infects immunocompromised individuals. This bacterium produces multiple virulence factors, but it also produces traits that, as the lipase, have potential industrial applications. *P. aeruginosa* strain IGB83 produces a lipase with attractive biochemical properties for its employment as additive to wash detergents due to its activity on thermotolerant and alkaline pH conditions.

In this thesis, I describe the identification of the gene that codifies for the lipase produced by *P. aeruginosa* IGB83. We used PCR amplification and colony hybridization from a genomic library from this strain to obtain one DNA fragment of 6.5 Kb, which was sequenced. The putative amino acids sequence show 92% identity with lipases produced by other strains of the same specie. The mutagenesis of the *lipA* gene here identified indicate that it codifies for the major lipase produced by IGB83 strain. The regulatory region analysis of *lipA* gene suggest that is transcribed by σ^{54} dependent promoter, this was confirmed by decreased lipolytic activity of a *P. aeruginosa* σ^{54} mutant. To study the LipA transcriptional regulation we constructed a transcriptional fusion with the regulatory region of *lipA* gene and the gene that codifies for β -galactosidase enzyme. The transcriptional fusion analysis shows that LipA expression do not depend on the quorum sensing regulators LasR and RhIR in a direct way and that is probably affected by autoinduction through others regulatory proteins not yet established. The transcriptional fusion and lipolytic activity measurements suggest that the *lipA* transcriptional regulation depends on the carbon source employed.

Resumen

Existe un creciente interés en el estudio de las enzimas lipolíticas debido a su cada vez mayor aplicación biotecnológica como hidrolasas y sintetasas. Los campos de aplicación son múltiples y esto se debe a las capacidades catalíticas de la enzima. Por otro lado, las lipasas producidas por muchos microorganismos son consideradas como importantes factores de virulencia que de forma conjunta con otros factores contribuyen en la patogénesis de las bacterias hacia sus huéspedes. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que infecta a humanos inmunocomprometidos y produce múltiples factores de virulencia, entre los que destaca una lipasa. La cepa de *P. aeruginosa* IGB83 produce una lipasa con propiedades bioquímicas atractivas para su empleo industrial sobre todo como aditivo en detergentes, debido a su actividad termotolerante a pH alcalino.

En esta tesis, se describe la identificación del gen que codifica para la lipasa producida por *P. aeruginosa* IGB83 mediante PCR e hibridación de un banco genómico de esta cepa. Se obtuvo un fragmento de 6.5 kb de ADN a partir de donde se realizó la secuencia de nucleótidos. El análisis del producto traducido resulta en una proteína que muestra una identidad del 92% con las lipasas producidas por otras cepas de esta misma especie. La mutagénesis de este gen *lipA* identificado nos indica que codifica para la principal lipasa producida por la cepa IGB83. El análisis de la región reguladora de este gen nos sugiere que es transcrito a partir de un promotor dependiente del factor σ^{54} , lo que se confirma por un abatimiento de la actividad lipolítica en una cepa de *P. aeruginosa* mutada en este factor σ . Para estudiar más la regulación transcripcional de la lipasa, se construyó una fusión transcripcional con la región reguladora del gen *lipA* y el gen que codifica para la enzima β -galactosidasa. El análisis de esta fusión transcripcional nos indica que la expresión del gen *lipA* no depende de manera directa por los reguladores de quórum LasR y RhIR de *P. aeruginosa* y que posiblemente esté afectado por autoinducción, pero a través de otras proteínas reguladoras aún no establecidas. El análisis de la fusión transcripcional y de la actividad enzimática sugiere una regulación transcripcional diferente en distintas fuentes de carbono.

I. Introducción

Las lipasas (E.C.3.1.1.3) son enzimas acilo hidrolasas y han sido llamadas "esterasas especiales" ya que actúan en los enlaces éster de triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga insolubles en agua, los ácidos grasos de los substratos generalmente son de más de 10 carbonos (las enzimas cuyos substratos poseen menos de 10 carbonos se clasifican como esterasas), (Jaeger *et al.*, 1994b, 1999). Las lipasas están ampliamente distribuidas y han sido identificadas en bacterias, arqueobacterias, hongos, levaduras, plantas y animales. La actividad de estas enzimas ha sido observada desde el inicio de 1900 en *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens* (Eijkman, 1901), estas últimas lipasas son ahora de las mejor estudiadas y corresponden a los microorganismos reclasificados como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* respectivamente (Jaeger *et al.*, 1994b). Las lipasas han despertado un gran interés debido a la versatilidad de reacciones con aplicación biotecnológica que pueden realizar y este interés se refleja en la publicación de 1,000 reportes por año sobre diferentes tópicos en el estudio de estas enzimas.

Estructura de las lipasas

Las lipasas presentan un plegamiento del tipo α/β hidrolasa. Este plegamiento fue inicialmente descrito tomando como base las estructuras tridimensionales de cinco enzimas; dienolactona hidrolasa, haloalcano deshalogenasa, serina carboxipeptidasa de trigo, acetilcolinesterasa y la lipasa de *G. candidum* (Schrag and Cygler, 1997). Aunque todas estas enzimas catalizan reacciones de hidrólisis, los substratos son muy diferentes y solo las enzimas acetilcolinesterasa y la lipasa de *G. candidum* tienen suficiente similitud de secuencia para sugerir que sus estructuras fueran parecidas. Tomando en cuenta la comparación y superposición de estas cinco estructuras, se delinearon los elementos conservados para este tipo de plegamiento α/β ; ocho cadenas β formando una hoja central casi en su totalidad paralela, conectadas a través de lazos o "loops" constituidos de pequeñas estructuras α -hélices, en un arreglo de tal manera que los residuos catalíticos quedan espacialmente cerca. (**Figura 1**).

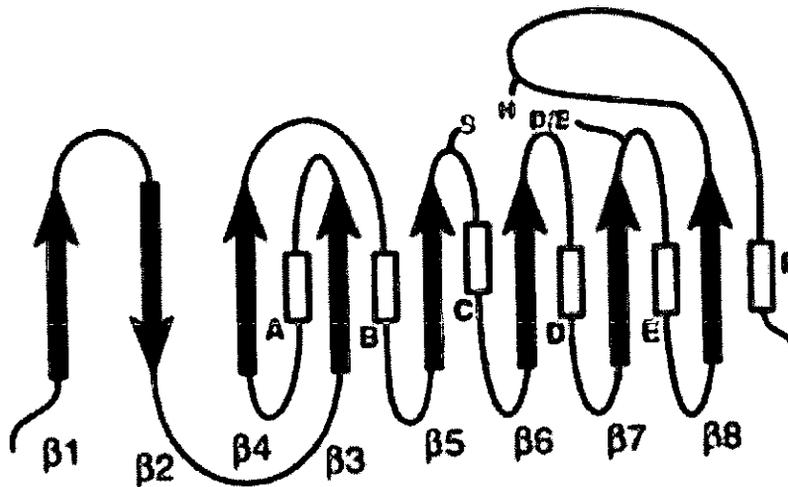


Figura 1. Estructura secundaria canónica de las enzimas α/β hidrolasas.

El tamaño de las lipasas bacterianas varían desde 19 kD de *B. subtilis* hasta 86 kD de *S. carnosus*. Todas las lipasas con la excepción de las lipasas pancreáticas, contienen un solo dominio (las lipasas pancreáticas tienen un pequeño dominio adicional que corresponde a la colipasa). El mínimo fragmento común a todas las lipasas contiene 5 hojas β y dos α -hélices. El pentapéptido conservado G-X-S-X-G que contiene el sitio activo de serina está localizado en una curvatura nucleofílica. Entre las lipasas, la secuencia del sitio catalítico es casi siempre Ser-His-Asp. La posición de los residuos catalíticos en la estructura canónica presenta el siguiente arreglo; serina en el loop de la cadena $\beta 5$, histidina en el loop de la cadena $\beta 8$ y el residuo ácido en el loop de la cadena $\beta 7$. Esta triada catalítica es la misma en todas las lipasas, en algunas excepciones el residuo ácido es Glu en lugar de Asp (Schrag and Cygler, 1997). En la **Figura 2**, se muestra el plegamiento de la estructura que corresponde a la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* pero que es similar para las lipasas de *P. glumae* y *C. viscosum*. Tienen una estructura que equivale completamente a las cadenas $\beta 3$ - $\beta 8$ del plegamiento canónico α/β con sus respectivas cadenas α -hélices.

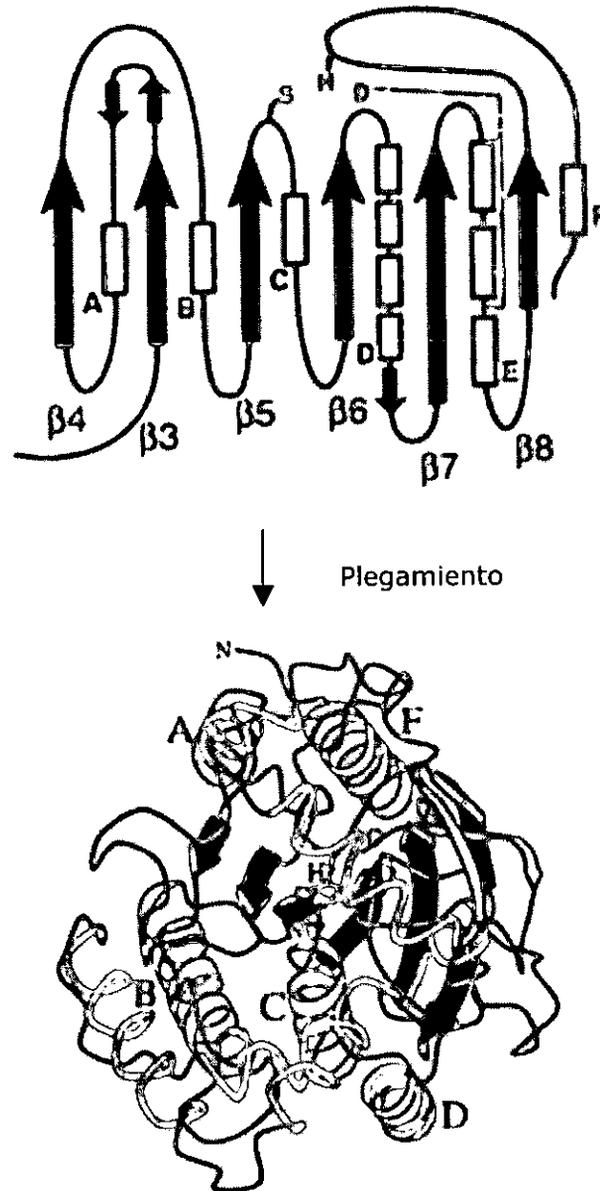


Figura 2. Estructura de las lipasas del grupo de *Pseudomonas aeruginosa*.

Activación interfacial

En 1958, Sarda y Desnuelle definieron a las lipasas en términos cinéticos, basados en el fenómeno de "activación interfacial", esta propiedad no ha sido encontrada entre enzimas que han sido clasificadas como esterasas (las que hidrolizan ésteres carboxílicos solubles en agua). El fenómeno de activación interfacial fue primero observado por Holwerda *et al.*, en 1936. El fenómeno consiste en que la actividad de las

lipasas es mayor en presencia de substratos insolubles (emulsiones) comparados con el mismo substrato en verdaderas soluciones monoméricas (**Figura 3**).

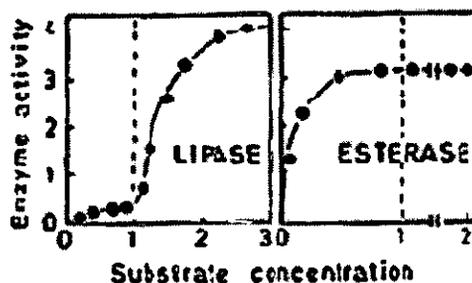


Figura 3. Activación interfacial en enzimas lipolíticas. Perfil de actividad de una lipasa pancreática y el de una esterasa de hígado de caballo. Las líneas punteadas representan la CMC del sustrato a partir de donde se forma una emulsión, la actividad esta en U/ml (tomado de Jaeger *et al* 1994b).

En una reacción enzimática clásica se presenta una cinética del tipo Michaelis-Menten como en el caso de la esterasa de la **Figura 3**. En el caso de las lipasas, conforme va aumentando la concentración del sustrato y se llega a la concentración micelar crítica (CMC, a partir de la cual el sustrato forma una emulsión) coincide con un aumento en la actividad lipolítica. Este perfil de actividad no sigue una cinética del tipo de Michaelis-Menten y surgió la hipótesis de que existía una activación de la enzima al estar en contacto con una interfase hidrofóbica.

En 1990 fueron elucidadas las dos primeras estructuras tridimensionales de lipasas, la lipasa pancreática humana (HPL) y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML). Usando inhibidores análogos a los substratos, Brzozowski *et al.*, (1991) y Derewenda *et al.*, (1992) lograron atrapar la RML en estado activado. La comparación de las estructuras cristalinas de estos complejos con respecto al de la enzima nativa reveló que la activación de la lipasa se logra por el desplazamiento de una estructura en forma de tapa constituida por una o dos α -hélices, cuyo movimiento expone al sitio activo. Sarda y Desnuelle (1958) observaron este mismo fenómeno en la lipasa pancreática porcina (PPL). Estos y otros estudios cristalográficos con micelas inversas reforzaron el fenómeno de activación observado en emulsiones, por lo que esta teoría ganó terreno. Sin embargo, Verger en 1997 realizó un estudio cuidadoso de la calidad de los substratos utilizados para medir activación interfacial y concluyó que el fenómeno en

gran medida depende de la fuerza iónica y la concentración de goma arábiga en el substrato, estos factores contribuyen a la "calidad interfacial", se encontró que las condiciones más reproducibles son a 0.15 M de NaCl y el mejor substrato tripropanoilglicerol (TC3). En los últimos años, por otro lado, se ha sabido que no todas las lipasas presentan activación interfacial. Las principales y primeras excepciones son las de *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1994), *P. aeruginosa* (Jaeger *et al.*, 1993) y *Candida antarctica* B (Uppernberg *et al.*, 1994). Todas estas enzimas, sin embargo, tienen una tapa anfifílica cubriendo el sitio activo. Por otro lado, la lipasa de 19 kD de *B. subtilis* (Lesuisse *et al.*, 1993), la cutinasa de *Fusarium solani* (Martínez *et al.*, 1992) y la lipasa pancreática de cerdo de guinea (Hjort *et al.*, 1993), carecen de una tapa que cubra el sitio activo y tampoco presentan activación interfacial.

A partir de estos antecedentes las lipasas fueron definidas como *carboxil esterases que catalizan la hidrólisis (o síntesis) de acilgliceroles de cadena larga*.

Reacciones catalizadas por lipasas

La actividad primaria de las lipasas es la de hidrolasas que actúan en los enlaces éster presente en acilgliceroles, para liberar ácidos grasos y glicerol. Sin embargo, también se ha explotado la capacidad de estas enzimas para llevar a cabo otro tipo de reacciones atractivas desde el punto de vista biotecnológico y así tenemos que en condiciones de poco contenido de agua, se pueden llevar a cabo reacciones de esterificación e interesterificación. Por otro lado, en medios orgánicos, en ausencia casi total de agua se favorece la reacción de transferencia de acilos (**Figura 4**).

La triada catalítica de las lipasas consiste de Ser-His-Asp/Glu. Esta triada es similar a las observadas en serina-proteasas y por lo tanto se sugiere que el mecanismo de catálisis de las lipasas es similar al de serina-proteasas. La reacción inicia con la unión no covalente del substrato con las cadenas laterales de la enzima e involucra un ataque nucleofílico por el oxígeno del grupo hidroxilo de la serina catalítica al carbonilo activado del éster susceptible. La nucleofilicidad del ataque de la serina es aumentada por la histidina catalítica a la que la serina trasfiere un protón de su hidroxilo. Esta transferencia de protón a su vez es facilitada por la presencia del residuo ácido

catalítico. El proceso requiere una molécula de agua para la hidrólisis de cada enlace éster y se postulan dos intermediarios tetrahédricos.

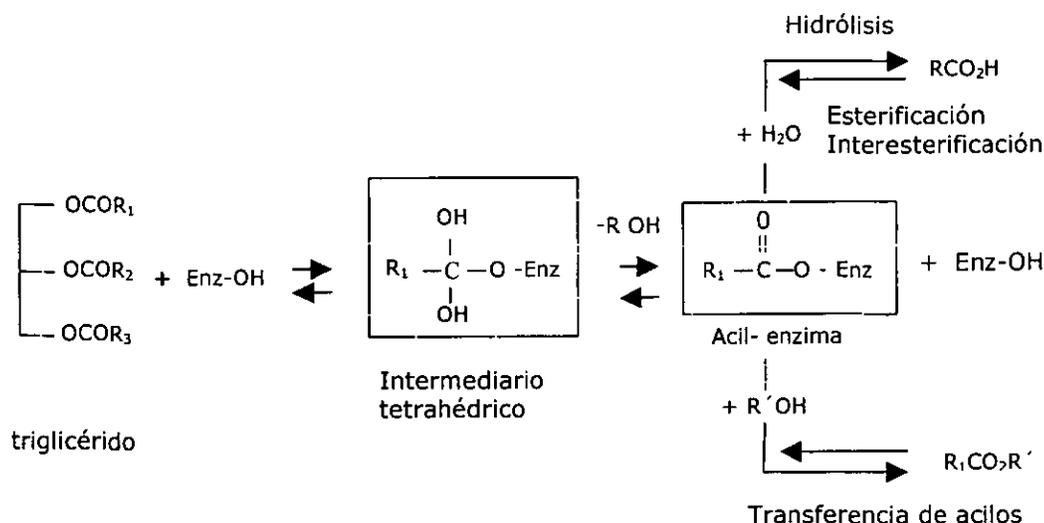


Figura 4. Reacciones catalizadas por lipasas.

Las evidencias para postular este mecanismo resultaron de varios estudios, particularmente de los derivados de inhibidores unidos a lipasas y su análisis estructural (Derewenda *et al.*, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Grochlski *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1998; Longhi *et al.*, 1997). Los análisis cristalográficos de la reacción catalizada por la haloalcano deshidrogenasa, una enzima tipo α/β hidrolasa, aportaron las evidencias definitivas de la ocurrencia del intermediario covalente (Verschueren *et al.*, 1993).

Especificidad de las lipasas

Se puede decir que la especificidad de las reacciones catalizadas por las lipasas en la hidrólisis de triglicéridos en general es baja, debido a que la función primaria de las lipasas es la degradación hidrolítica de triglicéridos y en muchos casos el potencial hidrolítico se extiende a fosfolípidos y otros compuestos orgánicos con un enlace éster (de ahí su gran variedad de aplicaciones). Sin embargo, es posible distinguir especificidad hacia los substratos y esta puede ser dividida en tres niveles; en términos de quimioselectividad hacia un ácido graso dado, es decir, si existen insaturaciones y/o la longitud de dicho ácido. La regioselectividad que se refiere a la habilidad de una

lipasa para hidrolizar preferencialmente enlaces de éster carboxílicos en posiciones externas *sn-1* y *sn-3* (ésteres primarios) en comparación con aquellos en las posiciones internas *sn-2* (ésteres secundarios). La estereoselectividad es la habilidad para discriminar entre dos enantiómeros en el caso de substratos racémicos. Todas las lipasas probadas a la fecha tienen la capacidad de diferenciar entre dos grupos enantiotópicos presentes en una molécula quiral, excepto la lipasa pancreática porcina que no distingue entre los grupos ésteres carboxílicos de trioctoína y trioleína (Rogalska *et al.*, 1997). En proteínas, el reconocimiento molecular y especificidad de substrato es logrado por una red de puentes de hidrógeno específicos con grupos polares del substrato o ligando. En los ácidos grasos, puesto que se carece de tales grupos, la interacción con la enzima está restringido a interacciones hidrofóbicas más débiles. La lipasa de *G. candidum* es la más específica conocida hasta la fecha, favorece la degradación de ácidos grasos insaturados con un doble enlace *cis* en la posición 9 (ácido oleico, linoleico o linolénico). Esta especificidad, sin embargo, varía de cepa a cepa probablemente debido a diferentes isoenzimas presentes en el extracto crudo (Derewenda Z., 1994). Por otro lado, la especificidad de la lipasa pancreática humana (hPL) y la lipasa de *R. miehei* (RML) es baja. Esta última favorece fuertemente las posiciones 1 y 3 en los triglicéridos (sin importar el tipo de ácido graso), aunque eventualmente rompe los enlaces intermedios. La lipasa producida por *Pseudomonas* también presenta baja especificidad (Jaeger *et al.*, 1999).

Aplicación biotecnológica de las lipasas

El mercado mundial de enzimas industriales en 1993 se estimó que fue de \$600 millones US, de los cuales, las lipasas comprenden \$20 millones US (Gilbert, 1993). El enorme potencial biotecnológico de las lipasas se debe a que (1) son estables en solventes orgánicos (2) no requieren cofactores (3) poseen amplia especificidad de substratos y (4) exhiben cierta enantioselectividad (pueden discriminar entre substratos quirales) (Jaeger and Reetz, 1998). Varias lipasas han sido producidas comercialmente, produciéndose la mayoría de ellas a partir de hongos y bacterias. La **Tabla 1** muestra las lipasas que hasta ahora son más ampliamente utilizadas en biotecnología.

Tabla 1. Ejemplos de lipasas disponibles comercialmente.

Origen	Organismo productor	Aplicación biotecnológica	Comercializada por:
Hongos	<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Genzyme, Biocatalysts, Boehringer M., Fluka, Sigma.
	<i>Candida antarctica A/B</i>	Síntesis orgánica	Boehringer M., Novo Nordisk.
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo en detergentes	Boehringer M., Novo Nordisk.
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos.	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bacterias	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis orgánica.	Amano, Boehringer M., Fluka.
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo en detergentes	Genencor.
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo en detergentes	Genencor.
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis orgánica.	Asahi, Biocatalysts.

Aplicación de las lipasas como hidrolasas.

Los detergentes resultan el campo comercial más importante de aplicación actual para las lipasas. Esto se debe a la tendencia de disminuir la temperatura de lavado y al intento por reducir el consumo de surfactantes por razones ambientales (Anne, *et al.*, 1999; Hemachander and Puvanakrishnan, 2000). En 1994, Novo Nordisk introdujo la primer lipasa comercial, Lipolase™ del hongo *T. lanuginosus* (expresado en *A. oryzae* bajo un promotor del gen para α -amilasa y un terminador del gen para glucoamilasa de *A. niger*). En 1995 dos lipasas microbianas fueron introducidas en el mercado Lumafast™ de *P. mendocina* y Lipomax™ de *P. alcaligenes* por Genencor Int. (Jaeger and Reetz, 1998). Se tienen que tomar en cuenta los siguientes factores para emplear lipasas en detergentes: (1) la variación de triglicéridos presentes en las manchas de grasas, lo que requiere de lipasas con baja especificidad (2) las drásticas condiciones de lavado (pH 10-11 y 30-60°C), que requiere de enzimas estables (3) los efectos de desnaturalización química o degradación proteolítica causados por los aditivos de detergentes como los alquilo benceno sulfonato y proteasas. La solución a estos problemas se está resolviendo con la búsqueda de lipasas con nuevas propiedades o por ingeniería de las ya existentes (Jaeger *et al.*, 1999; Helistö and Korpela, 1998). En alimentos la posición, longitud de la cadena y el grado de insaturación de los ácidos grasos influye en las propiedades fisico-químicas, en la sensación al paladar y en las

propiedades nutritivas de un triglicérido. La mantequilla de cocoa contiene ácidos palmítico y esteárico que en la boca a 37°C dan una sensación de frescura, esta tecnología esta siendo ahora utilizada por Quest-Loders Crocklaan utilizando la lipasa de *R. miehei* que realiza reacciones de transesterificación para dar la mezcla de ácidos grasos adecuado en el triglicérido. Los ácidos grasos poliinsaturados tienen en la actualidad una gran importancia biomédica, se están utilizando lipasas microbianas para elaborar productos anticolesterolémicos, anti-inflamatorios y trombolíticos (Gill and Valivety, 1997).

En la pulpa e industria del papel se está incrementando el uso de lipasas para remover los triglicéridos y ceras que causan problemas en su manufactura. En Japón, Nippon Papers Industries desarrolló un proceso para eliminar el 90% de los triglicéridos empleando una lipasa de *G. candidum*.

Otras aplicaciones hidrolíticas han sido descritas como son el desarrollo de sabores para productos lácteos (quesos, mantequillas, margarinas, bebidas alcohólicas, chocolates y edulcorantes). Esto se logra mediante la hidrólisis selectiva de triglicéridos de las grasas o liberación de los ácidos grasos en los saborizantes o precursores de los saborizantes. En el futuro, el empleo en limpieza de películas o contenedores parece que va a ser importante (Jaeger and Reetz, 1998).

Aplicación de lipasas como sintetetasas

Existen dos tipos básicos de reacciones enantioselectivas; (1) la reacción con substratos proquirales y (2) la resolución cinética de racematos. Los alcoholes quirales y los ésteres de ácidos carboxílicos son las dos principales clases de substratos, aunque en años recientes este número se ha incrementado en gran medida y comprende dioles, α y β hidroxiaácidos, cianohidrininas, clorohidrininas, diésteres, lactonas, aminas, diaminas, amino-alcoholes y derivados de α y β aminoácidos (Bornscheuer, 1995; Stamatis *et al.*, 1999; Linko *et al.*, 1998; Loughlin, 2000). La dinámica de las reacciones catalizadas por lipasas generalmente requiere de un segundo catalizador para inducir la racemización del enantiómero que no es aceptado por la enzima. Los metales de transición son generalmente usados, un ejemplo es la producción de aminas N-acetiladas por la lipasa de *C. antarctica* (Jaeger and Reetz, 1998).

Las lipasas son solubles en agua debido a su naturaleza proteica, sin embargo, sus substratos naturales lipídicos no lo son. Aunque se han empleado emulsificantes para homogeneizar estos sistemas de reacción, aún se presentan dificultades tecnológicas (contaminación de los productos con actividad enzimática residual) y dificultades económicas (uso de un lote de enzima para un solo paso del proceso). Con la inmovilización de las lipasas se ha resuelto en gran medida estas dificultades. Lo anterior se puede lograr uniendo la enzima a un acarreador mediante unión covalente, hidrofóbica, intercambio iónico o entrecruzamiento; o bien atrapando la enzima en micelas inversas, matrices poliméricas o en fibras huecas (Balcão *et al.*, 1996). Los precursores de silano resultan un buen material para atrapar a las lipasas en procesos denominados "sol-gel", en estos materiales, incluso aumenta la actividad relativa de las lipasas en correlación con la hidrofobicidad de los grupos alquilo (Jaeger and Reetz, 1998). Otra ventaja es que las lipasas en estas condiciones aumentan su estabilidad térmica, química e incluso muestran ser mejor enantioselectivas y estereoselectivas.

Debido a que el mercado mundial de compuestos quirales es muy alto, se buscan lipasas más enantioselectivas. Un intento es mediante la búsqueda de nuevas lipasas, aunque se toma en cuenta que muchas de las reacciones de interés no son con los substratos naturales. Otra aproximación que esta rindiendo excelentes resultados es mediante evolución *in-vitro*: mutagénizando el gen al azar, clonación y expresión de los genes mutados, búsqueda de actividades superiores y nuevas mutagénesis. Después de solo cuatro rondas de mutagénesis Reetz *et al.*, 1997 (con la lipasa de *P. aeruginosa* PAO1) lograron un exceso enantiomérico (ee) del 87% a favor del ácido (s)-2-metildecanoico, partiendo del 2% de ee de la enzima silvestre.

Identificación de actividad lipolítica

Debido a que las reacciones catalizadas por las lipasas se llevan a cabo en un medio heterogéneo, se han buscado métodos rápidos y sencillos, primero para identificar cepas con actividad lipolítica y luego para la cuantificación de la enzima responsable. El substrato mas ampliamente utilizado es aceite de oliva que se encuentra constituido en gran parte de trioleína. Este substrato y otros como tributirina son emulsionados mecánicamente en los medios de crecimiento y colocados en cajas petri para su

ensayo. La producción de lipasa es indicada por la formación de halos transparentes alrededor de las colonias crecidas en cajas conteniendo tributirina (Atlas, 1996). En el caso de trioleína se añade rodamina B, esta combinación resulta en halos con emisión de fluorescencia a 350 nm y es una prueba específica para determinar actividad lipolítica (Kouker and Jaeger, 1987). La actividad de lipasa en los sobrenadantes es ensayada mediante la hidrólisis de *p*-nitrofenilésteres con ácidos grasos de más de 10 carbonos y la detección espectrofotométrica de *p*-nitrofenol a 410 nm. En este último ensayo se debe considerar que los substratos monoésteres también pueden ser degradados por esterases, por lo que se puede optar por la titulación de los ácidos grasos liberados de trioleína aunque este método es más laborioso (Jensen, 1983).

Clasificación de las lipasas bacterianas

De acuerdo a la secuencia de aminoácidos presentados por las enzimas lipolíticas bacterianas, estas se han clasificado en seis familias como se muestra en la **Tabla 2** (Jaeger *et al.*, 1999).

La familia 1 consta de 22 miembros y a su vez está subdividida en 6 subfamilias. La subfamilia I.1 y I.2 comprenden los grupos I y II respectivamente de los grupos de *Pseudomonas*, las lipasas están codificadas en un operón junto con sus chaperonas intramoleculares, las cuales han sido denominadas foldasas lipasa-específicas (Lif) (Jaeger *et al.*, 1994b). Estas lipasas son secretadas por la vía tipo II, mientras que las pertenecientes a la subfamilia I.3 son secretados por el tipo I. En la subfamilia I.4 están agrupadas las lipasas de *Bacillus* que son las más pequeñas conocidas con una masa molecular de 19.6 kD. Estas parecen ser muy adecuadas para aplicación biotecnológica, así como la de *B. thermocatenuatus* que pertenece a la subfamilia I.5 (Schmidt-Dannert *et al.*, 1997). Las lipasas de *Staphylococcus hycus* y *S. aureus* son las mejor caracterizadas de bacterias gram-positivas.

Tabla 2. Familias de enzimas lipolíticas bacterianas (Jaeger *et al.*, 1999).

Familia	Sub-familia	Especies que producen lipasas	No. de acceso	Similitud (%) ²	propiedad
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	D50587	100	Lipasa prototipo
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholera</i>	X16945	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
	2	<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	Fosfolipasa
		<i>Burkholderia glumae</i> ¹	X70354	35	
		<i>Chromobacterium viscosum</i> ¹	Q05489	35	
		<i>Burkholderia cepacia</i> ¹	M58494	33	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14	
	3	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	Fosfolipasa
		<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	
	4	<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	Fosfolipasa
		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	
	5	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	Fosfolipasa
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	
		<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	
<i>Streptomyces cinnamomeus</i>		U80063	14		
II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	100	Esterasa m.e.	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	31	Aciltransferasa	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	17	Esterasas m.e.	
	<i>Photobacterium luminescens</i>	P40601	17	Esterasas m.e.	
III	<i>Streptomyces scabies</i> ¹	M57297	15	Lipasa extracel.	
	<i>Streptomyces exfoliatus</i> ¹	M86351	100		
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		
IV	<i>Moraxella sp.</i>	X53053	33	Lipasa 1	
	<i>Moraxella sp.</i>	X53868	100	Lipasa 2	
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28	Carboxilesterasa	
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25		
	<i>Pseudomonas sp.</i> B11-1	AF034088	24		
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24		
V	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20	Esterasa	
	<i>Moraxella sp.</i>	X53869	100	Lipasa 3	
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	88		
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	34	PHA-depolimerasa	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	34	Prob. esterasa	
VI	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	25	Esterasa	
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	15	Esterasa	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	S79600	100	Esterasa	
	<i>Synechocystis sp.</i>	D90904	24		
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	22		
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	16		
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	15		

¹Enzimas lipolíticas con estructura 3-D conocida.²Similitud de acuerdo a secuencias de aminoácidos, el 100% corresponde al primer miembro de la familia.

m.e. = membrana externa.

La familia II anteriormente fue descrita como nuevas enzimas lipolíticas con función desconocida (Upon and Buckley, 1995). Recientemente se añadió a esta familia una esterasa localizada en la membrana externa de *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 1999). La estructura tridimensional de la lipasa de *Streptomyces scabies* indica que su plegamiento puede ser diferente del α/β hidrolasa encontrado en la mayoría de las lipasas.

Los miembros de la familia III incluye lipasas extracelulares de *Streptomyces spp.* y de la bacteria psicrófila *Moraxella sp.*

Los miembros de la familia IV exhiben similitud a las lipasas que responden a hormonas de mamíferos (Langin *et al.*, 1993). Ellas contienen el residuo de serina del sitio activo en un pentapéptido consenso GDSAG, que esta localizado próximo a la región N-terminal de la proteína, además tienen otro motivo HGGG de función desconocida, estrictamente conservado a la mitad de la proteína.

Las familias IV y V comprenden lipasas que pertenecen ya sea a psicrófilos (*Moraxella sp.*), *Pseudomonas sp.* B11-1 y *P. immobilis*) o termófilos (*Archaeoglobus fulgidus* y *Sulfolobus acidocaldarius*). Los miembros de la familia V muestran similitud estructural a deshalogenasas, haloperoxidasas y epóxido hidrolasas.

En la familia VI se encuentran esterases que han sido parcialmente identificadas de secuencias genómicas (*Synechocystis sp.*, *Chlamydia trachomatis*). Estas esterases son pequeñas proteínas supuestamente localizadas en el citoplasma con similitud a lisofosfolipasas de mamíferos.

Función fisiológica de las lipasas

En bacterias, debido a la estructura simple y vulnerable de las células, las lipasas son extracelulares y el microorganismo ha adaptado un mecanismo tal para asegurarse que las lipasas únicamente sean activas una vez que van a salir de la célula a través de la membrana externa, puesto que las lipasas funcionales pueden fácilmente degradar las membranas. Dada la naturaleza hidrofóbica de las lipasas, estas se encuentran fuertemente unidas a lipopolisacáridos de una forma tal que su separación es difícil aun en condiciones desnaturalizantes y en gran medida se encuentran unidas a la membrana externa (Rúa *et al.*, 1997; Gilbert, 1993; Sommer *et al.*, 1997; Jaeger *et al.*,

1994b). Las bacterias secretan lipasas al medio en respuesta a la presencia de substratos lipídicos como fuente de carbono en condiciones fluctuantes de nutrientes en el ambiente y en fase estacionaria tardía para el recambio de los componentes lipídicos durante el proceso de modificación de membranas en un medio hostil y para la reintegración de triglicéridos de las bacterias lisadas.

Staphylococcus epidermidis es un importante agente de infección vía su adsorción en los equipos quirúrgicos mediante la formación de biopelículas. En esta bacteria el gen de la lipasa se encuentra a un lado del grupo de genes responsable de la producción de la biopelícula y se especula que sea responsable de la colonización de la piel y virulencia (Götz *et al.*, 1998). *Propionibacterium acnes* también es un importante residente de la piel y se propone que los triglicéridos del sebo sean hidrolizados por la lipasa, ayudando a la adherencia y colonización bacteriana del folículo sebáceo (Miskin *et al.*, 1997). En *Streptomyces sp.* se propone la función de la lipasa en la movilización de los triglicéridos de reserva para la biosíntesis de antibióticos en fase estacionaria. Estos triglicéridos se almacenan intracelularmente en estructuras unidas a membrana durante la fase de crecimiento exponencial (Olukoshi and Packter, 1994).

Pseudomonas aeruginosa secreta cinco enzimas lipolíticas extracelulares; dos fosfolipasas C (PLC), dos lipasas y una esterasa que se encuentra unida a la membrana externa (Stuer *et al.*, 1986; Wohlfarth *et al.*, 1992; Jaeger *et al.*, 1999; Wilhelm *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 1999). La principal lipasa (LipA) en esta bacteria es inducida por triglicéridos presentes en el medio de cultivo aunque la mutación del gen indica que su presencia no es requerida para el crecimiento en este medio de cultivo. Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística producen las lipasas y fosfolipasas. Se ha demostrado que existe un efecto sinérgico de las actividades de ambos tipos de enzimas *in vitro* y dan lugar a la hidrólisis completa de dipalmitoilfosfatidil-colina, que es el principal lípido surfactante del pulmón quístico (Jaeger, 1994a). Por otro lado, estas enzimas inducen la liberación del ácido 12-hidroxieicosatetraenoico de las plaquetas humanas, este ácido resulta ser un mediador inflamatorio (Koenig *et al.*, 1994), además tiene serios efectos patológicos en granulocitos y monocitos (König *et al.*, 1996). Estos estudios sugieren que las enzimas lipolíticas de *P. aeruginosa* también actúan como factores de virulencia.

Secreción de las lipasas bacterianas

Las lipasas en medios sin triglicéridos generalmente aparecen en el medio de cultivo cuando las células alcanzan el final del crecimiento logarítmico. La regulación de la expresión de la lipasa puede darse a cada paso iniciando con la transcripción del gen y luego en la movilización de la lipasa a su destino extracelular final. Los mecanismos empleados para la secreción de las lipasas son diferentes entre las distintas bacterias. Al menos se han localizado tres maneras de secreción para las lipasas.

En bacterias Gram-positivas

En *S. aureus* la lipasa es sintetizada como un prepropéptido a partir del cual se elimina un péptido señal de 46 aminoácidos quedando una prolipasa de 82 kD, una segunda ruptura proteolítica en el extremo carboxilo resulta en la forma madura de la enzima de 46 kD. El proceso catalítico es llevado a cabo por una proteasa metalocisteínica que actúa en los extremos amino y carboxilo de la preproenzima (Wenzig *et al.*, 1990; Smeltzer *et al.*, 1992). En *S. hycus* la lipasa también se encuentra inicialmente como una preproenzima, que es procesada de igual manera por una proteasa para terminar como una proteína madura de 46 kDa. La forma de la enzima como propéptido es necesaria para su secreción eficiente (Beer *et al.*, 1996). *S. carnosus* no posee la proteasa respectiva y aun así produce la enzima activa pero de 86 kD (Rollof and Normak, 1992; Ayora *et al.*, 1994).

En las bacterias Gram-positivas el péptido señal de 46 aminoácidos posibilita la secreción a través de la membrana interna por medio del mecanismo sec-translocasa. En *E. coli*, esta es una multisubunidad proteica y consiste de un dímero de proteínas SecA solubles y un complejo embebido en la membrana formada por las proteínas SecY, E, D, G y F. (Duong *et al.*, 1997). Un sistema Sec similar ha sido localizado en *Bacillus*, que se asume esta involucrado en la secreción de la lipasa (Simonen and Palva, 1993). En bacterias Gram-positivas puesto que sólo tienen una membrana, este es el único paso necesario para la secreción de la enzima, en adición con el procesamiento de la proenzima.

En bacterias Gram-negativas

En *P. aeruginosa* y *B. glumae*, las lipasas se encuentran codificadas en un operón junto la foldasa lipasa-específica (Lif). Esta chaperona también ha sido localizada en *Vibrio*

cholerae (Ogierman *et al.*, 1997) y *Acinetobacter calcoaceticus*, en este último caso el gen de la chaperona se encuentra antes que el gen para la lipasa (Kok *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1999).

Las lipasas de estas bacterias Gram-negativas son secretadas en dos pasos. El primer paso es a través de la membrana interna de una manera dependiente de un péptido señal de 26 aminoácidos y el sistema sec-translocasa, el mismo que es mencionado para el caso de Gram-positivas. Ya en el periplasma, el péptido señal es cortado por una péptidasa y de esta manera libera el polipéptido que constituye a la lipasa. En el periplasma la lipasa permanece de manera transitoria y adquiere su plegamiento final y obtiene su conformación activa **Figura 5**. En el periplasma intervienen las foldasas (chaperonas) específicas. Las foldasas mejor estudiadas son las de *B. glumae* y *P. aeruginosa*, contienen un segmento N-terminal hidrofóbico que les permite estar ancladas a la membrana interna (Frenken *et al.*, 1993). Las proteínas Lif que carecen de este segmento de anclaje a la membrana aún son capaces de realizar el plegamiento de las lipasas (Shibata *et al.*, 1998), lo cual indica que el papel de este segmento es para prevenir que la foldasa también sea secretada. La interacción de las lipasas con sus foldasas ha sido demostrado mediante la inmunodetección con anticuerpos ya sea contra la lipasa o la foldasa (Ihara *et al.*, 1995). No se conoce aún con precisión la relación de lipasa:foldasa requeridas, se ha sugerido una relación 1:1 con el auxilio de Ca^{2+} para la formación del complejo (Shibata *et al.*, 1998), pero mediante estudios de plegamiento *in vitro* se ha observado que la mejor proporción es de 1:4 (Ihara *et al.*, 1995). La interacción de las lipasas con sus foldasas respectivas es específica, como muestra el hecho de que las foldasas son incapaces para plegar lipasas heterólogas, la única excepción conocida es la activación de la lipasa de *P. alcaligenes* por la foldasa de *P. aeruginosa* cuando son coexpresadas en *E. coli* (El Khattabi *et al.*, 1999). Mediante estudios de intercambio de fragmentos, se reveló que los 138 aminoácidos del dominio C-terminal de la foldasa de *B. glumae* determina su especificidad hacia la lipasa (El Khattabi *et al.*, 1999). La foldasa de *P. aeruginosa* fue mutagenizada mediante PCR y fue coexpresada con su lipasa respectiva en *E. coli*, estas foldasas mutadas permitieron la identificación de los residuos Tyr-99 y Arg-115 como esenciales para la interacción con la lipasa (Shibata *et al.*, 1998).

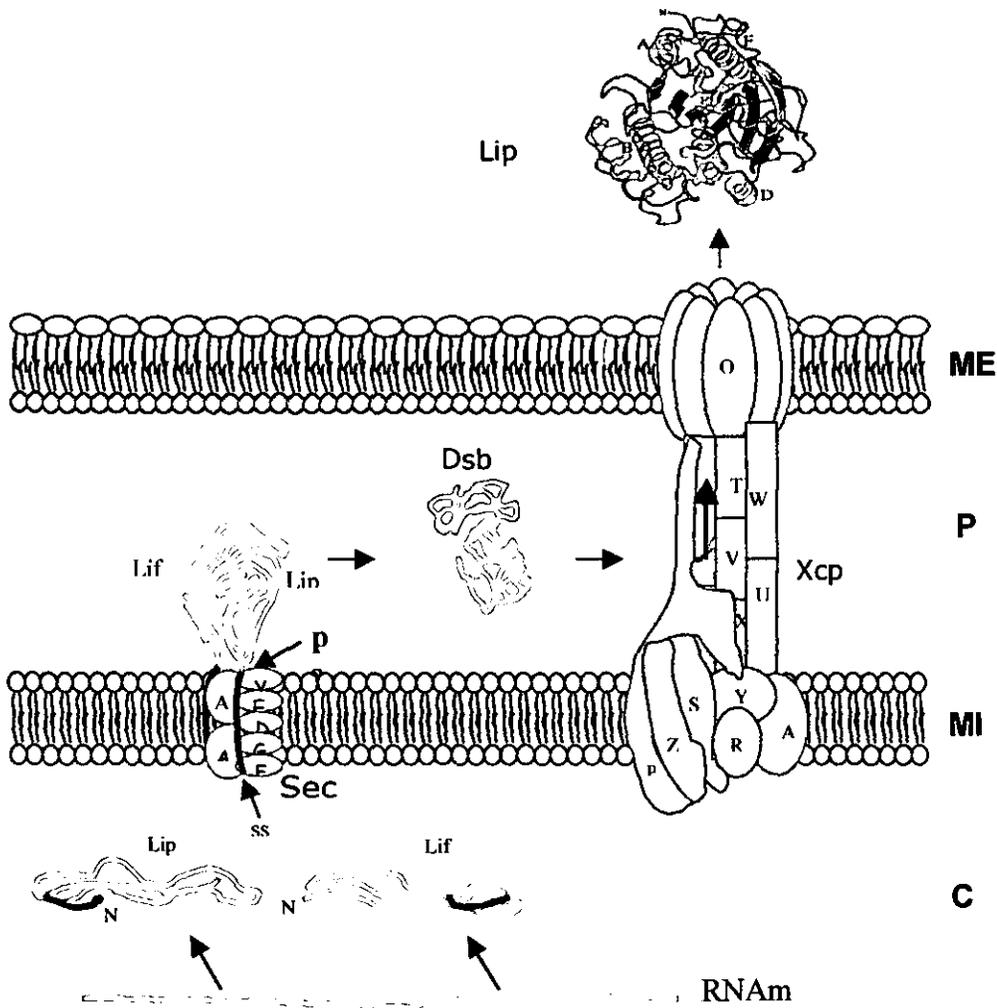


Figura 5. Modelo del plegamiento y secreción de la lipasa en *P. aeruginosa*; **ss**= secuencia señal, **ps**= peptidasa señal, **Dsb**= enzimas disulfuro oxidoreductasas, **Xcp**= sistema de secreción Xcp, **Sec**= sistema de traslocación en la m.i., **c**= citoplasma, **m.i.**= membrana interna, **p**= periplasma, **m.e.**= membrana externa.

Las lipasas bacterianas contienen un enlace disulfuro, que se forma en el periplasma. En *E. coli* existe un complejo de proteínas Dsb (disulfide bond formation) que se encargan de la formación del puente disulfuro (Raina and Missiakis, 1997). DsbA es una enzima periplásmica que se encarga de reducir los residuos Cys-SH para formar un enlace disulfuro; DsbB es una proteína de membrana que recicla el motivo tiol catalítico de DsbA a su estado oxidado, a su vez DsbB es oxidado por quinonas embebidas en la

membrana citoplásmica (Missiakis and Raina, 1997). La isomerización de las puentes disulfuro incorrectas se lleva a cabo por DsbC, DsbG y DsbE. La fuente del poder reductor se localiza en el citoplasma y está dado por tioredoxina (*trxA*) y tioredoxina oxidasa (*trxB*). Los electrones donados por las tioredoxinas son transferidos al periplasma a través de la proteína transmembranal DsbD (Chung *et al.*, 2000). Se cree que el enlace disulfuro contribuye a la estabilidad de la lipasa. Mediante un estudio con DTT y sustitución de los residuos de cisteína por los de serina, se concluyó que el puente disulfuro contribuye principalmente al plegamiento correcto de la lipasa y por lo tanto a estabilizar la estructura final de la enzima (Yang *et al.*, 2000). Se sabe que la ausencia del puente disulfuro no afecta la secreción, aunque sí provoca que la lipasa sea más sensible a la desnaturalización con urea y a la degradación proteolítica (Brumlik *et al.*, 1997). Tomando en cuenta la estructura cristalina de las lipasas, se conoce que existe un átomo de calcio embebido en su arreglo. La posición de este sitio de unión a Ca^{2+} con respecto al sitio activo, indica que este ión metálico no interviene en la actividad, sino más bien se le adjudica un papel estructural. Mediante estudios con EDTA y el reemplazamiento de los residuos aspárticos (que es donde se une el Ca^{2+}) por alaninas, se concluyó que este ión bivalente es importante para el proceso de activación de la lipasa ayudando en la estructuración de la enzima (Yang *et al.*, 2000). Además de los elementos descritos anteriormente, Tanaka *et al.*, (1999) describieron un factor de activación para la lipasa de *Pseudomonas* sp. (LAF, Lipase Activacion Factor). Mediante estudios de activación de esta enzima por su foldasa en *E. coli*, encontraron que el complejo lipasa:foldasa sólo se disocia eficientemente y la lipasa recupera más actividad en presencia del extracto crudo de *Pseudomonas*. Mediante filtración en gel Superdex se encontró que el M_r de este factor es 330 ± 30 y la naturaleza de este factor aún es desconocida.

Una vez que las lipasas son plegadas en el periplasma éstas son secretadas a través de la membrana externa por medio de una compleja maquinaria que consiste de al menos 14 proteínas y que constituyen el tipo de secreción II o vía de secreción general (Pugsley, 1993). En *P. aeruginosa*, la lipasa es secretada a través de este sistema codificado por 12 genes *xcp* organizados en dos operones transcritos de manera divergente (Filloux *et al.*, 1998). Las proteínas Xcp están localizadas en el interior y

exterior de la membrana externa, XcpQ forma un poro multimérico con un diámetro de 95 Å (Bitter *et al.*, 1998). Un aparato de secreción similar fue recientemente descubierto en *P. alcaligenes* (Gerritse *et al.*, 1998). En este estudio se encontró que cuando se expresaron copias adicionales de este sistema de secreción en un cósmido, la producción de la lipasa se incremento de manera significativa. Este efecto también ha sido observado para el caso de *P. aeruginosa* lo cual sugiere que el número de complejos de secreción probablemente es bajo, lo cual impone restricciones para la producción de enzimas extracelulares. Aunque estos complejos también han sido localizados en *A. hydrophila*, *X. campestris* y *V. cholerae* (Groot *et al.*, 1991; Overbye *et al.*, 1993) no se ha demostrado que estén involucrados en la secreción de lipasas.

Por otro lado, en *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia marcescens* además de que tienen lipasas más grandes (46 kD comparada contra 30 kD), carecen del gen que codifica para la chaperona (Li *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1991; Tan and Miller, 1992). Las lipasas de *P. fluorescens* (Duong *et al.*, 1994) y *Serratia marcescens* (Akatsuka *et al.*, 1995) carecen de un péptido señal N-terminal típico y son secretadas por el sistema tipo I, denominado ABC de exportación (ATP Binding Cassette), este sistema consiste de tres proteínas diferentes; una proteína de membrana interna, una proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa (Binet *et al.*, 1997). En *S. marcescens* la proteína de membrana interna LipB contiene un cassette de unión a ATP y confiere la especificidad hacia la proteína a ser secretada. LipC es un componente adicional y actúa como una proteína de fusión membranar que puede estar asociada con ambas membranas, LipD es una proteína de membrana externa. Las tres proteínas de transporte forman zonas de adhesión entre las membranas interna y externa a través de la cuál las proteínas son secretadas. Las proteínas secretadas por esta vía tienen características estructurales en común; aunque carecen de un péptido señal N-terminal, contienen una secuencia blanco C-terminal que es esencial para la secreción, en esta región se localizan repetidas varias secuencias consenso GGXGXD y se identifica una α -hélice anfipática (Ahn *et al.*, 1999).

Regulación de los genes que codifican para lipasas

En Gram-positivas

En *S. aureus* fue identificado una red de regulación que de una manera coordinada controla la transcripción de los genes involucrados en la patogénesis. Dos locus genéticos llamados *agr* y *sar* fueron identificados como los responsables para activar la transcripción de genes que codifican para proteínas extracelulares cuando la bacteria entra en la fase estacionaria de crecimiento (Heinrichs *et al.*, 1996). La expresión del gen de la lipasa parece estar regulada por el locus *agr* que codifica para un sistema de regulación de dos componentes dependiente de densidad celular, *agrC* es el transductor de señal y *agrA* es el regulador de respuesta. Una feromona de naturaleza peptídica y codificada por *agrD* funciona como autoinductor. Una mutación en *agrC* reprime la actividad de lipasa extracelular (Smeltzer *et al.*, 1992), por lo que se puede concluir que la expresión de la lipasa en *S. aureus* es regulada por un sistema de quórum-sensing, con un péptido autoinductor y a través de un sistema de dos componentes *agrC/A* (McNamara and Iandolo, 1998). Recientemente se demostró que el factor σ^B alternativo reprime la actividad de la lipasa, sin embargo, no es claro si está afectada la expresión del gen de la lipasa o son las proteínas de secreción u otras proteínas reguladoras las afectadas (Kullik *et al.*, 1998).

En Gram-negativas

Varias cepas de *Streptomyces* producen lipasas extracelulares, de una manera dependiente de la fase de crecimiento. La transcripción del gen *lipA* de *S. exfoliatus* M11 depende de la presencia del gen *lipR*, localizado abajo del gen para la lipasa. Este gen codifica para una proteína con un sitio de reconocimiento para ADN por lo que es un regulador transcripcional bacteriano (Servin-González *et al.*, 1997). El regulador transcripcional específico para la lipasa, activa la síntesis de esta enzima al entrar en la fase estacionaria de crecimiento, probablemente capacitando a *Streptomyces* para usar los compuestos triglicéridos que tiene como reserva (Olukoshi and Packter, 1994; Valdéz *et al.*, 1999).

El patógeno de insectos *Xenorhabdus nematophilus* que se encuentra en el intestino del nemátodo parásito *Steinernema carpocapsae* produce una lipasa cuya biosíntesis

es estimulada por N- β -hidroxibutanoil homoserina lactona (HBHL), este compuesto es autoinductor de la luminiscencia en *Vibrio harveyi* (Dunphy *et al.*, 1997).

Acinetobacter calcoaceticus, una bacteria del suelo, produce enzimas lipolíticas entre los que se encuentra una lipasa codificada por el gen *lipA* (Kok *et al.*, 1995). Los efectos de varios factores fisiológicos en la expresión del gen de la lipasa fueron estudiados usando una fusión transcripcional *lipA::lacZ* integrado en el cromosoma. Se encontró que los ácidos grasos libres producidos por la hidrólisis de la trioleína (que es el sustrato de la lipasa) reprimieron fuertemente la expresión de *lipA* (Kok *et al.*, 1996). Este hallazgo fue explicado con la propuesta de la existencia de una proteína reguladora aún no identificada, se supone que al existir ácidos grasos libres, éstos se unen a la proteína reguladora y de esta manera reprime la expresión de *lipA*.

En *Burkholderia cepacia* se identificaron los genes *cepRI*, que son homólogos a *luxRI* de *Vibrio fischeri*. Una mutante por inserción de un transposon en *cepR* mostró un incremento del 67% en la producción del sideróforo ornibactina, fue proteasa negativo y produjo 45% menos de actividad lipolítica en comparación con la cepa silvestre. La complementación de esta mutante produjo los niveles normales de ornibactina, proteasa pero no complemento la actividad lipolítica. Se concluyó que este sistema no regula la expresión del gen de la lipasa y el efecto observado se puede deber a un efecto polar sobre un gen localizado hacia abajo de la inserción (Lewenza *et al.*, 1999).

En *P. aeruginosa* la regulación de la expresión de *lip* ha sido un tema de estudio bastante complicado y el mecanismo de regulación aún no se conoce. Puesto que la lipasa es una enzima extracelular y es uno de los factores producidos por *Pseudomonas* que le confiere el carácter patogénico a esta bacteria, se especuló que pudiera ser regulada de manera análoga a estos factores patogénicos mediante un sistema dependiente de densidad celular denominado "quórum-sensing" (Jaeger *et al.*, 1994b).

McKenney *et al.*, (1995) demostraron el efecto del material extracelular concentrado libre de células obtenido de cultivos de fase estacionaria de *B. cepacia* y *P. aeruginosa* en la producción de factores de virulencia por *B. cepacia*. Mientras que la adición de sobrenadante de *B. cepacia* a un cultivo con esta misma cepa tuvo apenas un ligero incremento en la expresión de sideróforo, lipasas y proteasas, la adición de

sobrenadante de *P. aeruginosa* provocó un significativo incremento en la producción de dichos factores. Además una cepa de *P. aeruginosa* que produce cantidades reducidas de autoinductores (por una mutación en el factor transcripcional LasR) sólo aumento ligeramente la producción de los factores de virulencia analizados en *B. cepacia*. Este estudio fue el primer reporte donde se relaciona la producción de la lipasa con el "quórum-sensing" y donde se propuso el intercambio funcional de autoinductores entre dos especies no relacionadas y que pueden coinfectar a pacientes con fibrosis quística. Aunque como se menciona, no identificaron que autoinductor es el responsable del efecto en el incremento de la actividad de la lipasa ni cuál es el mecanismo de activación.

Con la descripción de GacA en *P. aeruginosa* (Reimmann *et al.*, 1997) se obtuvieron datos adicionales de la regulación de la lipasa. GacA es un regulador global de la producción de factores de virulencia y es parte de un sistema de dos componentes que pertenece a la familia FixJ de reguladores de respuesta (Laville *et al.*, 1992), el sensor es la proteína transmembranal LemA (GacS). Los genes *gacA* y *lemA* están muy conservados en *Pseudomonas* fluorescentes y además han sido localizado en *Salmonella typhimurium* y *E. coli*. GacA en *P. aeruginosa* controla de manera positiva la producción de piocianina, cianuro y lipasa. La sobreexpresión de este regulador tiene como efecto un aumento en la actividad de la lipasa y se postula que esta indirectamente mediado por una sobreproducción de N-butilhomoserina lactona que a su vez se une al regulador transcripcional RhlR del sistema de regulación de "quórum-sensing", aunque no se estudió la transcripción del gen de la lipasa (Laville *et al.*, 1992). El reporte más reciente acerca de la regulación de la lipasa fue llevado a cabo por Jaeger *et al.*, (1999). Aunque los datos experimentales no han sido reportados aún, si mencionan dos inicios de transcripción localizados mediante extensión de primeros; un promotor P1 a -90 pb del inicio de traducción y requiere la presencia del factor sigma alternativo σ^{54} , también mencionan la presencia de un segundo promotor P2 a -300 pb del inicio de traducción. Debido a que los promotores dependientes de σ^{54} requieren de la presencia de un activador transcripcional (Shinger, 1996), se propuso la existencia de un regulador de la lipasa denominado LipR. La lipasa extracelular en medio complejo es secretada cuando *P. aeruginosa* entra a la fase estacionaria. Esto sugirió un tipo de

regulación para la expresión de la lipasa dependiente de densidad celular involucrando los sistemas de "quórum-sensing". Con estudios de fusiones transcripcionales *lipA::lacZ* se propuso que la expresión del gen de la lipasa es controlada vía *rhIRII*, que incluye al autoinductor N-butilhomoserina lactona (BHL). También realizaron mutagénesis con Tn5, las mutantes que se identificaron redujeron la actividad de la lipasa y llevo a la identificación del probable regulador LipR, que puede ser parte de un sistema de regulación de dos componentes. Se localizó un segundo gen arriba del probable LipR involucrado en la transcripción del gen de la lipasa, este nuevo gen lo denominaron tentativamente *lipQ* y codifica para una probable proteína transductora de señales de la familia de NtrC y fue identificada mediante una búsqueda en el banco de la secuencia genómica de *P. aeruginosa* (www.pseudomonas.com).

II. Antecedentes

Origen de *Pseudomonas aeruginosa* IGB83

En el Instituto de Biotecnología (IBt) existe interés en buscar enzimas con propiedades bioquímicas adecuadas para su posible aplicación biotecnológica, en particular había interés para encontrar microorganismos productores de lipasas que presentaran termorresistencia y actividad a pH alcalino y que adicionalmente no requirieran de cationes bivalentes para su actividad. Estas características son requisitos primordiales para obtener lipasas con buenas perspectivas para su aplicación como aditivos en detergentes.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* IGB83 (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología), que resulta el principal motivo de este trabajo fue obtenida de la siguiente manera; la búsqueda inicial de bacterias lipolíticas incluyó el análisis de muestras de semillas, suelo y agua, estas muestras fueron analizadas por su habilidad de presentar crecimiento bacteriano en un medio mínimo con aceite de oliva como única fuente de carbono (Palmeros *et al*, 1994). En la selva tropical de Chiapas, en Barra de San José se obtuvieron las bacterias con mayor producción de actividad lipolítica y específicamente se obtuvo de un coco en descomposición. De todas las cepas colectadas, la IGB83 por presentar mayor actividad lipolítica fue seleccionada.

La clasificación taxonómica se llevó a cabo de acuerdo al Manual Bergey de sistemática bacteriológica (Knieg and Holt, 1984). Esta clasificación se realizó hasta genero y especie, de acuerdo con esto, la cepa resultó ser *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacterias de esta especie son bacilos gram negativos con uno o más flagelos polares, no producen cápsulas ni esporas, son aerobios estrictos y nitrificantes, una característica de esta especie es la producción de pigmentos de los que destaca uno de apariencia azul-verdoso denominado piocianina (Knieg and Holt, 1984).

Caracterización bioquímica de la lipasa producida por IGB83

La actividad lipolítica en IGB83 está parcialmente asociada al crecimiento, esta actividad es alta en cultivos en medio mínimo con aceite de oliva como la única fuente de carbono, es menor cuando se emplea glicerol y no es detectada cuando se utiliza glucosa o acetato. La actividad lipolítica fue expresada sólo en condiciones de baja aireación. La temperatura óptima a pH de 8.5 fue de 55°C, en tanto que la máxima actividad se encontró a pH de 10, tanto a 40 y 55°C. La vida media a pH de 8.5 y 55°C fue de 13 min. (Palmeros *et al.*, 1994).

Los sobrenadantes de cultivos con aceite de oliva fueron precipitados con 90% de sulfato de amonio, en estas condiciones se forman agregados de proteína y polisacáridos con alto peso molecular y mostraron alta actividad lipolítica. La actividad lipolítica de esta manera, presentó un punto isoeléctrico de 8. La lipasa de los sobrenadantes, una vez que se filtraron en gel, la electroforesis en condiciones nativas presentó un peso molecular aparente de 110 kD. La lipasa purificada de esta manera, fue analizada por SDS-PAGE y se encontró que migraba como una proteína de 58 kD (Palmeros *et al.*, 1994).

III. Justificación

De acuerdo a las propiedades bioquímicas que presentó la actividad lipolítica de *Pseudomonas aeruginosa* IGB83, nos propusimos la identificación del gen que codificara para esta lipasa. Es importante la caracterización genética del o los genes que codifican para las proteínas involucradas en la actividad lipolítica, puesto que contar con esta información es importante para la caracterización molecular de los genes respectivos. Lo anterior sobre todo, porque es conveniente lograr la expresión de la lipasa en huéspedes heterólogos, tomando en cuenta que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista para humanos por lo que su cultivo de manera industrial no es considerado como seguro de acuerdo a normas internacionales. La obtención de la lipasa en forma pura es necesaria para estudiar su especificidad de substratos y de esta manera poder determinar procesos biotecnológicos en los que la lipasa puede participar, para esto último la clonación de los genes de la lipasa y su chaperona en sistemas manipulables son importantes al tener controlada su producción y rendimiento.

Con la caracterización genética de la lipasa es posible también estudiar la regulación de la expresión de esta enzima, aspecto que aún no es conocido en su totalidad. La regulación del gen es importante por ser una enzima involucrada en la degradación de substratos lipídicos y además como una enzima que interviene en virulencia. Por último, discriminar si existe una regulación diferenciada de la lipasa entre ambas funciones.

Finalmente en nuestro caso particular, la identificación del gen respectivo tendría como consecuencia la confirmación de la novedad o no de la enzima lipolítica presente en la cepa IGB83.

IV. Objetivos

Objetivo general

Caracterización genética de la lipasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* IGB83.

Objetivos específicos

1. Identificación, clonación y secuenciación del gen que codifica para la lipasa principal en *P. aeruginosa* IGB83.
2. Mutación y complementación del gen *lipA* en IGB83.
3. Análisis de la región reguladora del gen *lipA* y construcción de fusiones transcripcionales.
4. Estudio de la regulación del gen *lipA* por quórum sensing y en diferentes condiciones de cultivo.

V. Métodos Experimentales

Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Todas las cepas y plásmidos utilizados están referidos en la **Tabla 3**. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio LB líquido o sólido (Sambrook *et al.*, 1989), medio FAM con aceite de oliva (1% vol/vol) y FAM con succinato (50 mM), (Palmeros *et al.*, 1994).

El medio FAM consta de los siguientes elementos: NaNO₃ 10 mM, KH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 16 mM, K₂SO₄ 1 mM, MgSO₄ 0.15 mM, CaCl₂ 0.06 mM, EDTA Fe³⁺ 0.01 mM, este medio fue complementado con 2.5 ml/lt de solución de elementos trazas que contiene ZnSO₄ 0.8 mM, MnSO₄ 1.1 mM, H₃BO₃ 0.9 mM, CuSO₄ 6 mM, Na₂MoO₄ 1.1 mM, CoCl₂ 0.2 mM, KI 0.4 mM y EDTA 0.3 mM. El pH fue ajustado a 8.5 antes de esterilizarse. Cuando fue necesario añadir ácido oleico este se complemento a 5.65 g/lt. El aceite de oliva y otros ácidos grasos fueron emulsionados en una licuadora doméstica por 15 min. Después de las cruas triparentales y para seleccionar el crecimiento exclusivo de las colonias transconjugantes de *P. aeruginosa* se utilizó medio PIA (Pseudomonas Isolation Agar) adquirida de Difco Co. Para extraer los autoinductores, se cultivó la cepa PAO1 en el medio PPGAS (medio limitado en fosfatos, adecuado para la producción de ramnolípidos, Wild *et al.*, 1997). Cuando se requirió de la preparación de medios sólidos, se añadió Bacto-Agar al 1.5%. Cuando fue necesario, se adicionó a los medios de cultivo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG; 10 ml/lt, de un concentrado de 200 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal; 75 ml/lt, de un concentrado de 20 mg/ml). Los antibióticos utilizados (Sigma Chemical Co.) se adicionaron en las siguientes concentraciones (μg/ml); en *E. coli* kanamicina 30, tetraciclina 15, ampicilina 100, para el caso de *P. aeruginosa* Tc 200 y carbenicilina 150.

Movilización de plásmidos

La movilización de las construcciones se llevó a cabo mediante cruas triparentales en *P. aeruginosa* con la ayuda del plásmido pRK2013 y para el caso de *E. coli* se realizaron transformaciones conforme a Sambrook *et al.*, (1989). En el caso de plásmidos no movilizables y cuando fue necesario introducirlos a *P. aeruginosa* se realizaron mediante transformaciones de acuerdo a Irani and Rowe (1997).

Tabla 3. Capas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas y/o plásmidos	Características relevantes	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
IGB83	Cepa silvestre	Palmeros <i>et al.</i> , 1994
IGB0	<i>lipA</i> ⁻ , Cb ^R	Este trabajo
PAO1	Cepa silvestre	Hancock and Carey, 1979
29.1	PAO1 mutada en <i>lipA</i>	Wohlfarth <i>et al.</i> , 1992
6.1	PAO1 mutada en <i>lif</i>	Wohlfarth <i>et al.</i> , 1992
PAK	Cepa silvestre	Ishimoto and Lory, 1989
PAKN1	PAK mutada en <i>rpoN::Tc</i>	Ishimoto and Lory, 1989
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>F-recA1 endA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44, gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 λ- (α 80dlacZ ΔM15).</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_B m_B) recA13 ara-14, proA2 lacY1 galK2 rpsL.20 xyl-5 mtl-1.</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plásmidos		
pUC19	Vector de clonación, <i>ColE1 lacI α80dlacZ Ap^R</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pMA558	pUC19 con el producto de 558 pb, obtenido por PCR.	Este trabajo
pMA13	pUC19 con 6.5 kpb de IGB83 que incluye <i>lipA</i> y <i>lif</i> .	Este trabajo
pMP220	incP Tc ^R , vector para realizar fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> .	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMA18	pMP220 con el fragmento de 6.5 kpb de IGB83 con <i>lipA</i> , <i>lif</i> .	Este trabajo
pMA19	pMP220 con <i>lipA::lacZ</i> en orientación correcta.	Este trabajo
pMA77	pMP220 con <i>lipA::lacZ</i> en orientación invertida.	Este trabajo
pRD58-2	pMP220, <i>rhIR::lacZ</i>	Diaz, 1998
pCGyC	PMP220, <i>rhIA::lacZ</i>	Medina, 2002
pSB1075	Construcción con <i>lasR</i> bajo <i>tac</i> , fusión <i>lasI::luxCDABE</i> . Ap ^R	Winson <i>et al.</i> , 1998
pSB406	<i>rhIR</i> bajo <i>tac</i> , <i>rhII::luxCDABE</i> . Ap ^R	Winson <i>et al.</i> , 1998
pCP13	Cósmido de bajo número de copias, Tc ^R Km ^R .	Friedman <i>et al.</i> , 1982
pMA721	pCP13 con el fragmento de 6.5 kpb de IGB83 con <i>lipA</i> , <i>lif</i> .	Este trabajo
pRK2013	Plásmido ayudador, ColE1 Tra ⁺ Mob ⁺ Km ^R .	Figurski and Helinski, 1979
pMT1	pUCP20 con <i>lasR</i>	Este trabajo
pGM	PUCP20 con <i>rhIR</i>	Medina, 2002

Cuantificación de actividad lipolítica

La determinación cualitativa de la actividad lipolítica se realizó en dos medios diferentes; un medio no específico, en el que se puede detectar actividad tanto de lipasas como estererasas, que fue LB con Tributirina al 1% y un medio específico para la detección de actividad de lipasas como fue el medio FAM con aceite de oliva al 1% y rodamina B al 0.001% (Kouker *et al.*, 1987). Las cajas se incubaron a 37°C (48-72 hrs) hasta la aparición de halo transparente en el caso de tributirina y mediante la observación de un halo fluorescente, en luz ultravioleta a 350 nm para el caso de rodamina B. Para la determinación cuantitativa de la actividad lipolítica en los sobrenadantes de los cultivos se utilizó como sustrato *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP) inicialmente homogeneizado en isopropanol (0.3%), la reacción se llevó a cabo a 55°C en buffer Tris-HCl 50 mM (0.015%), se cuantificó velocidad inicial en los primeros 10 min. de reacción. La absorbancia se leyó a 410 nm, el coeficiente de extinción para *p*-NPP en el buffer utilizado fue de 14,447 M⁻¹cm⁻¹ (Quinn *et al.*, 1982).

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras celulares fue determinada por el método de Lowry *et al.*, 1951.

Cuantificación de β-galactosidasa

Se realizaron cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de los diferentes medios requeridos. Los cultivos se incubaron a 30°C y 250 rpm. Las muestras tomadas fueron colocadas en tubos de micro-centrífuga y conservadas a -20°C por 24 hrs, antes de realizar la cuantificación de acuerdo a Miller (1972) con pequeñas modificaciones; con la finalidad de permeabilizar completamente a las células, se utilizó 10 µl de lisozima (20 mg/ml) por 10 min a 37°C y 10 µl de Tritón X-100 (10%) por muestra, antes de añadir el sustrato *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) y seguir la reacción de la enzima. Para obtener datos comparativos en todos los medios de cultivo empleados, los valores obtenidos de β-galactosidasa se estandarizaron por mg de proteína del paquete celular de cada muestra analizada, así una unidad Miller corresponde a 1 nm de *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido hidrolizado por minuto, por 1 D.O. 600 nm y donde se indica por mg de proteína.

Enzimas y Químicos

Las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa fueron adquiridas de Amersham Co. y Boehringer Co. Los Kits para la purificación de ácidos nucleicos fueron adquiridos de Gibco BRL. El ONPG, *p*-NPP, IPTG y X-gal fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. La enzima Vent^R DNA polimerasa fue adquirida de Biolabs Co.

Amplificación de ADN mediante PCR

Los primers para la obtención del gen *lip* de IGB83 fueron diseñados de acuerdo a las secuencias conservadas de 12 genes reportados que codifican para *lip*, estos genes están reportados en los bancos de datos, todos ellos de *Pseudomonas*. Dentro de este grupo de genes se encontraban 3 del grupo de *P. fluorescens*; para este grupo (1) el oligo de la región 5' fue: 5'-CCA AAA CGT TGT TCG CCG ATG CC-3', el oligo 3' fue: 5'-GCC CGC TGT TGT CGC GGA TCG-3'. En este caso se esperaba un producto de amplificación de ~650 pb.

Los restantes 9 genes codifican para proteínas de ~30 kD entre los que se encuentran *P. aeruginosa*, para este grupo (2) el oligo de la región 5' fue: 5'-GGT CAA CCT GCA GGG CCA CAG CCA CGG CG-3', el oligo de la región 3' fue: 5'-GAG GCT GCA GAC CTG GTT CAC CTC GTC CAG GTG G-3'. En este grupo tomando como referencia el gen *lip* de *P. aeruginosa*, se esperaba un producto de amplificación de 558 pb.

Los oligonucleótidos para amplificar *lipC* fueron diseñados basados en la secuencia del gen *lipC* de *P. aeruginosa* PAK reportada por Martínez *et al.*, (1999). La secuencia de estos primers son Fc; 5'-ACA AGA CGT TCC TCG CGG CG-3' Y Rc; 5'-AGT CCG ACG TTC CTG AGG CG-3'. En este caso se espera un producto de 915 pb.

Las reacciones de PCR fueron obtenidas en un volumen de 50 µl, la mezcla contiene 0.1 µg ADN genómico total de *P. aeruginosa* o bien 0.05 µg de ADN de plásmidos como templados, se emplearon 25 pmol de cada oligonucleotido, 0.25 mM de dNTPs, 1X de Buffer que contiene 1.25 mM de MgCl₂ y con 1 unidad de la enzima Vent^R ADN polimerasa (Biolabs Co), se utilizó el equipo RoboCycler Gradient 40 de Stratagene Co. Las condiciones de reacción son como sigue: 1 ciclo (95°C por 2 min.), 25 ciclos (95°C 45 seg.,

55°C 45 seg., 72°C por 1.5 min.) y 1 ciclo (72°C por 5 min.). Cuando fue necesario se empleo un buffer recomendado para amplificaciones a partir de templados con alto contenido de G+C, obtenido de Gibco BRL (buffer "enhancer").

Manipulación del ADN

El aislamiento de ADN a partir de plásmidos se realizó mediante miniprep por lisis alcalina de acuerdo a Sambrook *et al.*, (1989), para el caso de extracción de ADN genómico de *P. aeruginosa* se extrajo con el empleo de bromuro de hexadecil trimetil amonio –CTAB-, (Wild *et al.*, 1997). Los experimentos de hibridación, "nick translation", la restricción de ácidos nucleicos y la clonación en los diferentes vectores mediante ligación con T4 ADN ligasa fueron realizados como se describe por Sambrook *et al.*, (1989). Las reacciones de secuencia fueron realizadas utilizando la *Taq*^{fs} ADN polimerasa y terminadores dideoxi fluorescentes en un método de secuenciación por ciclos como se describe por Sanger *et al.*, (1977). Los fragmentos de ADN resultantes fueron separados por electroforesis y analizados automáticamente en un Applied Biosystems 377 ADN sequencer. Los ácidos nucleicos a hibridarse fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa N⁺ y fijados con NaOH 0.4 N. Los experimentos de nick translation utilizados para el marcado de sondas con ³²P se realizaron con un Kit adquirido de Amersham Co. Las exposiciones de las hibridaciones fueron observadas ya sea en películas Kodak de alta sensibilidad o bien en pantallas de Phosphorimager.

Identificación y clonación del gen *lipA* de IGB83

El producto obtenido mediante PCR, se híbrido contra un banco genómico de IGB83 construido en el cósmido pCP13 en HB101. Se identificó un cósmido denominado pMA721, a partir del cuál mediante digestión con *Bam*H1 se obtuvo un fragmento de 6.5 kb que contiene el operón de la lipasa y su chaperona (*lip* y *lif*). A partir de este fragmento se obtuvo la secuencia nucleotídica de la lipasa y este mismo fragmento fue clonado en diferentes vectores de expresión.

Construcción de la mutante de IGB83 en *lipA*

Un fragmento interno de *lip* de 558 pb obtenido mediante PCR con sitios de restricción *Pst*I en los extremos de los primers fue clonado en el sitio *Pst*I del vector pUC19. El vector

pUC19 resulta suicida en *Pseudomonas* puesto que no es capaz de replicarse. La construcción se realizó en *E. coli* y se transformó a *P. aeruginosa* IGB83 (Irani and Rowe, 1997) y se seleccionaron las cepas con el plásmido insertado (mutadas) en medio PIA Cb 150 µg/ml. Las colonias resistentes que son el producto de un evento de recombinación sencilla entre el plásmido pMA558 y el gen cromosomal *lip* provoca la inactivación de este gen en el cromosoma. Las cepas mutadas fueron analizadas por su deficiencia en la producción de lipasa en cajas petri con el medio FAM con aceite de oliva conteniendo rodamina B.

Construcción de la fusión transcripcional *lipA::lacZ*

Un fragmento de 1.2 kb de la porción 5' del gen de la lipasa, que comprende 65 pb de la región amino de *lip* fue clonado en ambos sentidos en la región upstream del gen para β-galactosidasa sin promotor en el vector pMP220 (Spaink *et al.*, 1987). Las construcciones analizadas en *E. coli* fueron conjugadas a diferentes cepas de *P. aeruginosa* con mutaciones reguladoras, la selección se realizó en medio LB Tc 150 µg/ml.

Purificación de autoinductores

La purificación de autoinductores fue realizada como se describe en Pearson *et al.*, 1995. La cepa PAO1 fue cultivada por 48 horas en medio PPGAS, el sobrenadante de este cultivo fue extraído dos veces con un volumen de acetato de etilo y puesto a evaporar. El residuo resultante fue extraído una vez con metanol a 1/500 del volumen original y finalmente fue resuspendido en acetato de etilo a 1/500 del volumen original. La presencia de N-butanoil homoserina lactona y N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona fueron detectados por medio de su actividad biológica utilizando biosensores construidos y descritos por Winson *et al.*, 1998. La mezcla de autoinductores, purificado de esta manera fue empleada en una dilución 1/500 en los experimentos requeridos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El SDS-PAGE discontinuo fue llevado a cabo empleando geles de poliacrilamida al 12.5%. Las muestras fueron tratadas como se describe en Laemmli, 1970. Los geles fueron teñidos con Coomassie brilliant blue G-250 siguiendo las instrucciones del fabricante. Los marcadores de peso molecular fueron adquiridos Sigma Chemical Co.

Análisis computacional de las secuencias de proteínas y ADN

La búsqueda de secuencias similares fue realizada con el uso del servicio de BLAST network (base de datos del National Center for Biotechnology Information). Los análisis de restricción y la comparación entre secuencias conocidas se realizaron con la utilización del programa GENE WORKS (IntelliGenetics. Inc.) y los programas de la Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group (UWGCG). La búsqueda de posible secuencia señal en los diferentes péptidos se realizó con el programa www Signal VI.1, Nielsen *et al.*, 1997. Para la predicción de los pesos moleculares y pI se utilizó el ExPasy Home Page con el programa ProtParam tool. Para el análisis de los marcos de lectura abierta (ORF) en genomas con alto contenido de G+C se utilizó el programa desarrollado por Ishikawa and Kunitomo, 1999.

VI. Resultados y Discusión

Identificación del gen que codifica para la lipasa en la cepa IGB83

Como se mencionó en el apartado de los antecedentes, la actividad lipolítica producida por la cepa IGB83 estaba relacionada con una banda proteica con peso molecular aparente de 58 kD, esto se determinó mediante electroforesis en condición desnaturalizante. Las lipasas de *P. aeruginosa* reportadas hasta ahora son invariablemente de 30 kD y como se había definido que la cepa IGB83 era *P. aeruginosa* se presentaba una aparente discordancia. Las propiedades bioquímicas alcalinas y de cierta termorresistencia de la lipasa de la IGB83 y la ausencia de reportes específicos en estos aspectos de otras lipasas producidas por *P. aeruginosa* condujo a pensar que quizá la lipasa de IGB83 estuviera codificada por un gen más grande que los respectivos para las otras lipasas reportadas, que resultara finalmente en una estructura proteica más grande, con una estructuración diferente y que, por lo tanto resultaría en una enzima con propiedades diferentes. Sin embargo, en esta especulación también se tomó en cuenta que el peso molecular aparente encontrado en los geles de poliacrilamida bien pudiera deberse a una dimerización de los monómeros de 30 kD y que finalmente, las propiedades bioquímicas de las lipasas de *P. aeruginosa* no fueran diferentes. Por otro lado, si se encontrara genes con tamaño parecido que codificaran para enzimas con propiedades bioquímicas diferentes sería interesante.

De esta manera, resultó fundamental conocer la secuencia del gen que codifica para la lipasa responsable de la actividad lipolítica encontrada en IGB83. Con esta finalidad, se realizaron alineamientos de las secuencias nucleotídicas de genes que codifican para lipasas en otras cepas de *Pseudomonas* disponibles en los bancos de datos. En la **Figura 6** se muestra el resultado de la comparación de 12 secuencias de nucleótidos que codifican para lipasas en diferentes especies de *Pseudomonas*.

Un primer análisis de la comparación de estas secuencias nos indica que pueden ser divididas en dos grupos: por un lado, el grupo 1 en donde están contenidos los genes que codifican para lipasas en cepas de *P. fluorescens*. Este grupo de genes codifica para lipasas con peso molecular de ~46 kD y constituyen las lipasas más grandes del género *Pseudomonas*. En el grupo 2 se encuentra los genes que codifican para lipasas

en las demás especies de *Pseudomonas*, se puede observar a su vez claramente los subgrupos que corresponden a *P. aeruginosa* y a *P. fragi*, todos estos genes codifican para lipasas iguales o menores a 30 kD.

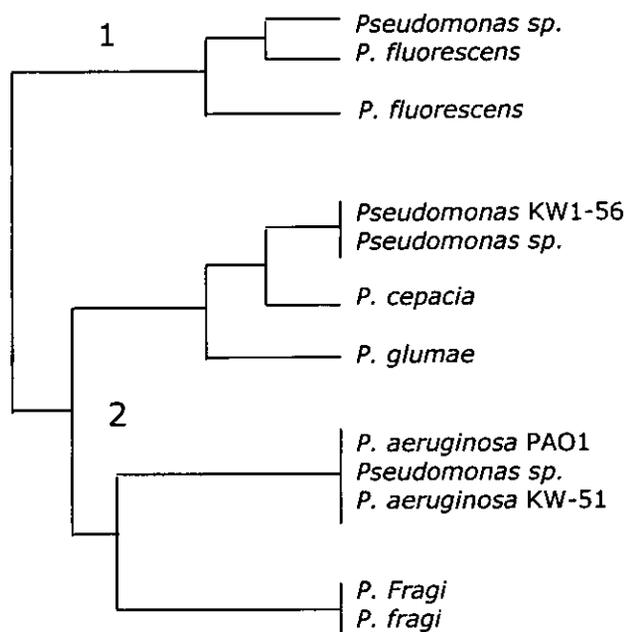


Figura 6. Comparación de secuencias nucleotídicas de genes que codifican para lipasas.

Puesto que el tamaño aparente de la lipasa de IGB83 determinado en SDS-PAGE se acerca al del primer grupo, pero la cepa fue identificada como *P. aeruginosa*, se decidió sintetizar un par de oligonucleótidos para cada uno de estos dos grupos de genes, en base a las regiones más conservadas de cada grupo, de tal manera que nos permitiera obtener productos de amplificación por PCR.

Se procedió entonces a la extracción de ADN cromosomal de la cepa IGB83 para realizar las reacciones de PCR, al par de oligos del grupo 1 se denominó de *P. fluorescens* y al segundo par de oligos se denominó de *P. aeruginosa*. En la **Figura 7** se presenta el producto obtenido mediante PCR en las condiciones que se menciona en el apartado de Métodos Experimentales. Sólo se obtuvo producto de PCR con los oligos del grupo de *P. aeruginosa* que coincide con que la cepa IGB83 es *P. aeruginosa*.

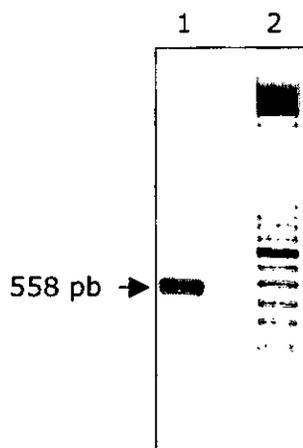


Figura 7. PCR obtenido con los oligos del grupo de *P. aeruginosa*, utilizando como templado ADN cromosomal de IGB83 (1), marcador de PM de 100 pb (2).

El siguiente paso para identificar el gen *lip* en IGB83 fue recurrir a un banco genómico de la cepa IGB83 construida en el cósmido pCP13 (Wild *et al.*, 1997). Este banco se encuentra contenido en tres mil colonias de *E. coli* HB101. Se procedió a realizar una hibridación en colonia utilizando como sonda el fragmento de 558 pb obtenido por PCR, marcado con ^{32}P (random primer).

Se identificó el cósmido 721 denominado ahora pMA721. El cósmido fué digerido con diferentes enzimas de restricción y las digestiones fueron hibridadas con el fragmento de 558 pb, esto con la finalidad de obtener una región de ADN más pequeño que nos permitiera su fácil manipulación para obtener por un lado la secuencia completa del gen *lip* y también para realizar complementaciones o expresión de la enzima en huéspedes heterólogos. Finalmente logramos identificar un fragmento *Bam*H1 de 6.5 kb que hibrida con el producto de PCR, este fragmento nos sirvió para los propósitos mencionados y que se describirán enseguida. Un análisis final de este fragmento mostró el arreglo presentado en la **Figura 8**. En la figura se señala la región secuenciada de IGB83 y el resto se dedujo por homología con el genoma de PAO1 (que es la cepa tipo de laboratorio donde se ha estudiado en mayor medida la genética molecular de *P. aeruginosa*, esta cepa fue inicialmente aislada de una infección de oído, (www.pseudomonas.com)).

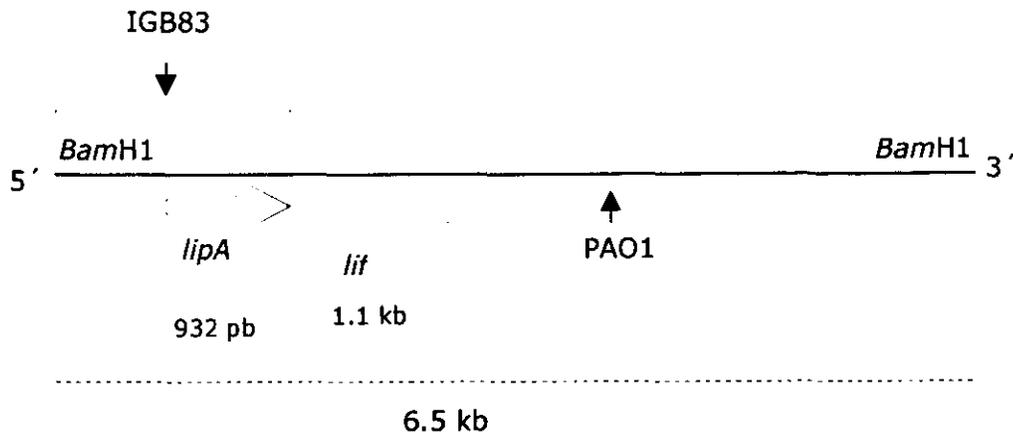


Figura 8. Fragmento de 6.5 kb de IGB83 obtenido a partir de cósmido pMA721.

Este mismo fragmento genómico de 6.5 kb ahora fue clonado en dos plásmidos replicables en *Pseudomonas* pero con diferente resistencia a antibióticos con la finalidad de obtener la secuencia de nucleótidos y para realizar complementaciones en diferentes cepas de *P. aeruginosa*. En la **Figura 9** se esquematiza el arreglo final de estas construcciones.

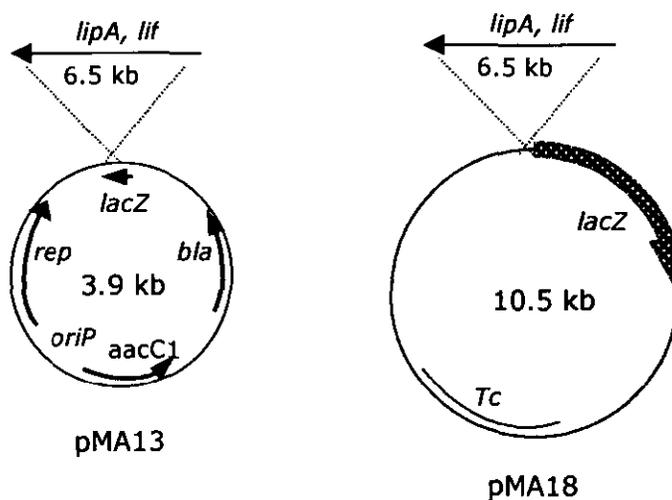


Figura 9. Construcciones realizadas con el fragmento de 6.5 kb (*lip* y *lif*) en pUCP20 (pMA13) y en pMP220 (pMA18), los dibujos no están a escala.

Con la finalidad de saber si sólo había una copia de este gen *lip* en el cromosoma de IGB83 decidimos realizar una hibridación tipo southern con el fragmento de PCR contra el cromosoma de IGB83 y de PAO1, esta última cepa produce una lipasa bien conocida de 30 kD. En la **Figura 10** se muestra el patrón de hibridación obtenido en ambas cepas.

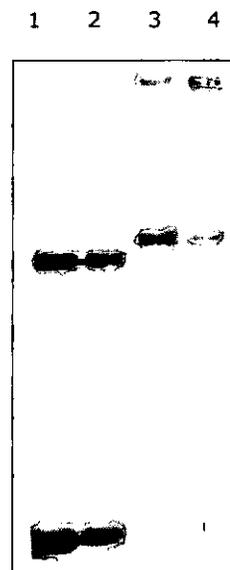


Figura 10. Hibridación tipo southern utilizando como sonda un fragmento interno de *lipA*. 1) ADN de IGB83 digerido con *Pst*I, 2) ADN de PAO1 digerido con *Pst*I, 3) ADN de IGB83 digerido con *Eco*R1 y 4) ADN de PAO1 digerido con *Eco*R1.

Analizando estos resultados podemos decir que se encuentra una sola copia del gen que codifica para esta lipasa y que además se encuentra en un arreglo idéntico en ambas cepas de *P. aeruginosa*.

Obtención y análisis de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la lipasa en IGB83

A partir del fragmento de 6.5 kb obtenido del banco genómico de IGB83 se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del gen que codifica para la lipasa y de un fragmento de 1.45 kb de la región 5'. La secuencia de nucleótidos obtenida fue analizada mediante un programa para bacterias con alto contenido de G+C en su genoma (Ishikawa and Kunimoto, 1999). Los resultados son mostrados en la **Figura 11**,

tomando en cuenta el uso preferencial de codones en *Pseudomonas* los resultados confirman el marco de lectura abierta en la misma fase. Se obtiene un contenido de G+C en el gen *lipA* del 85% y en la tercera posición de los codones el empleo de G ó C es del 97%, esta característica es típica para esta bacteria. La identidad de esta secuencia obtenida de IGB83 respecto a la secuencia de PAO1 resulta ser del 99% tanto en la región codificante como en la no codificante.

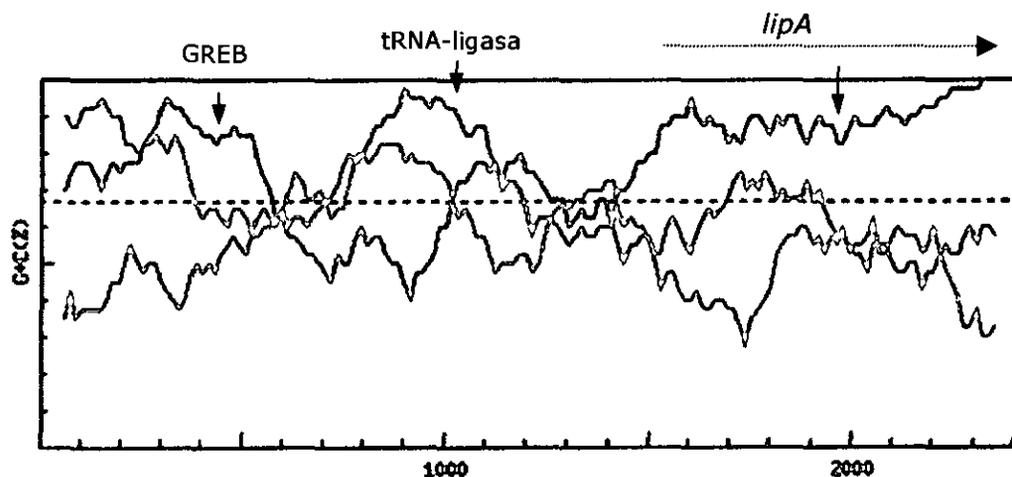


Figura 11. Búsqueda de ORFs de la región secuenciada en IGB83 (2.43 kb). Los ORFs que corresponden al factor de elongación (GREB) y para la tARN ligasa se encuentran incompletas como se menciona en el texto.

Mediante un análisis de la traducción de este marco de lectura abierto se encuentra que el gen codifica para un polipéptido de 311 aminoácidos. La traducción es mostrada en la **Figura 12** y como se esperaba resulta ser 99% idéntica a la secuencia peptídica respectiva de *P. aeruginosa* PAO1.

CTCGGCCCA	TCAACCTGAG	ATGAGAACAA	CATGA AAGAAG	AAGTCTCTGC	1500
			M K K	K S S L	
TCCCCCTCGG	CCTGGCCATC	GGCCTCGCCT	CTCTCGCTGC	CAGCCCTCTG	1550
P L G	L A I	G L A S	L A A	S P L	
ATCCAGGCCA	CGACCTACAC	CCAGACCAA	TACCCCATCG	TGCTGGCCCA	1600
I Q A S	T Y T	Q T Y	Y P I V	L A H	
CGGCATGCTC	GGCTTCGACA	ACATTCTCGG	GGTCGACTAC	TGGTTCGGCA	1650
G M L	G F D N	I L G	V D Y	W F G I	
TTCCAGCGC	CTTGCGCCGT	GACGGTGCC	AGGTCTACGT	CACCGAAGTC	1700
P S A	L R R	D G A Q	V Y V	T E V	
AGCCAGTTGG	ACACCTCGGA	AGTCCGCGG	GAGCAGTTGC	TGCAACAGGT	1750
S Q L D	T S E	V R G	E Q L L	Q Q V	
GGAGGAAATC	GTCGCCCTCA	GCGGTCAGCC	CAAGGTCAAC	CTGATCGGCC	1800
E E I	V A L S	G Q P	K V N	L I G H	

ACAGCCACGG	CGGGCCGACC	ATCCGCTACG	TCGCCGCCGT	ACGTCCCAGC	1850
<u>S</u> H G G P T I R Y V A A V R P D					
CTGATCGCTT	CCGCCACCAG	CGTCGGCGCC	CCGCACAAGG	GTTTCGGACAC	1900
L I A S A T S V G A P H K G S D T					
CGCCGACTTC	CTGCGCCAGA	TCCCACCGGG	TTCGGCCGGC	GACGCAATCC	1950
A D F L R Q I P P G S A G E A I L					
TCTCCGGGCT	GGTCAACAGC	CTCGGCGCGC	TGATCAGCTT	CCTTTCCAGC	2000
S G L V N S L G A L I S F L S S					
GGCAGCACCG	GTACGCAGAA	TTCACTGGGC	TCGCTGGAGT	CGCTGAACAG	2050
G S T G T Q N S L G S L E S L N S					
CGAGGGGGCC	GCGCGCTTCA	ACGCCAAGTA	CCCACAGGGC	ATCCCCACCT	2100
E G A A R F N A K Y P Q G I P T S					
CGGCCTCGCG	CGAAGGCGCC	TACAAGGTCA	ACGGCGTGAG	CTATTACTCC	2150
A C G E G A Y K V N G V S Y Y S					
TGGAGCGGTT	CCTCGCCGCT	GACCAACTTC	CTCGATCCGA	GCGACGCCTC	2200
W S G S S P L T N F L D P S D A F					
CCTCGGGGCC	TCGTCGCTGA	CCTTCAAGAA	CGGCACCGCC	AACGACGGCC	2250
L G A S S L T F K N G T A N D G L					
TGGTCGGCAC	CTGCAGTTCG	CACCTGGGCA	TGGTGATCCG	CGACAACACTAC	2300
V G T C S S H L G M V I R D N Y					
CGGATGAACC	ACCTGGACCA	GGTGAACCAG	GTCTTCGGCC	TCACCAGCCT	2350
R M N H L D Q V N Q V F G L T S L					
GTTTCGAGACC	AGCCCGGTCA	GCGTCTACCG	CCAGCACGCC	AACCGCCTGA	2400
F E T S P V S V Y R Q H A N R L K					
AGAACGCCAG	CCTGTAG				2417
N A S L *					

Figura 12. Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la lipasa en *P. aeruginosa* IGB83; en la figura se presenta la traducción de los codones respectivos, los aminoácidos que conforman la triada catalítica están subrayados y el codón de terminación está representado por *.

La secuencia de aminoácidos obtenida fue comparada con la secuencia de otras lipasas de *P. aeruginosa* reportadas a la fecha y encontramos una identidad del 92% entre estas enzimas. En la **Figura 13** se muestra el alineamiento de aminoácidos de las lipasas reportadas en cepas de *P. aeruginosa*. En todo el grupo sólo existen cambios en 7 aminoácidos.

Sp. 109	MKKKSLLPLG	LAIGLASLAA	SPLIQASTYT	QTKYOIVLAH	GMLGFDNILG	50
ATCC31156	MKKKSLLPLG	LAIGLASLAA	SPLIQASTYT	QTKYOIVLAH	GMLGFDNILG	50
PA01	MKKKSLLPLG	LAIGLASLAA	SPLIQASTYT	QTKYOIVLAH	GMLGFDNILG	50
TE3285	MKKKSLLPLG	LAIGLASLAA	SPLIQASTYT	QTKYOIVLAH	GMLGFDNILG	50
IGB83	MKKKSLLPLG	LAIGLASLAA	SPLIQASTYT	QTKYOIVLAH	GMLGFDNILG	50
Consenso	MKKKSLLPLG	LAIGLASLAA	SPLIQASTYT	QTKYOIVLAH	GMLGFDNILG	50

Sp. 109	VDYWFGIPSA	LRRDGAQVYV	TEVSQLDTSE	VRGEQLLQOV	EEIVALSGQP	100
ATCC31156	VDYWFGIPSA	LRRDGAQVYV	TEVSQLDTSE	VRGEQLLQOV	EEIVALSGQP	100
PA01	VDYWFGIPSA	LRRDGAQVYV	TEVSQLDTSE	VRGEQLLQOV	EEIVALSGQP	100
TE3285	VDYWFGIPSA	LRRDGAQVYV	TEVSQLDTSE	VRGEQLLQOV	EEIVALSGQP	100
IGB83	VDYWFGIPSA	LRRDGAQVYV	TEVSQLDTSE	VRGEQLLQOV	EEIVALSGQP	100
Consenso	VDYWFGIPSA	LRRDGAQVYV	TEVSQLDTSE	VRGEQLLQOV	EEIVALSGQP	100
Sp. 109	▼ KVNLI GH SHG	GPTIRYVAAV	RPDL M PSATS	VGAPHKGS	ADFLRQIPPG	150
ATCC31156	KVNLI GH SHG	GPTIRYVAAV	RPDLIASATS	VGAPHKGS	ADFLRQIPPG	150
PA01	KVNLI GH SHG	GPTIRYVAAV	RPDLIASATS	VGAPHKGS	ADFLRQIPPG	150
TE3285	KVNLI GH SHG	GPTIRYVAAV	RPDLIASATS	VGAPHKGS	ADFLRQIPPG	150
IGB83	KVNLI GH SHG	GPTIRYVAAV	RPDLIASATS	VGAPHKGS	ADFLRQIPPG	150
Consenso	KVNLI GH SHG	GPTIRYVAAV	RPDLIASATS	VGAPHKGS	ADFLRQIPPG	150
Sp. 109	SAGEAVLSGL	VNSL G ALISF	LSSGSAGTQ N	SLGSLESLNS	EGAARFNAKY	200
ATCC31156	SAGEAVLSGL	VNSL G ALISF	LSSGSTGTQ N	SLGSLESLNS	EGAARFNAKY	200
PA01	SAGEAVLSGL	VNSL G ALISF	LSSGSTGTQ N	SLGSLESLNS	EGAARFNAKY	200
TE3285	SAGEAVLSGL	VNSL G ALISF	LSSGSTGTQ N	SLGSLESLNS	EGAARFNAKY	200
IGB83	SAGEAVLSGL	VNSL G ALISF	LSSGSTGTQ N	SLGSLESLNS	EGAARFNAKY	200
Consenso	SAGEAVLSGL	VNSL G ALISF	LSSGSTGTQ N	SLGSLESLNS	EGAARFNAKY	200
Sp. 109	PQGIPTSACG	EGAYKVNGVS	YYSWSGSSPL	TNFLDPSDAF	LGASSLTFKN	250
ATCC31156	PQGVPTSACG	EGAYKVNGVS	YYSWSGSSPL	TNFLDPSDAF	LGASSLTFKN	250
PA01	PQGIPTSACG	EGAYKVNGVS	YYSWSGSSPL	TNFLDPSDAF	LGASSLTFKN	250
TE3285	PHGVPTSACG	EGAYKVNGVS	YYSWSGSSPL	TNFLDPSDAF	LGASSLTFKN	250
IGB83	PQGIPTSACG	EGAYKVNGVS	YYSWSGSSPL	TNFLDPSDAF	LGASSLTFKN	250
Consenso	PQGIPTSACG	EGAYKVNGVS	YYSWSGSSPL	TNFLDPSDAF	LGASSLTFKN	250
Sp. 109	▼ GTANDGLVGT	CSSHLGMVIR	▼ DNYRMNHLDE	VNQVFGLTSL	FETSPVSVYR	300
ATCC31156	GTANDGLVGT	CSSHLGMVIR	DNYRMNHLDE	VNQVFGLTSL	FETSPVSVYR	300
PA01	GTANDGLVGT	CSSHLGMVIR	DNYRMNHLDE	VNQVFGLTSL	FETSPVSVYR	300
TE3285	GTANDGLVGT	CSSHLGMVIR	DNYRMNHLDE	VNQVFGLTSL	FETSPVSVYR	300
IGB83	GTANDGLVGT	CSSHLGMVIR	DNYRMNHL DQ	VNQVFGLTSL	FETSPVSVYR	300
Consenso	GTANDGLVGT	CSSHLGMVIR	DNYRMNHLDE	VNQVFGLTSL	FETSPVSVYR	300
Sp. 109	QHANRLKNAS	L				311
ATCC31156	QHANRLKNAS	L				311
PA01	QHANRLKNAS	L				311
TE3285	QHANRLKNAS	L				311
IGB83	QHANRLKNAS	L				311
Consenso	QHANRLKNAS	L				311

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las lipasas de *P. aeruginosa*, los aminoácidos que son diferentes están escritos en negro y los aminoácidos que constituyen la triada catalítica están señalados con una flecha.

El cambio que pudiera ser más significativo pero que no hemos explorado consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico por una glutamina a solo tres posiciones

de la histidina que es parte de la triada catalítica, este cambio pudiera estar modificando la carga en esta región proteica posiblemente con un efecto en la actividad o especificidad de la lipasa aunque parece no ser el caso ya que al menos la lipasa de PAO1 e IGB83 presentan el mismo perfil de actividad y la posición de la substitución se ubica en la parte externa del loop de la cadena $\beta 8$ respecto a la región catalítica (**Figura 1**), aun así no hemos explorado en lo que se refiere a la especificidad.

Utilizando la secuencia de aminoácidos traducida del gen *lip* de IGB83, se realizó un análisis de predicción de peso molecular, posible secuencia señal y pI. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Análisis predictivo de las propiedades correspondientes al polipéptido Lip de IGB83.

Proteína	Péptido señal	Aminoácidos	PM (kD)	pI
Inmadura	26	311	32.7	6.65
Madura	-	285	30.15	5.95

Hasta aquí, se había identificado un gen *lip* que es idéntico a los presentes en otras cepas de *P. aeruginosa*, sin embargo, aún existía la posibilidad de que la actividad lipolítica identificada en la cepa IGB83 estuviera codificada en un gen diferente y no hubiera sido amplificado con estos oligos y como consecuencia tampoco hubiera sido identificada en los cósmidos que contienen el banco genómico de IGB83. De esta manera, la mutagénesis de este gen identificado resultó de primordial importancia para determinar si existe otro gen responsable de la actividad lipolítica en la cepa IGB83.

Mutagénesis del gen *lip* en IGB83

En la **Figura 14** se presenta los pasos que se llevan a cabo para interrumpir el gen *lip* en el cromosoma de IGB83; el producto de 558 pb obtenido mediante PCR fue clonado en el sitio *Pst*I del plásmido pUC19 originando de esta manera el plásmido pMA558, este plásmido al carecer de un origen de replicación de *Pseudomonas* es incapaz de replicarse en estas bacterias y se constituye como un plásmido suicida. De esta manera al transformar a IGB83 con esta construcción y seleccionando colonias resistentes a

carbenicilina se obtienen cepas con una inserción del plásmido pMA558 en el gen de la lipasa del cromosoma del IGB83 (mediante recombinación homóloga).

Tres colonias resistentes a carbenicilina fueron analizadas. Se les extrajo ADN cromosomal al igual que a la cepa silvestre IGB83, los ADNs fueron digeridos con *Bam*H1 (ya que la digestión con esta endonucleasa resulta en un fragmento de 6.5 kb donde está la lipasa). Estos ADNs digeridos fueron hibridados con el fragmento de 558 pb marcado con 32 P. En la **Figura 14-C** se presenta el patrón de hibridación esperado, una sola banda en la IGB83 y una banda adicional en IGB0 (una de las mutantes) como consecuencia de la adición de un sitio *Bam*H1 presente en el plásmido pMA558, las tres colonias candidatas presentaron el mismo patrón de hibridación.

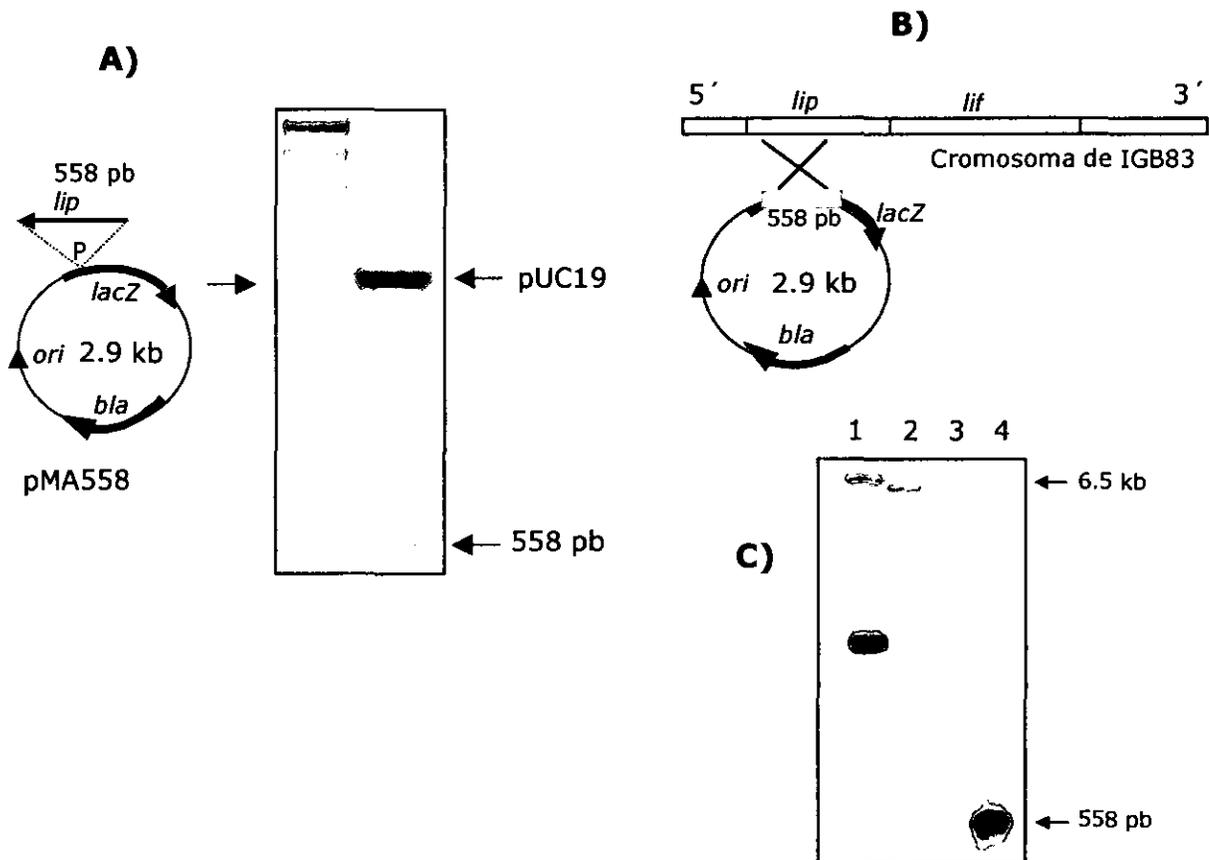


Figura 14. A) representación esquemática de la interrupción del gen *lip* en IGB83. B) evento de recombinación homóloga con el gen *lip* cromosomal y C) Hibridación genómica con el fragmento de 558 pb; 1) ADN cromosomal de IGB0 (*lip*⁻) digerido con *Bam*H1, 2) ADN cromosomal de IGB83 digerido con *Bam*H1, 3) λ HindIII como control negativo y 4) Fragmento de 558pb como control positivo.

Una de las colonias mutadas (IGB0) fue crecida en medio FAM-aceite de oliva para analizar la actividad lipolítica en el sobrenadante extracelular. El crecimiento de la cepa mutada IGB0 es similar al de la cepa silvestre IGB83. En la **Figura 15** se muestra la carencia de la actividad lipolítica en el sobrenadante de la cepa mutada IGB0. La actividad lipolítica es medida como fluorescencia de rodamina B y es específica para determinar actividad lipolítica (**Figura 15-A**). La cuantificación de la actividad lipolítica extracelular se realizó mediante la liberación de *p*-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenilpalmitato, aunque esta es una reacción que puede ser llevada a cabo también por esterasas, puede ser utilizado perfectamente para la cuantificación lipolítica a pH de 8.5 y 55°C (**Figura 15-B**).

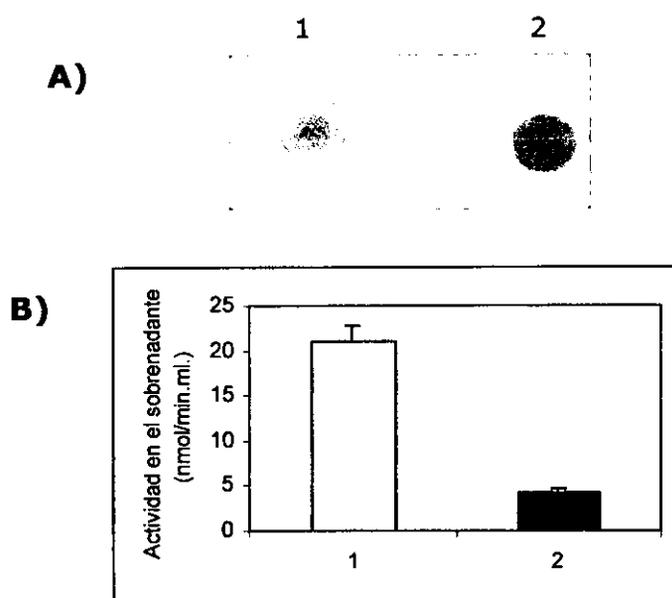


Figura 15. Actividad lipolítica en las cepas silvestre IGB83 y en la cepa mutada en la lipasa (IGB0). **A)** Actividad cualitativa en rodamina B; 1) IGB83 y 2) IGB0. **B)** Cuantificación de actividad lipolítica con *p*-nitrofenilpalmitato.

Las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivos crecidos en medio FAM-aceite de oliva fueron analizadas mediante SDS-PAGE, el resultado reveló la ausencia de una banda de 30 kD en la cepa IGB0 y la disminución de una segunda banda en el rango de 58 kD, en intentos previos por obtener la secuencia peptídica de la lipasa se cortó el fragmento del gel donde migra la banda de 58 kD y se mandó secuenciar, los resultados indicaron la presencia de una amino peptidasa en esta región, por lo que se

sabe que comigran al menos dos proteínas (lipasa y amino peptidasa) en esta zona. (Figura 16).

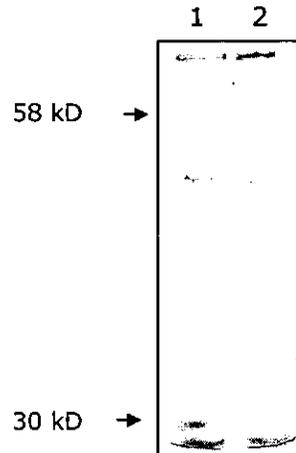


Figura 16. Análisis del perfil de proteínas extracelulares en cultivos de FAM-aceite de oliva. 1) IGB83 y 2) IGB0.

El análisis de la actividad lipolítica en la cepa IGB0 nos indica que el gen identificado y mutado codifica para la lipasa responsable de la principal actividad lipolítica en la cepa IGB83, por lo que denominamos a este gen *lipA*. La banda de 58kD es probablemente un dímero de la de 30kD que no se desnaturaliza aún en las condiciones desnaturalizantes ensayadas, una situación parecida sucede con la lipasa producida por *S. cinnamomeous* (Sommer *et al.*, 1997). La agregación de la enzima con lipopolisacáridos (LPS) aún en los últimos pasos de purificación, puede explicar la diferencia de punto isoeléctrico (pI) predicho y el experimental (Tabla 4), ya que en el caso de IGB83 el pI experimental es de 8.0 (Palmeros *et al.*, 1994).

Complementación de la cepa IGB0

La complementación de la actividad lipolítica en la cepa IGB0 se realizó con el plásmido pMA18 cuya transferencia fue seleccionada por la resistencia a tetraciclina. En la Figura 17 se muestra la complementación de la actividad lipolítica en la cepa mutada IGB0.

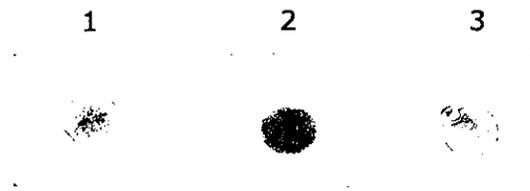


Figura 17. Complementación de la actividad lipolítica en la cepa IGB0. Se analizó la actividad lipolítica de los sobrenadantes del cultivo en FAM-aceite de olivo. 1) IGB83, 2) IGB0 y 3) IGB0 con pMA18.

En *P. aeruginosa* el gen que codifica para la lipasa se encuentra en un operón junto con el gen que codifica para su foldasa específica. Como ya habíamos mencionado, la cepa representativa de *P. aeruginosa* es PAO1 y disponemos de las cepas derivadas de PAO1 mutantes tanto de la lipasa (29.1) como en la foldasa de la lipasa (6.1). Con la finalidad de comprobar la identidad funcional entre las lipasas de PAO1 e IGB83 decidimos complementar a la cepa 29.1 con el fragmento de ADN de IGB83 que contiene a la lipasa. Por otro lado, para determinar si en el fragmento de 6.5 kb de IGB83 se encuentra contenido el gen de la foldasa de la lipasa, complementamos a la cepa PAO 6.1.

De esta manera, el plásmido pMA13 que contiene el fragmento de ADN que codifica para la lipasa de IGB83 fue transferido a estas cepas mutadas de PAO1. En la **Figura 18** se presentan las complementaciones de las cepas PAO1. Con estos resultados determinamos la funcionalidad de los genes *lip* y *lif* de la cepa IGB83 en el fondo genético de la PAO1 y el probable arreglo similar de la lipasa y su chaperona en ambas cepas.

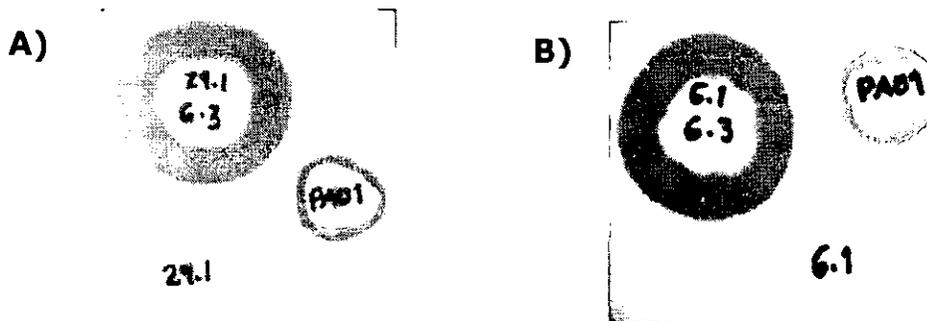


Figura 18. A) complementación de cepas mutadas de PAO1 en *lip* (29.1) y B) *lif* (6.1) con el plásmido pMA13 que contiene el fragmento de 6.5 kb de IGB83. Las cepas fueron crecidas en medio LB con tributirina al 1% (v/v) a 30°C por 24 hrs.

Finalmente decidimos probar un perfil de actividad lipolítica en las cepas PAO1 e IGB83 para determinar las propiedades bioquímicas, a estas alturas del trabajo ya esperamos un parecido en las propiedades bioquímicas de ambas lipasas. Los sobrenadantes de ambas cepas presentaron actividad lipolítica óptima a pH de 8.5 y 55°C. En la **Figura 19** observamos el perfil de actividad lipolítica de los sobrenadates de cultivos en aceite de oliva a las 14 horas, el perfil de actividad con *p*-nitrofenilpalmitato de la cepa PAO1 es similar al obtenido con la cepa IGB83.

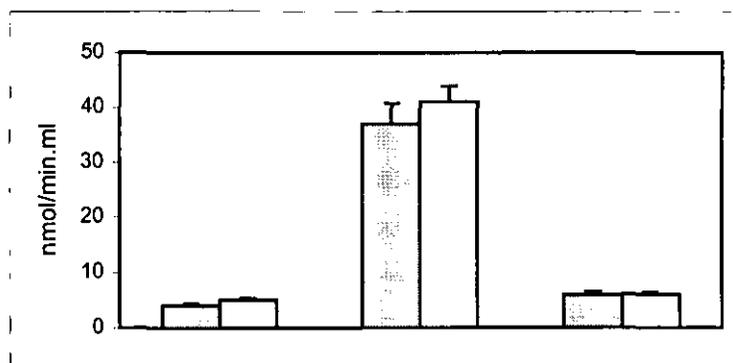


Figura 19. Perfil de actividad lipolítica de sobrenadantes de PAO1 (■) e IGB83 (□).

Identificación de una segunda lipasa en IGB83

Hasta el desarrollo de este trabajo se tenía contados ejemplos de la producción de más de una lipasa en una cepa, para el caso de *Pseudomonas* no se tenía reporte de la producción de más de una lipasa por cepa. Sin embargo, durante el proceso de este trabajo apareció el reporte de una segunda lipasa en *P. aeruginosa* PAK (Martínez *et al.*, 1999.). Esta segunda lipasa es expresada en cantidades muy pequeñas en el fondo genético de PAK y apenas es detectada en una cepa mutada en la lipasa principal LipA. Con la finalidad de conocer si esta segunda lipasa también se encuentra en IGB83 se diseñaron oligonucleótidos de acuerdo a la secuencia reportada. Para la región 5'; 5'-ACA AGA CGT TCC TCG CGG CG-3' y para la región 3':5'-AGT CCG ACG TTC CTG AGG CG-3'. Se esperaba un producto de 915 pb. En la **Figura 20** se muestra los resultados de las reacciones de PCR con las cepas PAO1 e IGB83.

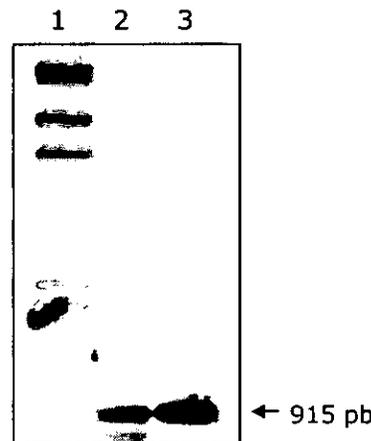


Figura 20. Reacciones de PCR con los oligos de *lipC*. 1) Marcador de peso molecular λ HindIII. Utilizando como templado ADN cromosomal de 2) IGB83 y 3) PAO1.

Esta segunda lipasa amplificada en IGB83 y PAO1 mostró alta identidad con la producida por la cepa PAK reportada. Lo anterior se concluyó por la búsqueda del gen correspondiente en el genoma secuenciado de PAO1 (www.Pseudomonas.com) y su comparación con la secuencia de la cepa PAK reportada, ambas muestran un 99% de identidad en aminoácidos y tomando en cuenta la alta identidad de secuencia entre PAO1 e IGB83. Esta segunda lipasa LipC reportada en PAK es 52% idéntica a LipA de

PAO1 e IGB83 en lo que respecta a aminoácidos. Es probable que la actividad lipolítica residual que se observa en algunos experimentos se deba a esta segunda lipasa o bien a cualquiera de las otras enzimas lipolíticas presentes en *P. aeruginosa*.

Análisis de la región reguladora del gen *lipA* que codifica para la principal lipasa en *P. aeruginosa* IGB83.

La expresión de los genes que necesitan ser regulados bajo ciertas condiciones de cultivo se lleva a cabo por proteínas reguladoras y los sitios blancos de regulación generalmente se encuentran en la región 5' de los genes a ser regulados. Tomando en cuenta la sugerencia de que la lipasa es regulada por quórum sensing y este tipo de regulación está dada por una región de regulación con un tamaño de ~20 pb con el consenso CT-N₁₂-AG, este sitio es denominado como caja *lux* por ser el sitio de unión de las proteínas reguladoras homólogas a LuxR. Una vez que la proteína reguladora es unida al autoinductor, este complejo se pega al sitio denominado caja *lux* para inducir la expresión del gen respectivo. En este sentido, secuenciamos 1450 pb de la región 5' del gen que codifica para lipasa con la finalidad de localizar promotores y posibles sitios blanco de regulación, en particular, la localización de una caja *lux*. En la **Figura 21** se muestra la región 5' de *lip* en IGB38.

GAACCGGGTG	TACTTCGGCG	CCTGGGTGAC	CCTGGAAGAC	GAAGACGGCG	50
AGCAGGCCCG	CTATCGCATC	GTCGGCCCCG	ACGAACTGGA	CCTGCGCAAC	100
AACCAGTCCA	GCATCGACTC	GCCGCTCGCC	CGCGCACTGG	TCGGCAAGGA	150
GCTGGACGCC	GAGGTGCTGG	TGCGCACCCC	GGCCGGGGAA	AAGCTCTGGT	200
TCGTCGTCSA	GATCGAGTAT	CCGCCGGCGC	CCTGAGAGGC	CACGCGCTCA	250
GCGCAGGATG	CGGCGGGTGA	TCAGGCCCTG	GCGGGCGACC	CGGATCAGTT	300
GCCGGACCAC	CAGGTCCAGG	TCTGCCGCCT	CGGGGGCTTG	GACCACGCGG	350
AGGTCGAACG	CGTCGCTGGG	GAAGCGCGCC	AGGTCCTTGC	CTGCCTGGGC	400
↓					
GAAGTGTATA	AGGAAGGTAC	GCGAACCGTC	CCAGCGCTTC	GGCCAGCCTT	450
CGAGGTAACG	CAGGAGGGTC	GGCTGGTGCG	GGCCGCTGAG	GAGAATCCTC	500
GGTTCCGCC	GGACCAGGCC	GGTGGTGATG	GGTGCCAGGC	GCAATTGCGT	550
GCTGGGACAG	<u>GTCATGACGT</u>	<u>CATGTCTCCG</u>	CCTCTTCGGT	CCCCTGGAC	600
→					
AGCGGTGAGA	GGCAACACCG	AGCCAGCGCT	<u>TTAGCGGTAT</u>	<u>TTCGGCTGCT</u>	650
←					
GCCGGGCGCC	CCGCAAGTTG	<u>CTGTTTAAAT</u>	<u>CGGCGCACGC</u>	GCATCCTAGA	700
AAAGCCGCAT	GGAGACTGTC	AAGAAACACG	CGGAGGCGCC	CATGCCCGAT	750
CGCTTTCTTC	<u>GCCTGTCTT</u>	<u>GCGCCTGCCC</u>	TGCCACCTC	CCCTCGCCGA	800
→					
GCGGATCGGC	CGGTGGCGCG	ATGACCGGCC	ACTGCCCGGA	CGCCAGGTGG	850
CGACGGCGAA	CCTGCACCTG	ACCCTGGGCT	TTCTCGGGCA	GGTCCCGTCC	900

GCTCGGCTCG	AGGCCCTGCT	GGACATGGCC	GCGGCCATCG	AGGCCGCGCC	950
CTTCGACTCG	TGTCTCGACC	GCCTGCTGCG	CTGGAGGAAC	GGCATCCTGC	1000
TGGCCCCCAG	CCAACCGCCC	GCCGCCCTCC	TGCGCTGCGC	CGCGCCCTGC	1050
GCTCCGGCCT	TGCCGAACTG	GAGGTGCCCG	TGGAAACCCG	CCCATTTCAGC	1100
GCCCATCTGA	CCCTGGCTCG	CGATGCCGCG	CGCCTGGAGG	ACGTCCCGCC	1150
ACCCCCAACC	TTCGTATGGC	AGGTCGACCA	TTCAGCCTG	TTTTGCTCGC	1200
AAAACGACGC	CGCGGGCGTG	CGCTACCGCA	<u>CACTCGGTCG</u>	CTGGGCGTTG	1250
TGCGGGGAAG	ATTCAAACGA	GCGTTTCGCG	CCGTAACAAC	CCGCTCTTTC	1300
CGCTCTGCCA	CGCAGGTTAT	GACCGGCCGC	CAGGAAGCCG	CGGATTTCTT	1350
		-24	-12		
GGCCTGGAGG	AAAAAAGCCG	AAGC <u>TGGCAC</u>	GGTTCCT <u>TGCG</u>	CAAGGGACAG	1400
CGAAGCGGTT	CTCCCGGAAG	GATTCGGGCG	ATGGCAGGCA	GGACGAGCCC	1450
CTCGGCCCCA	TCAACCTGAG	ATGAGAACAA	<u>CATGAAGAAG</u>	AAGTCTCTGC	1500
			M K K K S S L		
TCCCCCTCGG	CCTGGCCATC	GGCCTCGCCT	CTCTCGCTGC	CAGCCCTCTG	1550
P L G L A I	G L A S	L A A	S P L		
ATCCAGGCCA	CGACCTACAC	CCAGACCAAA	TACCCCATCG	TGCTGGCCCA	1600
I Q A S T Y T	Q T Y	Y P I V	L A \blacktriangle H		
			↑		
CGGCATGCTC	GGCTTCGACA	ACATTCTCGG	GGTCGACTAC	TGGTTCGGCA	1650
G M L G F D N	I L G	V D Y	W F G I		

Figura 21. Análisis de la región reguladora del gen *lip* en IGB83. Las regiones directas repetidas e invertidas repetidas están señaladas, los posibles sitios de activación (UAS) se presentan subrayados, los sitios -12 y -24 también están señalados. Finalmente el inicio y fin de la región utilizada para realizar la fusión transcripcional está señalada con unas flechas verticales.

El análisis de los 1450 pb de la secuencia 5' del gen que codifica para la lipasa muestra la presencia de dos marcos de lectura incompletos que conservan moderada homología con una tRNA-ligasa y un factor de elongación (GREB), en ambos casos, estos marcos de lectura codifican para proteínas que carecen de la región N-terminal y con deleciones en las regiones internas por lo que es posible que no codifiquen para proteínas funcionales, en el caso de que estos marcos de lectura sean expresados ya que tampoco sabemos si poseen promotores funcionales.

Este fragmento de la región reguladora de IGB83 fue comparado con el genoma de PAO1 y fueron 99% idénticas, ambas secuencias muestran consenso para un promotor tipo σ^{54} a -90 pb del inicio de la traducción (ATG) del gen para la lipasa. Este tipo de promotores requiere de sitios consenso adicional para la unión de proteínas activadoras (upstream activator sequence, UAS), estas secuencias presentan el consenso TGT-N₁₀-ACA y generalmente se encuentran por arriba de la posición del promotor. La participación de estas proteínas activadoras es necesaria para la transcripción de los genes respectivos. En la región analizada, se encontraron dos secuencias consenso

donde probablemente se unen activadores transcripcionales del tipo NtrC (secuencias subrayadas) en estas regiones se une tal vez el activador transcripcional LipR propuesto en PAO1 (Jaeger *et al.*, 1999).

Con la finalidad de analizar la funcionalidad del promotor tipo σ^{54} encontrado en esta secuencia, analizamos la actividad lipolítica en la cepa *P. aeruginosa* PAK y en su derivada PAKN1 mutada en el factor σ^{54} . En la **Figura 22** podemos observar que la cepa PAKN1 sólo presenta residuos de actividad lipolítica que bien puede deberse a las otras enzimas lipolíticas encontradas en *P. aeruginosa* o que la transcripción del gen *lipA* adicionalmente dependa de otro promotor lo cuál es posible ya que Jaeger *et al.*, (1999) reporta un segundo promotor a ~300 pb en *lipA* de PAO1 localizado mediante reacciones de "primer extensión". En dicho reporte se presume que la presencia de dos promotores interviene en la regulación de la enzima dependiente tanto de la fase de crecimiento y de la disponibilidad del substrato. Los ensayos de PCR en la búsqueda de la segunda lipasa (LipC) nos indica que la cepa PAK, PAO1 e IGB83 presentan alta identidad al menos en las regiones que codifican para estas enzimas. La introducción del plásmido pMA18 que tiene el fragmento de 6.5 kb de IGB83 en PAKN1 no es suficiente para la expresión de la actividad lipolítica por lo cuál concluimos que se requiere un factor σ^{54} en la transcripción de *lipA*.

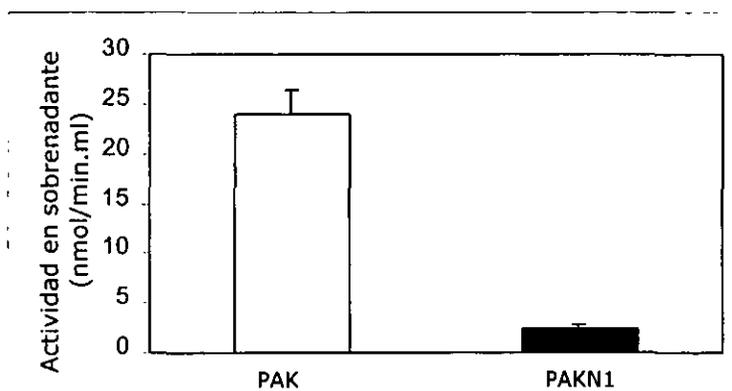


Figura 22. Análisis del efecto de σ^{54} en la expresión de la lipasa. La actividad lipolítica fue cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos, las cepas fueron crecidas en medio mínimo FAM-aceite de oliva.

En la región analizada también puede observarse la presencia de secuencias directas e invertidas repetidas cuyo papel en la regulación del gen *lipA* no ha sido estudiado. No se identificaron secuencias homólogas a FadR ni a FarR de *E. coli* en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, estas secuencias codifican para proteínas reguladoras claves en el metabolismo de los ácidos grasos en *E. coli* y otras enterobacterias (Quail *et al.*, 1994; Cronan, 1997; DiRusso *et al.*, 1999). En *A. calcoaceticus* también se ha propuesto un regulador para la expresión de la lipasa (LipR) el cuál al parecer se une a los ácidos grasos ya liberados por la lipasa y reprime su expresión (Kok *et al.*, 1996; Holm *et al.*, 2000). Parece ser que la regulación del metabolismo de ácidos grasos en *P. aeruginosa* es diferente a los ejemplos conocidos.

Por último, del análisis de la región 5' de la lipasa en IGB83 podemos concluir que no se encuentran cajas tipo *lux*. Las secuencias de ADN que representan estas cajas son secuencias invertidas repetidas de 20 pb con simetría y generalmente se localizan a -40 pb del inicio de transcripción. La presencia de estas cajas *lux* sugiere fuertemente la regulación transcripcional directa del gen respectivo por quórum sensing, aunque también se conoce de genes que son regulados por este sistema y que no presentan una caja *lux*.

Análisis de la regulación transcripcional del gen *lipA* en *P. aeruginosa*

Con la finalidad de analizar bajo que condiciones de cultivo se está transcribiendo el gen de la lipasa A se realizó una fusión transcripcional en el plásmido pMP220. Este plásmido tiene el gen de la β -galactosidasa sin promotor, por lo que cualquier promotor a ser analizado es insertado inmediatamente upstream de *lacZ*. En la **Figura 23** se muestran como quedan las construcciones realizadas al insertar el fragmento de 1.2 kb de la región promotora del gen *lipA* en ambos sentidos.

La expresión de la lipasa generalmente se ha estudiado en medios de crecimiento complejos como es el medio LB, en este medio, ha quedado establecido que la lipasa se expresa al inicio de la fase estacionaria (Jaeger *et al.*, 1999).

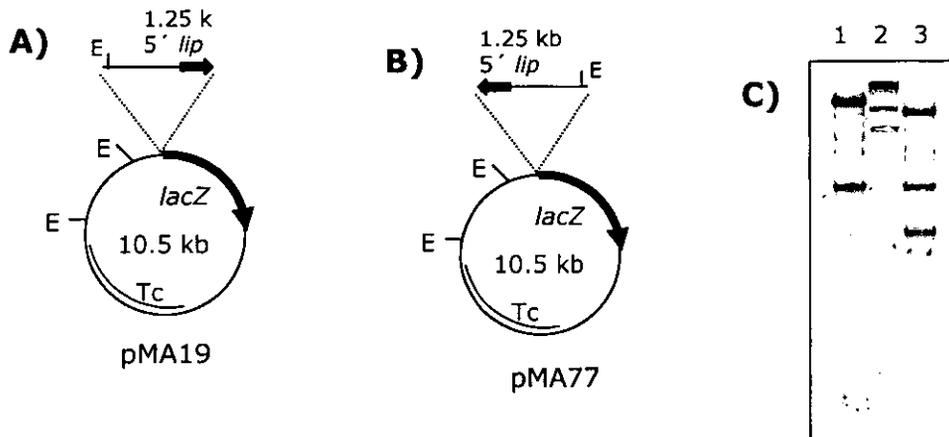


Figura 23. Construcción de las fusiones transcripcionales *lip::lacZ* en el plásmido pMP220. **A)** fusión en el sentido correcto, **B)** fusión en el sentido opuesto (como control negativo) y **C)** electroforesis de las construcciones digeridas con *EcoR*I; en el carril 1 está la digestión del pMA19 y en el carril 3 pMA77.

En este estudio, abordamos la regulación de la expresión del gen de la lipasa mediante una fusión transcripcional en medios definidos, en particular, analizamos el efecto de dos fuentes de carbono; aceite de oliva y succinato. El primero por contener trioleína que es sustrato directo para la lipasa y el segundo es conocido por ser un buen sustrato para el crecimiento de *P. aeruginosa*. En la **Tabla 5** se presentan los resultados de la actividad de la lipasa en el sobrenadante de los cultivos y al mismo tiempo se presenta la transcripción del gen *lipA*. Se presentan puntos representativos de la fase exponencial y estacionaria de los cultivos, el tiempo de duplicación fue de 1.1 h^{-1} para el caso del medio FAM con succinato y 1.25 h^{-1} con aceite de oliva.

En esta tabla incluimos la actividad de la cepa mutada en *lipA* para cerciorarnos que efectivamente con nuestro método de ensayo estamos cuantificando la actividad de LipA. La cepa IGB83 en estas fuentes de carbono presenta un crecimiento similar pero se encuentra que la actividad de la enzima en ambos medios se expresa desde la fase exponencial y esta actividad se mantiene en fase estacionaria, sin embargo, la actividad lipolítica es comparativamente menor en presencia de aceite de oliva que en succinato.

Tabla 5. Transcripción de *lipA* y actividad de la enzima en el sobrenadante de cultivos en dos fuentes de carbono.

Cepas / fuente de carbono	Actividad lipolítica (nmol/min.mg. prot.)		Unidades de β -galactosidasa (U. Miller/mg. de proteína)	
	aceite de oliva	succinato	aceite de oliva	Succinato
IGB83 (WT) 18 hrs	16.02 \pm 2.3	ND	ND	ND
IGB0 (<i>lipA</i> -) 18 hrs	3.9 \pm 1	ND	ND	ND
IGB83 (5 hrs)	28.3 \pm 1.2	50.3 \pm 2.0	ND	ND
IGB83 (18 hrs)	18.3 \pm 0.4	56.6 \pm 0.5	ND	ND
IGB83/pMA19 (5 hrs)	28.2 \pm 1.0	45.0 \pm 0.8	352 \pm 22	867 \pm 104
IGB83/pMA19 (18hrs)	21.0 \pm 5.3	53.0 \pm 0.8	70 \pm 11	49 \pm 4
IGB83/pMA77 (5 hrs)	30.5 \pm 3.9	53.0 \pm 0.8	70 \pm 4	33 \pm 2
IGB83/pMA77 (18 hrs)	25.6 \pm 1.9	52.3 \pm 0.4	93 \pm 30	36 \pm 3

Las cuantificaciones de actividad lipolítica y de β -galactosidasa se realizaron a partir de sobrenadantes como se refiere en Métodos Experimentales.

ND= no determinado

La transcripción de la fusión *lipA::lacZ* en fase exponencial es significativamente mas alta en el medio con succinato que en aceite de oliva y la transcripción en ambos medios es abolida en fase estacionaria ya que puede compararse con la actividad presentada por la fusión invertida en el pMA77. El hecho de que en fase estacionaria exista alta actividad lipolítica y no exista transcripción lo atribuimos a que la enzima que se produce en fase exponencial se mantiene activa hasta la fase estacionaria, se sabe que cerca del 40% de la enzima que se produce en *P. aeruginosa* se queda unida a lipopolisacáridos de membrana externa y se sabe también que la enzima en estas condiciones o unida a alginato es estable, por lo que estas enzimas acomplejadas pueden ser liberadas paulatinamente.

La menor transcripción de la fusión en aceite de oliva se puede explicar por un efecto negativo de los ácidos grasos liberados al romperse la trioleína presente en el medio de cultivo como ha sido demostrado en *A. calcoaceticus*, aunque algunos experimentos que realizamos en este sentido no son concluyentes para el caso de *P. aeruginosa*. Por otro lado, en el medio rico LB aunque hemos observado transcripción de la fusión desde la fase exponencial la actividad de la enzima no se presenta sino hasta bien entrada la

fase estacionaria lo que sugiere fuertemente una regulación postranscripcional de la lipasa, otra vez en *A. calcoaceticus* se ha establecido que además de la regulación transcripcional negativa por los ácidos grasos libres, también existe regulación postranscripcional mediante degradación específica de la lipasa por proteasas, es posible que una regulación similar exista en el caso de *P. aeruginosa* que explique las diferencias de actividad lipolítica en las distintas condiciones de cultivo.

Análisis de la fusión transcripcional *lipA::lacZ* por autoinducción en *P. aeruginosa*

Tomando en cuenta que se ha especulado en gran medida que la regulación de la lipasa puede estar dada por autoinducción de una manera similar que otros factores de virulencia en *P. aeruginosa*, nos avocamos a realizar experimentos en este sentido.

La regulación por autoinducción también denominada “quórum sensing” es dependiente de densidad celular. En *P. aeruginosa* existen dos sistemas reguladores, el primero está constituido por el regulador LasR y la enzima autoinductor sintetasa LasI que produce la N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona, el segundo sistema involucra al regulador RhlR y la enzima autoinductor sintetasa RhlI que produce N-butanoil-L-homoserina lactona. Las homoserina lactonas (autoinductores) son producidos de manera constante y en un umbral del orden nanomolar se unen a la proteína reguladora respectiva para así transcribir determinados genes. Ambos circuitos regulan la producción de una serie de factores de virulencia en algunas ocasiones de manera entrecruzada y de manera jerárquica LasR regula a RhlR. En este sistema de regulación también están involucrados reguladores globales y otros elementos de tal manera que su comprensión aún no es completa.

Realizamos la extracción de autoinductores de *P. aeruginosa* a partir de cultivos en fase estacionaria y probamos la funcionalidad de estos autoinductores extraídos con el plásmido reportero pSB1075 en *E. coli*, la detección de la producción de luz se realiza en placas de revelado (ver Métodos Experimentales). El reportero pSB1075 tiene al gen *lasR* bajo el promotor *tac* y la fusión transcripcional *lasI::luxCDABE*, la fusión es activa en la presencia de LasR y el autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-Homoserina lactona, de igual manera se probó el biosensor pSB406 para detectar el autoinductor

homoserina lactona de 4 carbonos que activa a RhlR. En la **Figura 24** se observa la actividad de los autoinductores extraídos de PAO1 con el biosensor pSB1075.

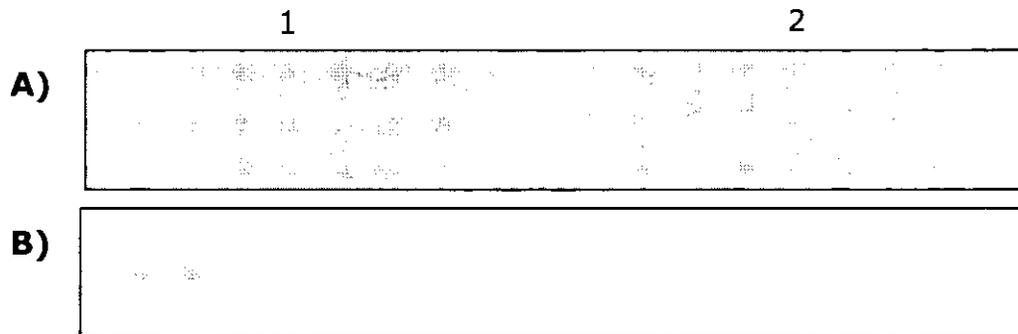


Figura 24. Funcionalidad de los autoinductores extraídos de *P. aeruginosa* PAO1. El ensayo se realizó en *E. coli* DH5 α con el reportero pSB1075. **A)** crecimiento de las cepas, **B)** revelado de las placas; 1) con autoinductor y 2) sin autoinductor.

De esta forma, adicionamos la mezcla de autoinductores al inicio de cultivos de *P. aeruginosa* y cuantificamos la transcripción de la fusión *lipA::lacZ*. En la **Figura 25** se observa que la adición de la mezcla de autoinductores en una proporción de 1:500 resulta en un adelantamiento en la transcripción de la fusión al iniciar la fase de crecimiento exponencial comparado con la cepa sin autoinductor.

En los ensayos que se realizan para probar el efecto de los autoinductores, estos generalmente se añaden al inicio de los cultivos para simular una alta concentración celular y adelantar la expresión de los genes que son regulados por autoinducción.

En el medio LB, al igual que en donde se llevó a cabo este ensayo, se ha reportado que la lipasa se expresa al inicio de la fase estacionaria, en este caso, debido a la adición de los autoinductores al inicio del cultivo, observamos una ligera anticipación en la expresión de la fusión (señalado por la línea punteada) en tres tiempos de muestra al inicio de la fase exponencial y en la presencia de la mayor concentración del autoinductor. Este ensayo sugiere una posible regulación por autoinducción en la transcripción del gen *lipA* y aunque el efecto no es claro, coincide con los resultados obtenidos por McKenney *et al.*, 1995, así que habrá que tomarlo con reserva y aún cuando el efecto observado sea repetido con más experimentos, falta por determinar

cual de los autoinductores es el responsable ya que sólo probamos una mezcla de ellos.

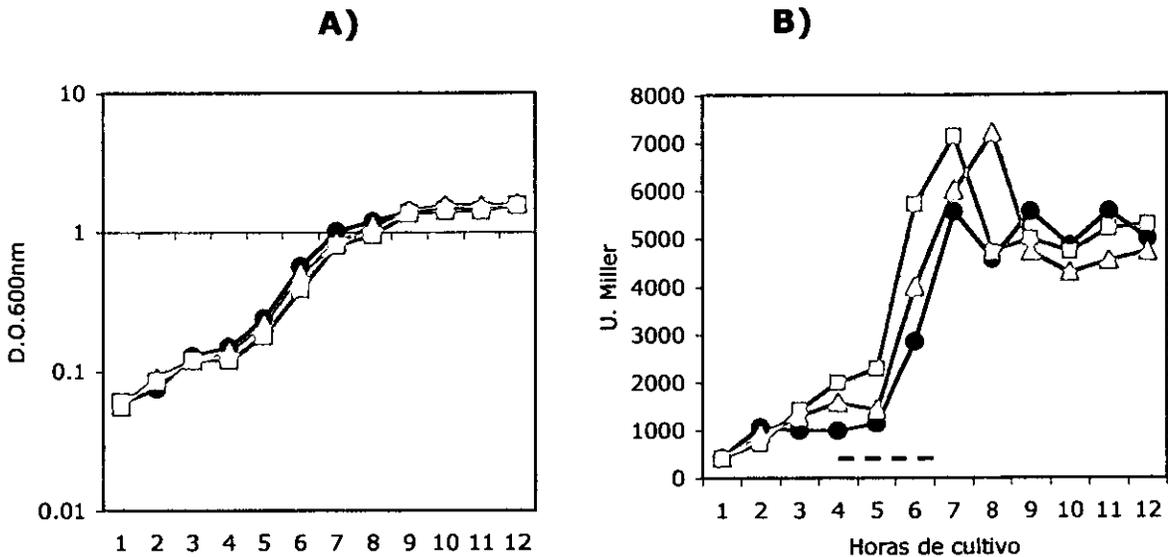


Figura 25. Efecto de la adición de la mezcla de autoinductores semipurificados en la transcripción de *lipA*, el ensayo se realizó en medio LB y la mezcla de autoinductores se añadió al inicio del cultivo de la cepa IGB83. **A)** crecimiento bacteriano y **B)** expresión de la fusión *lipA::lacZ*; ● sin autoinductor, ▲ 1:1000 y ■ 1:500 del autoinductor con respecto al volumen del cultivo.

Análisis de la fusión transcripcional *lipA::lacZ* en *Escherichia coli*

El reconocimiento de los promotores de *Pseudomonas* en *E. coli* en general es muy bajo, esto se debe fundamentalmente a la diferencia en el contenido de G+C en sus genomas y en consecuencia al uso preferencial de codones diferentes en estas bacterias. En ocasiones la transcripción de los genes de *Pseudomonas* en *E. coli* disminuye por la ausencia de proteínas reguladoras o efectores específicos sólo presentes en *Pseudomonas*. Aún así, para estudiar la genética molecular de *P. aeruginosa* es común el análisis de la expresión de ciertos genes en *E. coli* para establecer los elementos reguladores necesarios en su expresión ya que son adicionados en el ensayo.

Puesto que la transcripción de la fusión *lipA::lacZ* por autoinducción en *P. aeruginosa* no es claro (Fig. 25), quisimos probar la actividad de esta fusión en presencia de los

reguladores de quórum LasR y RhIR con la mezcla de autoinductores. Este ensayo se planteo también por el hecho de que en el análisis de la región 5' del gen de la lipasa no encontramos una caja *lux* que sería una sugerencia de la transcripción directa de *lipA* por LasR. De esta manera el gen que codifica para el regulador LasR fue clonado en el vector pUCP20 y aprovechamos una construcción de RhIR para incluirlo en este ensayo, las construcciones utilizadas están representadas en la **Figura 26**, las inserciones de los fragmentos quedaron bajo el promotor de *lacZ*.

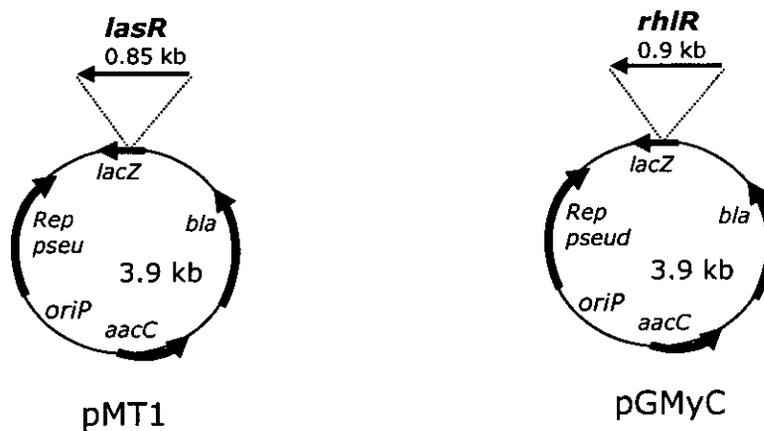


Figura 26. Construcciones en pUCP20 con los reguladores transcripcionales LasR y RhIR de quórum sensing de *P. aeruginosa*.

Además de analizar la fusión transcripcional *lipA::lacZ* (pMA19), como controles positivos se analizó a *rhIR::lacZ* (pRD58-2) que sabemos es regulado transcripcionalmente de manera positiva por LasR y *rhIA::lacZ* (pCGyC) que es regulado por RhIR. Se utilizó al plásmido pMA77 como control negativo. El ensayo fue realizado en DH5 α por que es la cepa de *E. coli* que no produce autoinductores (Surette *et al.*, 1999) para evitar de esta manera un posible "crosstalk" con los autoinductores producidos por esta cepa. En la **Figura 27** se presenta los resultados obtenidos en este ensayo.

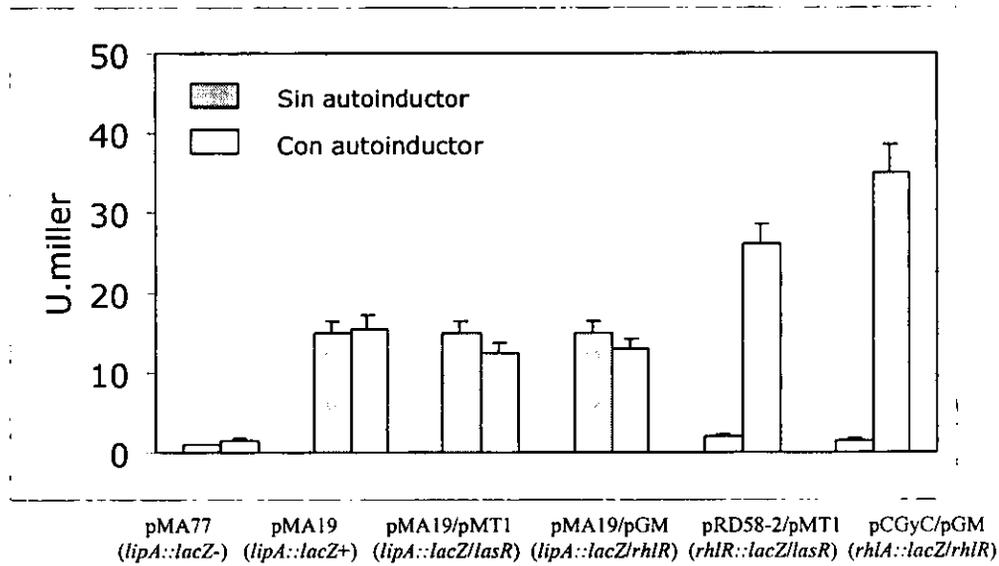


Figura 27. Análisis de la transcripción de *lipA* en presencia de LasR y RhIR en *E. coli* DH5 α en Medio LB.

El plásmido pMA77 al igual que en *Pseudomonas*, en *E. coli* presenta muy poca actividad de β -galactosidasa y sigue comportándose como un buen control negativo. La fusión *lipA::lacZ* (pMA19) presenta un relativo alto fondo de actividad en *E. coli* y es indiferente a la presencia tanto de *lasR* (pMT1) como de *rhlR* (pGM) aún con la mezcla de autoinductores. Los controles positivos se comportaron perfectamente: *rhlR::lacZ* (pRD58-2) es regulado positivamente por LasR (pMT1) y *rhlA::lacZ* (pCGyC) es regulado a su vez positivamente por RhIR (pGM).

Con estos resultados se concluye que la regulación de la lipasa no está dada por los reguladores de quórum conocidos y si es que fuera regulada por autoinducción debe ser de manera indirecta por medio de otros reguladores.

Jaeger *et al.*, (1999) mencionan el hallazgo de al menos dos genes adicionales necesarios para la expresión de la lipasa, a uno de ellos lo han denominado *lipR* y aseguran que se trata de un regulador tipo NtrC, si esto es así, entonces es probable que la lipasa sea regulada por medio de un sistema de dos componentes pudiendo estar relacionado parcialmente con autoinducción.

Consideraciones finales de la regulación de LipA en *P. aeruginosa*

Mediante una análisis general de los resultados obtenidos y de lo reportado por otros grupos de investigación, se sugiere que el gen *lipA* es regulado a nivel transcripcional a través de un regulador hipotético LipR1 con la ayuda de un modulador aún no identificado. Un regulador LipR ha sido identificado en *Streptomyces exofolius* que regula la expresión de la lipasa en este microorganismo (Servín-González *et al.*, 1997).

Se sugiere que existe una regulación transcripcional negativa modulada por los ácidos grasos libres activados de cadena larga (Acyl-CoA) como producto de la lipólisis; este regulador propuesto en *A. calcoaceticus* aún no ha sido identificado (Kok *et al.*, 1996).

En *P. aeruginosa* Gilbert *et al.*, (1991) han reportado la inhibición de la expresión de la lipasa en presencia de ácidos grasos y en *Streptococcus faecalis* también ha sido reportado este efecto por Chander *et al.*, (1979). La regulación transcripcional de las lipasas por ácidos grasos es común e incluso se da en eucariontes (Holm *et al.*, 2000). En el caso de *P. aeruginosa* IGB83 los resultados obtenidos, desafortunadamente no son hasta ahora concluyentes y está pendiente un estudio detallado al respecto.

En lo que respecta a la regulación de la lipasa por quórum sensing, ha sido reiteradamente mencionado pero no se han publicado estudios concretos al respecto. Por los ensayos realizados en este estudio, se concluye que la transcripción no depende de LasR y RhIR como sucede con los genes empleados como controles en este estudio, lo cual respalda la hipótesis de un regulador adicional LipR aunque aún no ha sido identificado ni en *Pseudomonas* ni en otras bacterias gram negativas donde se han postulado. En el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (www.pseudomonas.com) se encuentra un ORF 68% similar a NtrB de *V. alginolyticus* formando una unidad transcripcional con un ORF 79% homólogo a NtrC de *S. typhimurium*, que sin embargo no han sido analizados funcionalmente, pero que puede ser la unidad de dos componentes requeridos para la regulación de *lipA*.

En *E. coli* se sabe que los lípidos se emplean para señalar la disposición de nutrientes, el estado ambiental y la densidad de población (DiRusso *et al.*, 1999), en *Pseudomonas* falta mucho por estudiar al respecto.

VII. Conclusiones

La principal contribución del trabajo estriba en la caracterización genética de la lipasa en *Pseudomonas aeruginosa* IGB83 y el análisis de la regulación transcripcional del gen en medios mínimos, estos resultados pueden hacerse extensivos a lipasas producidas en otras cepas de *P. aeruginosa* en vista de la alta identidad mostrada entre ellas. Se contribuye con una secuencia lipolítica de esta familia y una cepa de *P. aeruginosa* en los bancos respectivos. Es importante resaltar la alta identidad de secuencia que existe entre cepas de aislados ambientales como es el caso de IGB83 y otras cepas aislados de pacientes infectados como en el caso de PAO1 que es aislada a partir de una infección de oído.

Las conclusiones más importantes son las siguientes.

1. El gen de la lipasa A de IGB83 resultó ser casi idéntica a lipasas producidas por otras cepas de *P. aeruginosa*.
2. Las lipasas producidas por diferentes cepas de *P. aeruginosa* resultan ser muy conservadas.
3. El gen de la lipasa depende en parte del factor σ^{54} para su transcripción.
4. La transcripción de *lipA* no depende de manera directa de la actividad de los reguladores de quórum LasR y RhIR.
5. La regulación transcripcional de *lipA* en la fase de crecimiento depende de la composición del medio de cultivo.

VII. Perspectivas

Planteamos algunos aspectos que consideramos conveniente seguir explorando:

1. Los resultados obtenidos en este trabajo indican una regulación transcripcional diferente del gen *lipA* con aceite de oliva o succinato como fuente de carbono, en este sentido, queda por determinar cuales son los factores que en ultima instancia son los responsables directos de esta diferente transcripción, ya que el aceite de oliva es un substrato para la lipasa y se esperaría que la actividad de la lipasa en presencia de esta fuente de carbono fuera mayor y no es el caso. En este sentido, también queda pendiente un estudio detallado de la posible regulación postranscripcional dependiente de la composición nutricional de los medios.
2. En los estudios de transcripción realizados en este trabajo utilizamos un fragmento grande de la región 5' del gen *lipA* en la fusión transcripcional, por lo que esta pendiente determinar de manera precisa cuales son los sitios involucrados en la regulación transcripcional de este gen.
3. En la regulación de *lipA* se ha postulado la participación de un sistema de dos componentes con homología a NtrB/NtrC y un par similar es identificable en el banco genómico de *P. aeruginosa* PAO1, por lo que es interesante estudiar la posible participación de este sistema regulatorio en la transcripción de *lipA*.

VIII. Referencias bibliográficas

- Ahn, J., Pan, J. and Rhee, J. (1999). Identification of the *tliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. **J. Bacteriol.** 181(6): 1847-1852.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K. and Shibatani, T. (1995). The three genes *lipB*, *lipC* and *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. **J. Bacteriol.** 177: 6381-6389.
- Anne, L., Degn, P. and Zimmermann, W. (1999). Deinking of soy bean oil based ink printed paper with lipases and neutral surfactant. **J. Biotechnol.** 67: 229-236.
- Atlas, R., ed. (1996). **Handbook of Microbiological Media**. Boca Raton, FL: CRC, press. 1440 pp. 2nd ed.
- Ayora, S., Lindgren, P. and Götz, F. (1994). Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hycus* subsp *hycus* involved in extracellular lipase processing. **J. Bacteriol.** 176: 3218-3223.
- Balcão, V., Paiva, A and Malcata, F. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 392-416.
- Beer, H., Wohlfahrt, G., Schmid, R. and McCarthy, J. (1996). The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. **Biochem. J.** 319: 351-359.
- Binet R, Letoffe S, Ghigo JM, Delepelaire P, Wandersman C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters. **Gene** 1997 Jun 11;192(1):7-11.
- Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de Cock, H. and Tommassen, J. (1998). Formation of oligomeric rings by XcpQ and pilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** 27: 209-219.
- Bornscheuer, U. (1995). Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 578-586.
- Brumlik, M., van der Goot, G., Wong, K. and Buckley, J. (1997). The disulfide bond in *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity. **J. Bacteriol.** 179: 7155-7163.
- Brzozowski, A., Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G., Lawson, D., Turkenburg, J., Björkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. and Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature (London)** 351: 491-494
- Chander, H., Ranganatan, B. and J. Singh. (1979). Role of some fatty acids on the grow and lipase production by *Streptococcus faecalis*. **J. Fod. Sci.** 44: 1566-1567.
- Chapon-Hervé, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A. and Marc Bally (1997) Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** 24: 1169-1178.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Einsenstark, A. and Chatterjee, AK. (1998). RpoS (Sigma-S) controls expression of RsmA, a global regulator of secondary metabolites, Hairpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. **J. Bacteriol.** 180(14): 3629-3634.
- Chung, G., Lee, Y., Jeohn, G., Yoo, O. and Rhee, J. (1991). Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. **Agric. Biol. Chem.** 55(9): 2359-2365.
- Chung, J., Chen, T. and Missiaskis, D. (2000). Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulphide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. **Mol. Microbiol.** 35: 1099-1109.
- Cronan, J-E, Jr. (1997). In vivo evidence that Acyl Coenzyme A Regulates DNA Binding by the Escherichia coli FadR Global Transcription Factor. **J. Bacteriol.** 179(5): 1819-1823.
- Derewenda, U., Brzozowski, A., Lawson, D. and Derewenda, Z. (1992). Catalysis at the

- interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry** **31**: 1532-1541.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y. and Dodson, G. (1994). An unusual buried polar cluster in family of fungal lipases. **Nat. Struct. Biol.** **1**: 36-47.
- Diaz Méndez Rafael (1998). Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología (UNAM).
- DiRusso, C., Black, P. and Weimar, J. (1999). Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. **Prog. Lipids Res.** **38**: 129-197.
- Dunphy, G., Miyamoto, C. and Meighen, E. (1997). A homoserina lactone autoinducer regulates virulence of an insect-pathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **J. Bacteriol.** **179**: 5288-5291.
- Duong, F., Eichler, J., Price, A., Leonard, R. and Wickner, W. (1997). Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. **Cell** **91**: 567-573.
- Duong, F., Soscia, A., Lazdunski, A. and Murgier, M. (1994). The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. **Mol. Microbiol.** **11**: 1117-1126.
- Egloff, M-P., Marguet, F., Buono, G., Verger, R. and Cambillau, C. (1995). The 2.6 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. **Biochemistry** **34**: 2751-2762.
- Eijkman, C. (1901). Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpitzen. **Cbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr.** **29**: 841-848.
- El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Biter, W., Jaeger, K-E. and J. Tommassen. (1999) Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. **Mol. Gen. Genet.** **261**: 770-776.
- Figarella, C., De Caro, A., Leupold, D. and Poley, J. (1980). Congenital pancreatic lipase deficiency. **Pediatrics** **96**: 412-416.
- Figurski, D. and Helinski, D. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **85**: 5269-5273.
- Filloux, A., Michel, G. and Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp-system of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Rev.** **22**: 177-198.
- Friedman, A., Long, S., Brown, S., Buikema, W. and F. Ausubel (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetics analysis of *Rhizobium* mutants. **Gene** **18**: 289-296.
- Frenken, L., Bos, J., Visser, C., Müller, W., Tommassen, J. and Verrips, C. (1993). An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. **Mol. Microbiol.** **9**: 579-589.
- Gerritse, G., Ure, R., Bizoullier, F. and Quax, W. (1998). The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production. **J. Biotechnol.** **64**: 23-28.
- Gilbert, E. J. (1993). *Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning. **Enzyme Microb. Technol.** **15**: 634-645.
- Gilbert, E., Drozd, J. and Jones, C. (1991). Physiological regulation and optimization of lipases activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **J. Gen. Microbiol.** **137**: 2215-2221.
- Gill, I. and Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, Part 2: Biotransformations and biotechnological applications. **Trends Biotechnol.** **15**: 470-478.
- Götz, F., Verheij, H. and Rosenstein, R. (1998). Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion and processing. **Chem. Phys. Lipids** **93**: 15-25.
- Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R., Serreqi, A. and Scharg, J. (1994). Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. **Biochemistry** **33**: 3494-3500.

- Groot, A., Filloux, A. and Tommassen, J. (1991). Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. **Mol. Gen. Genet.** **229**: 278-284.
- Hancock, R. and Carey, A. (1979). Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. **J. Bacteriol.** **140**: 902-910.
- Heinrichs, J., Bayer, M. and Cheung, A. (1996). Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** **178**: 418-423.
- Helistö, P. and Korpela, T. (1998). Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. **Enzyme Microb. Technol.** **23**: 113-117.
- Hemachander, C. and Puvanakrishnan, R. (2000). Lipase from *Ralstonia picketti* as an additive in laundry detergent formulations. **Process Biochem.** **35**: 809-814.
- Hjort, A., Carriere, F., Cudrey, C., Wöldike, H. and Boel, E. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. **Biochemistry** **32**: 4702-4707.
- Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H. and Contreras, JA. (2000). Molecular Mechanisms Regulating Hormone-Sensitive Lipase and Lipolysis. **Ann. Rev. Nutr.** **20**: 365-393.
- Holwerda, K., Verkade, P. and Willigen, A. (1936). **Rec. Trav. Chim. Pays-Bas**, **55**: 43-57.
- Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994). A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. **Mol. Microbiol.** **12**: 859-864.
- Ihara, F., Okamoto, I., Nihira, T., Akao, K. and Yamada, Y. (1995). Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas* sp. strain 109. **J. Bacteriol.** **177**: 1254-1258.
- Irani, V and J. Rowe (1997). Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg^{2+} and heat. **BioTechniques** **22**: 54-56.
- Ishikawa, Jun. and Kunimoto, H., (1999). Frame plot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. **FEMS Microbiol. Lett.** **174**: 251-253.
- Ishimoto, K. and S. Lory (1989). Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative σ factor (RpoN) of RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 1954-1957.
- Jaeger, K-E. (1994a). Extrazelluläre enzyme von *Pseudomonas aeruginosa* als virulenzfaktoren. **Immun. Infekt.** **22**: 177-180.
- Jaeger, K-E., Dijkstra, B. and Reetz, M (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.** **53**: 315-351.
- Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, B., Colson, C., van Heuvel, M. and Misset O. (1994b). Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.** **15**: 29-63.
- Jaeger, K-E., Ransac, S., Koch, S., Ferrato, F. and Dijkstra, B. (1993). Topological Characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Lett.**, **332**: 143-149.
- Jaeger, K-E. and Reetz, M. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.** **16**: 396-403.
- Jensen, R. (1983). Detection and determination of lipase (acylglycerol hidrolase) activity from various sources. **Lipids** **18**: 650-657.
- Knieg, R. and Holt, G. (1984). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Vol. 1. Williams and Williams Ed. USA., pp. 140-149.
- Koenig, B., Jaeger, K-E. and Koenig, W. (1994). Induction of inflammatory mediator release (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa*. **Int. Arch. Allergy Immunol.** **104**: 33-41.
- Kok, R., Nudel, C., Gonzalez, R., Nugteren-Roodzant, I. and Klaas J. Hellingwerf. (1996)

- Physiological Factors Affecting Production of Extracellular Lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: Fatty acid Repression of *lipA* Expression and Degradation of LipA. **J. Bacteriol.** **178**: 6025-6035.
- Kok, R., van Tor, J., Nugteren-Roodzant, I., Brouwer, M., Egmond, M., Nudel, C., Bosman, B. and Hellingwerf, K. (1995). Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. **Mol. Microbiol.** **15**: 803-818.
- König, B., Jaeger, K-E., Sage, A., Vasil, M. and König, W. (1996). Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes and monocytes). **Infect. Immun.** **64**: 3252-3258.
- Kouker, G. and Karl-Erich Jaeger. (1987) Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Appl. Environ. Microbiol.** **53**: 211-213.
- Kullik, I., Giachino, P. and Fuchs, T. (1998). Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. **J. Bacteriol.** **180**: 4814-4820.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.
- Lang, D., Manesse, M., de Has, G., Verheij, H. and Dijkstra, B. (1998). Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. **Eur. J. Biochem.** **254**: 333-340.
- Langin, D., Laurell, H., Holst, L., Belfrage, P. and Holm, C. (1993). Gene organisation and primary structure of hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase from *Moraxella* TA 144, an Antarctic bacterium. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **90**: 4897-4901.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G. and Haas, D. (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root of tobacco. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **89**: 1562-1569.
- Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **Eur. J. Biochem.** **216**: 155-160.
- Lewenza, S., Conway, B., Greemberg, E. and Pamela A. Sokol. (1999) Quorum Sensing in *Bulkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI Homologues CepRI. **J. Bacteriol.** **181**: 748-756.
- Li, X., Tetling, S., Winkler, U., Jaeger, K-E. and Benedik, M. (1995). Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. **App. Envir. Microbiol.** **61**: 2674-2680.
- Linko, Yu-Yen., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, E., Sápala, J. and Linko, P. (1998). Biodegradable products by lipase biocatalysis. **J. Biotechnol.** **66**: 41-50.
- Longhi, S., Manesse, M., Verheij, H., de Has, G. and Egmond, M. (1997). Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. **Protein Sci.** **6**: 275-286.
- Loughlin, W. (2000). Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology** **74**: 49-62.
- Lowe, M. E. (1997). Structure and function of pancreatic lipase and colipase. **Ann. Rev. Nutr.** **17**: 141-158.
- Lowry, O, et al. (1951). Protein measurement with the folin reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-275.
- Martínez, C., de Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, M. and Cambillau, C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. **Nature** **356**: 618-618.
- Martínez, A., Ostrovsky, P. and D. Nunn. (1999) LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. **Mol. Microbiol.** **34**: 317-326

- McKenney, D., Brown, K. and David G. Allison. (1995) Influence of *Pseudomonas aeruginosa* Exoproducts on Virulence Factor Production in *Bulkholderia cepacia*: Evidence of Interspecies Communication. **J. Bacteriol.** **177**:6989-6992.
- McNamara, P. and Iandolo, J. (1998). Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Saphylococcus aureus* KS19051. **J. Bacteriol.** **180**: 2609-2615.
- Medina Basulto Gerardo (2002). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología (UNAM).
- Miller, J. H. (1972). **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 431-435.
- Miskin, J., Farrel, A., Cunliffe, W. And K. Holland. (1997). *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. **Microbiology** **143**: 1745-1755.
- Missiakis, D. and Raina, S. (1997). Protein folding in the bacterial periplasm. **J. Bacteriol.** **179**: 2465-2471.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and Gunnar von H. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Prot. Eng.** **10**: 1-6.
- Noble, M., Cleasby, A., Johnson, L., Egmond, M. and Frenken, L. (1993). Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. **FEBS lett.** **331**:123-128.
- Ogierman, M., Fallarino, A., Riess, T., Williams, S., Attridge, S. and Manning, P. (1997). Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hly* region. **J. Bacteriol.** **179**: 7072-7080.
- Olukoshi, E. and Packter, N. (1994). Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. **Microbiology** **140**: 931-943.
- Overbye, L., Sandkvist, M. and Bagdasarian, M. (1993). Genes required for extracellular secretion of enterotoxin are clustered in *Vibrio cholerae*. **Gene** **132**: 101-106.
- Palmeros, B., Guereca, L., Alagon, A. and G. Soberón-Chávez. (1994) Biochemical Characterization of the Lipolytic Activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. **Process. Biochem.** **29**: 207-212.
- Pearson, J., Passador, L., Iglewski, B. and Greenberg, E. (1995). A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **92**: 1490-1494.
- Pugsley, A. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.** **57**: 50-108.
- Quail, M., Dempsey, C. and Guest, J. (1994). Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** **356**: 183-187.
- Quinn, D., Shirai, K., Jackson, R. and J. Harmony. (1982) Lipoprotein Lipase Catalyzed Hydrolysis of Water-Soluble *p*-nitrophenyl Esters. Inhibition by Apolipoprotein C-II. **Biochemistry.** **21**: 6872-6879.
- Raina, S. and Missiakis, D. (1997). Making and breaking disulfide bonds. **Ann. Rev. Microbiol.** **51**: 179-202.
- Reetz, M., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. and Jaeger, K-E. (1997). Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **36**: 2836-2832.
- Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. and Dieter Hass. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. **Mol. Microbiol.** **24**:309-319.
- Rollof, J. and Normak, S. (1992). *In vivo* processing of *Staphylococcus aureus* lipase. **J. Bacteriol.** **174**: 1844-1847.
- Rogalska, E., Nury, S., Douchet, I. and Verger, R. (1997). Microbial Lipases: Structures Function and Industrial Applications (lipase stereo- and regio- selectivity towards tri- and di-

- acylglycerols). **Biochem. Soc. Trans.** **25**: 161-164.
- Rúa, M., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. and Schmid, R. (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. **J. Biotechnol.** **56**: 89-102.
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **74**: 5463-5467.
- Sarda, L. and Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochim. Biophys. Acta.** **30**: 513-521.
- Schmidt-Dannert, C., Rúa, L., Wahl, S. and Schmid, R. (1997). *Bacillus thermocatenuatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. **Biochem. Soc. Trans.** **25**: 178-182.
- Schrag, J. and M. Cygler (1997). Lipases and α/β Hydrolase fold. **Methods Enzymol.** **284**: 85-107.
- Schrag, J., Li, Y., Cygler, M., Lang, D. and Burgdorf, T. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure** **5**: 187-202.
- Servin-González, L., Castro, C., Pérez, C., Rubio, M. and Valdez, V. (1997). *bldA*-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (*lipA*) is mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. **J. Bacteriol.** **179**: 7816-7826.
- Shibata, H., Kato, H. and Oda, J. (1998). Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. **J. Biochem.** **123**: 136-141.
- Shibata, H., Kato, H. and Oda, J. (1998) Random mutagenesis on the *Pseudomonas* lipase activator protein, *lipB*: exploring amino acid residues required for its function. **Prot. Eng.** **11**:467-472.
- Shinger. (1996). Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: repression as a control mechanism. **Mol. Microbiol.** **19**: 409-416.
- Simonon, M. and Palva, J. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiol. Rev.** **57**: 109-137.
- Smeltzer, M., Gill, S. and Iandolo, J. (1992). Localization of a chromosomal mutation affecting expression of extracellular lipase in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** **174**: 4000-4006.
- Sommer, P., Bormann, C. and F. Götz. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **App. Environ. Microbiol.** **63**: 3553-3560.
- Spaink, H., Okker, R., Wijffelman, C., Pees, E. and Lugtenberg, B. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Mol. Biol.** **9**: 27-39.
- Stamatis, H., Xenakis, A. and Kolisis, F. (1999). Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. **Biotechnol. Advances** **17**: 293-318.
- Stuer, W., Jaeger, K-E. and Winkler, U. (1986). Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** **168**: 1070-1074.
- Sullivan, E., Leahy, J. and Colwell, R. (1999). Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a protobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. **Gene.** **230**: 277-285.
- Surette, M., Miller, M. and Bassler, B. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** **96**: 1639-1644.
- Tan, Y. and Miller, K. (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene

- from *Pseudomonas fluorescens* B52. **App. Envir. Microbiol.** **58**: 1402-1407.
- Tanaka, J., Ihara, F., Nihira, T. and Y. Yamada. 1999. A low-Mr lipase activation factor cooperating with lipase modulator protein LimL in *Pseudomonas* sp. strain 109. **Microbiology.** **145**: 2875-2880.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. and A. Lazdunski. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Rev.** **103**: 73-90.
- Upon, C. and Buckley, J. (1995). A new family of lipolytic enzymes. **Trends Biochem. Sci.** **20**: 178-179.
- Uppenberg, J., Hansen, M., Patkar, S. and Jones, T. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal form of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure** **2**: 293-308.
- Valdez, F., González-Cerón, G., Kieser, H. and Servin-González, L. (1999). The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. **Microbiology** **145**: 2365-2374.
- Verger, R. (1997). "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnol.** **15**: 32-38.
- Verschueren, K., Seljée, F., Rozeboom, H., Kalk, K. and Dijkstra, B. (1993). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. **Nature** **363**: 693-698.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and J. Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors **Gene** **33**: 103-119
- Yang, J., Yashi, K., Iwasaki, Y., Nakano, H. and Yamane, T. (2000). *In vitro* analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI-56 lipase. **J. Bacteriol.** **182**: 295-302.
- Wenzig, E., Lottspeich, F., Verheij, H., de Haas, G. and Götz, F. (1990). Extracellular processing of the *Staphylococcus aureus* lipase. **Biochemistry** **9**: 47-56.
- Wild, M., Caro, A., Hernández, A., Miller, R. and Soberón-Chávez, G. (1997). Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. **FEMS Microbiol. Lett.** **153**: 279-285.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. and Jaeger, K-E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** **181**: 6977-6986.
- Winson, M., Swift, S., Fish, L., Troup, J., Jørgensen, F. and S. Chabra. (1998) Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N-acyl* homoserine lactone-mediated quorum sensing. **FEMS Microbiol. Lett.** **163**: 185-192.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. and Ulrich K. Winkler. (1992) Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J. Gen. Microbiol.** **138**: 1325-1335.

original paper

Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83

A. Martínez · G. Soberón-Chávez(✉)

A. Martínez · G. Soberón-Chávez

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62251 México

✉ E-mail: gloria@ibt.unam.mx
Phone: +52-73-291634
Fax: +52-73-172388

Received: 30 January 2001 / Received revision: 19 April 2001 / Accepted: 27 April 2001 / Published online: ■

Abstract. The lipases produced by *Pseudomonas* have a wide range of potential biotechnological applications. *Pseudomonas aeruginosa* IGB83 was isolated as a highly lipolytic strain which produced a thermotolerant and alkaline lipase. In the present work, we have characterized the *P. aeruginosa* IGB83 gene (*lipA*) encoding this enzyme. We describe the construction of a *lipA* mutant and report on the effect of two carbon sources on lipase expression.

Introduction

Lipases (E.C.3.1.1.3) are esterases able to hydrolyze water-insoluble esters such as long-chain triglycerides. These enzymes also catalyze the formation of esters (esterification) and the exchange of ester bonds (transesterification), when present in non-aqueous media (Jaeger et al. 1999). Lipases have a wide range of potential uses in industry (Jaeger et al. 1999; Soberón-Chávez and Palmeros, 1994). *Pseudomonas* lipases display special biochemical characteristics not common among the lipases produce by other microorganism, e.g., their thermoresistance and activity at alkaline pH. The lipase produced by *Pseudomonas aeruginosa* LP602 has been shown to be useful for wastewater treatment (Dharmasthiti and Kuhasuntisuk 1998).

The genes encoding the lipase (*lipA*) of several *P. aeruginosa* strains have been cloned and sequenced (Jaeger et al. 1994, 1999; Rosenau and Jaeger 2000; Soberón-Chávez and Palmeros 1994), and the regulation of their expression is beginning to be understood (Jaeger et al. 1999; Rosenau and Jaeger 2000). For example, it is clear that *P. aeruginosa* LipA expression is subject to posttranscriptional regulation (Rosenau and Jaeger 2000).

P. aeruginosa IGB83 strain was isolated from the Mexican tropical rain forest as a highly lipolytic bacterium (Palmeros et al. 1994). Its major lipase was purified and shown to be a thermoresistant and alkaline 58-kDa enzyme (Palmeros et al. 1994). We report here the characterization of the gene encoding the IGB83 lipase (*lipA*), showing that it is highly homologous to previously reported *P. aeruginosa lipA* genes and we describe the construction of a *lipA*-deficient mutant. We also demonstrate that *P. aeruginosa* IGB83 lipase expression is dependent on the carbon source used.

Materials and methods

Microbiological conditions

Bacterial strains were cultured in FAM+olive oil (1% v/v) and FAM+succinate (50 mM) media (Palmeros et al. 1994). Olive oil and other fats were emulsified with a domestic blender, shaking for 15 min. Antibiotics (Sigma) were used to supplement selection media at the following concentrations (in µg/ml) for *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively: ampicillin 100 and not used; carbenicillin not used and 150; tetracycline 15 and 200; and kanamycin 30 and not used. β -Galactosidase activity was

determined as reported by Miller (1972). One unit corresponds to 1 nmol of *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside hydrolyzed per minute per mg of protein. All measurements were done in triplicate.

P. aeruginosa strain IGB83 has been deposited in the American Type Culture Collection under accession number ATCC BAA-228.

Determination of lipolytic activity

Qualitative determination of lipolytic activity was accomplished with two different assays: (1) by halo formation on LB medium supplemented with 1% glycerol tributyrate (this assay not only determines lipases, but also other esterases), and (2) a more specific assay on FAM+olive oil medium supplemented with 0.001% rhodamine B (Kouker and Jaeger 1987), visualizing the hydrolysis of olive oil by the fluorescence of rhodamine B. For quantitative determination of lipolytic activity, *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) was used as substrate as described (Wolfgang et al. 1986). The reaction was carried out at 55 °C on 50 mM Tris-HCl buffer.

PAGE

Discontinuous SDS-PAGE was carried out using 12.5% polyacrylamide slab-gels. The samples were dissolved in a buffer containing 250 mM β -mercaptoethanol and 1% SDS and were boiled for 10 min.

PCR amplification

PCR primers for the *lipA* gene were designed based on conserved DNA sequences among 12 reported *Pseudomonas lipA* genes, including a *Pst*I recognition site (underlined) to facilitate cloning of the PCR product. The sequence of these oligonucleotides is La:

5' -GGTCAACCTGCAGGGCCACAGCCACGGCG-3' ; and Ra: 5' -GAGGCTGCAGACCTGTTACCTCGTCCAGGTGG-3' . A single master mix was prepared containing approximately

100 ng genomic DNA, 25 pmol of each primer, 0.25 mM dNTPs, and 1 × buffer containing 1.25 mM MgCl₂, using Vent DNA-polymerase (Biolabs). Cycling reactions were carried out in an automated RoboCycler Gradient 40 (Stratagene). The reaction conditions used are: 1 cycle (95°C for 2 min), 25 cycles (95 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 1.5 min) and finally 1 cycle (72 °C, 5 min).

Construction of the *lipA* IGB83 mutant (IGB0)

Plasmid pUC19 (Yanisch-Perron et al. 1985) containing a 558-bp internal *lipA* sequence (pMA558) was transformed to strain IGB83. Carbenicillin-resistant transformants are the product of single recombination events between plasmid pMA558, which is unable to replicate in *P. aeruginosa*, and the chromosomal *lipA* gene and resulted in inactivation of this gene. The transformants were screened for lipase deficiency on FAM+olive oil plates containing rhodamine B as described above.

DNA procedures

DNA isolation, cloning and sequencing, Southern blotting and nick-translation procedures were carried out as described (Sambrook et al. 1989). Plasmid DNA was introduced into *E. coli* (Sambrook et al. 1989) and *P. aeruginosa* (Irani and Rowe 1997) by transformation. The sequencing reactions were done using *Taq* fs DNA polymerase and fluorescent dideoxy terminators in a cycle sequencing method; the resultant DNA fragments were separated by electrophoresis and analyzed using an automated Applied Biosystems 377 DNA sequencer.

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence of the IGB83 *lipA* gene and flanking regions has been deposited in the GenBank database under accession number AF237723.

Results

Identification and characterization of the *P. aeruginosa* IGB83 *lipA* gene

The genes encoding the most abundant lipases (*lipA*) of *P. aeruginosa* and of closely related *Pseudomonas* species share a high degree of sequence similarity (Soberón-Chávez and Palmeros 1994). All of the lipases encoded by these genes have a molecular mass of around 30 kDa. In contrast, the major *P. aeruginosa* IGB83 lipase has an apparent molecular mass of 58 kDa (Palmeros et al. 1994). To determine whether strain IGB83 contained a *lipA* homologue, a pair of oligonucleotides was designed (see Materials and methods) based on highly preserved regions of 12 bacterial *lipA*-homologous genes. These bacteria are *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia cepacia* and several *Pseudomonas* sp. strains. Using these oligonucleotides, a 558-bp band was amplified by PCR using strain IGB83 total DNA as template (Fig. 1A). The size of the amplified DNA sequence corresponded to that expected for the amplification of the *P. aeruginosa lipA* gene (Fig. 1A), and it was shown to correspond to an internal *lipA* fragment by DNA sequencing (data not shown). The IGB83 *lipA* PCR product was used as a probe in Southern blot hybridization with total DNA of *P. aeruginosa* strains PAO1 (Hancock and Carey 1979) and IGB83. The two strains presented an identical pattern of hybridization using different restriction enzymes (Fig. 1B).

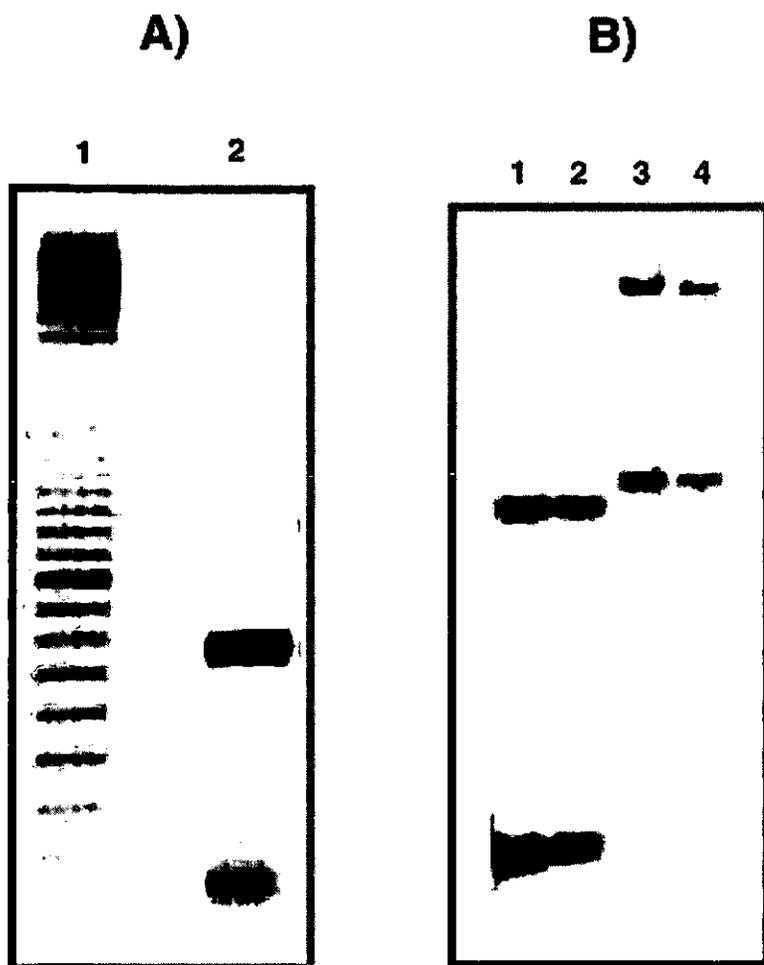


Fig. 1A, B. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83 *lipA* gene. **A** PCR amplification of an internal *lipA* fragment. *Lanes:* 1 100-bp ladder molecular size markers, 2 PCR product using total strain IGB83 DNA as template. **B** Southern blot hybridization using an internal *lipA* fragment as probe. *Lanes:* 1 Total DNA of IGB83 strain digested with *Pst*I endonuclease, 2 total DNA of strain PAO1 digested with *Pst*I endonuclease, 3 total DNA of strain IGB83 digested with *Eco*R1 endonuclease, 4 total DNA of strain PAO1 digested with *Eco*R1 endonuclease

To isolate the complete strain IGB83 *lipA* gene, a *P. aeruginosa* strain IGB83 genomic library (Wild et al. 1997) was screened by colony hybridization using the 558-bp *lipA* PCR product as probe. A cosmid clone (pMA721) was thus identified. A 6.5-kb *Bam*H1 fragment containing the *lipA* gene was subcloned into plasmid pUC19 (Yanisch-Perron et al. 1985), rendering plasmid pMA13, which was used as a template to sequence the entire *lipA* gene and 1,200 bp of its upstream region. The same 6.5-kb insert was cloned into plasmid pMP220, which is able to replicate in *P. aeruginosa*, rendering plasmid pMA18 (Table 1).

Table 1. Lipolytic activity of different *Pseudomonas aeruginosa* strains. The activity was determined in the culture supernatant from cells grown for 12 h in FAM+olive oil and using *p*-nitrophenylpalmitate as substrate. Lipase units correspond to nmol of hydrolyzed substrate per min and per mg of protein. *lipA*⁻, *lipA* chromosomal mutant; *lipA*⁺, containing a plasmid carrying a functional *lipA* gene

Strain (characteristics)	Lipase units	Percent
IGB83 (wild-type)	16.0±2.3	100
IGB0 (<i>lipA</i> ⁻)	3.9±1	24
IGB0/pMA18 (<i>lipA</i> ⁺)	14.8±3	91
PAO1 (wild-type)	13.2±1.6	100
29.1 (<i>lipA</i> ⁻)	0.12	<1
29.1/pMA18 (<i>lipA</i> ⁺)	16.4±1.6	123

The IGB83 *lipA* gene codes for a prolipase of 311 amino acids with a signal peptide of 26 residues. The lipase has a molecular mass of 30.1 kDa, a *pI* of 5.8, and is 99% identical to the lipase produced by *P. aeruginosa* strain PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>), showing only two amino acid changes: isoleucine for valine at position 204, and glutamine for glutamic acid at position 280. Among the deduced protein sequence from the five *P. aeruginosa lipA* genes sequenced to date (Chihara-Siomi et al. 1992; Ihara et al. 1991; Shinkai et al. 1996; Wohlfarth et al. 1992; GenBank accession number X63390 S43732), there are only seven amino acid changes, showing the high conservation of these enzymes.

Construction of a *P. aeruginosa* IGB83 *lipA* mutant

A strain IGB83 *lipA* mutant (IGB0) was isolated by selecting transformants with plasmid pMA558 inserted and disrupting the *lipA* gene (Fig. 2A). The disruption of the *lipA* gene in mutant IGB0 was determined by Southern blot hybridization (Fig. 2C). Mutant IGB0 had a 75% reduction of lipase activity, measured with *p*-nitrophenyl palmitate as substrate when this strain was grown on FAM+olive oil (Table 1). The lipase deficiency of mutant IGB0 was complemented by plasmid pMA18 (Table 1). The PAO1-derived *lipA* mutant 29-1 (Wohlfarth et al. 1992) was also complemented by plasmid pMA18 (Table 1), confirming that it contained the strain IGB83 *lipA* gene. These results show that the strain IGB83 *lipA* gene encodes the major *P. aeruginosa* IGB83 lipase and suggest that the residual IGB0 lipase activity (25%, Table 1) is encoded by a different gene, as has been reported in other *P. aeruginosa* strains (Martínez et al. 1999).

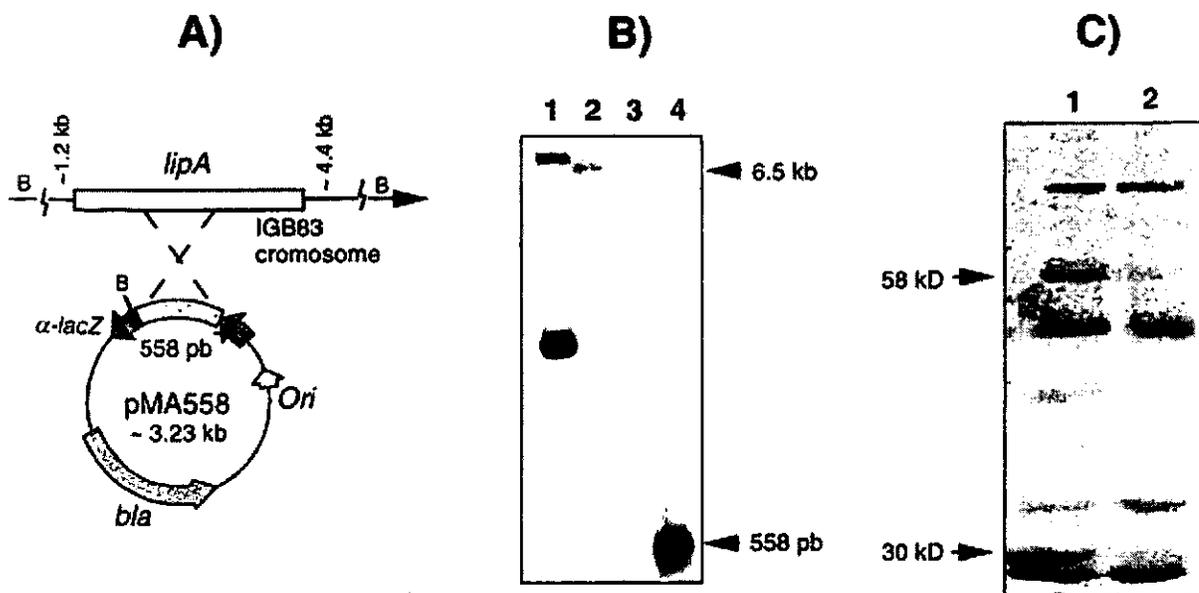


Fig. 2A-C. Characterization of the *P. aeruginosa* strain IGB83 *lipA* mutant IGB0. **A** The molecular events leading to *lipA* disruption in strain IGB0. *P* corresponds to the *Pst*I restriction enzyme sites. The size of the lines drawn is not a scale of the corresponding molecular sizes. **B** Southern blot hybridization using an internal 558-bp *lipA* fragment as probe of total DNA, digested with *Bam*H1 endonuclease, of the IGB0 *lipA* mutant and wild-type strain IGB83. *Lanes:* 1 IGB0, 2 IGB83, 3 DNA molecular size markers, 4 PCR-amplified *lipA* fragment used as probe. **C** Extracellular protein profile of strain IGB83 (*lane 1*) and mutant IGB0 (*lane 2*). *Arrows* show the molecular mass in kDa of the proteins absent in the IGB0 supernatant

The extracellular protein profile of strain IGB83 and its derived *lipA* mutant IGB0 showed that the latter strain produced very reduced amounts of the 30-kDa and the 58-kDa band (Fig. 2B).

Effect of carbon source on the expression of *P. aeruginosa* IGB83 lipolytic activity and *lipA* expression

Strain IGB83 was isolated by its ability to grow on a mineral salt medium with olive oil as the only carbon source (FAM+olive oil), and was later shown to possess a high lipolytic activity (Palmeros et al. 1994). Strain IGB83 was able to grow on FAM+succinate with a doubling time of 1.1 h, which is similar to the 1.25 h doubling obtained in FAM+olive oil medium. To study the effect of the carbon source on strain IGB83 lipase expression, these two media were used. The results show that strain IGB83 lipase is expressed at a lower level in FAM+olive oil medium than in FAM+succinate medium (Table 2).

Table 2. Lipase production and *lipA* expression (β -galactosidase activity) of *P. aeruginosa* strain

IGB83, with plasmids pMA19 and pMA77, grown on FAM medium with two different carbon sources. Lipase measurements were done using culture supernatants after 5 or 18 h of bacterial growth. Lipase units correspond to nmol of hydrolyzed substrate per minute and mg of protein. *ND* Not done

Carbon source	Lipase units		β -galactosidase units	
	Olive oil	Succinate	Olive oil	Succinate
Strain				
IGB83 (5 h)	28.3±1.2	50.3±2.0	ND	ND
IGB83 (18 h)	18.3±0.4	56.6±0.5	ND	ND
IGB83/pMA19 (5 h)	28.2±1.0	45.0±0.8	352±22	867±104
IGB83/pMA19 (18 h)	21.0±5.3	53.0±0.8	70±11	49±4
IGB83/pMA77 (5 h)	30.5±3.9	53.0±1.0	70±4	33±2
IGB83/pMA77 (18 h)	25.6±1.9	52.3±0.4	93±30	36±3

To study transcriptional regulation of the strain IGB83 *lipA* gene, a *lipA::lacZ* fusion was constructed by cloning 1,200 bp, including 1,081 bp of the 5' *lipA* untranslated sequence, into plasmid pMP220 (Spaink et al. 1987) in the correct orientation (plasmid pMA19). The 1,200, bp *lipA* 5' region was isolated by PCR (data not shown). As a control, the same DNA sequence was cloned into the same plasmid, but in the opposite orientation (plasmid pMA77).

The expression of the *lipA::lacZ* gene fusion of plasmid pMA19 was studied in logarithmic and stationary phase cultures of strain IGB83 in FAM+succinate and FAM+olive oil media (Table 2). Expression of the IGB83 *lipA* gene was significantly higher in FAM+succinate medium, corresponding to the higher lipase activity detected under this condition, and was completely abrogated in the stationary phase of growth in cells grown in either medium (Table 2).

Discussion

We have previously reported the purification of the *P. aeruginosa* strain IGB83 lipase, showing that it was a 58-kDa protein (Palmeros et al. 1994). In this work we have shown that the strain IGB83 *lipA* gene codes for a 30-kDa protein, and that the *lipA* mutant IGB0 has greatly reduced levels of both the 58-kDa and the 30-kDa extracellular proteins. These results, together with the significant reduction of IGB0 lipase activity, strongly suggest that the strain IGB83 lipase is the dimer of the enzyme encoded by the *lipA* gene and that it was not completely denatured to the 30-kDa monomers under the SDS-PAGE conditions used. In contrast with our results, the apparent molecular mass of the *P. aeruginosa* LipA of different isolates is 30 kDa (Jaeger et al. 1994, 1999; Rosenau and Jaeger 2000; Soberón-Chávez and Palmeros 1994). The difference in the apparent molecular mass of the IGB83 LipA protein and other *P. aeruginosa* lipases might be due to differences in protein association, which most likely are due to posttranslational modification of the lipase in the IGB83 background, since the primary structure of all the reported *P. aeruginosa* LipA enzymes is almost identical. This hypothesis remains to be experimentally validated.

We isolated strain IGB83 on the basis of its ability to use olive oil as sole carbon source (Palmeros et al. 1994). Here we studied the level of lipase production and *lipA* expression using both olive oil and succinate as carbon sources and found that the lipolytic activity is higher on FAM+succinate medium. Furthermore, under this condition the *lipA* gene is expressed at a significantly higher rate (Table 2). This pattern of lipase expression, while not incompatible with a role for the LipA enzyme in olive oil assimilation, shows that the expression of lipase activity is not related to substrate availability and

suggests that LipA activity is not responsible for the growth of strain IGB83 on olive oil as carbon source. In agreement with the lack of relationship between lipase expression and olive oil assimilation, the strain IGB0 *lipA* mutant showed a growth rate on FAM+olive oil medium that was similar to that of its parental strain IGB83 (data not shown).

Acknowledgements. This work was financed in part by CONACyT through projects 0111P-N9506, 31698-N and 0028. The authors thank Eugenio López and René Hernández for technical assistance. Agustino Martínez held a CONACyT scholarship during the development of this project.

References

- Chihara-Siomi M, Yoshikawa K, Oshima-Hirayama N, Yamamoto K, Sogabe Y, Nakatani T, Nishioka T, Oda J (1992) Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Biochem Biophys 296:505-513
- Dharmstithi S, Kuhasuntisuk B (1998) Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. J Indian Microbiol Biotechnol 21:75-80
- Hancock REW, Carey AM (1979) Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J Bacteriol 140:902-910
- Ihara F, Kageyama Y, Hirata M, Nihira T, Yamada Y (1991) Purification, characterization and cloning of a lactonizing lipase from *Pseudomonas* species. J Biol Chem 266:18135-18140
- Irani V, Rowe J (1997) Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg²⁺ and heat. Biotechniques 22:54-56
- Jaeger K-E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Heuvel M, Misset O (1994) Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 15:29-63
- Jaeger K-E, Dijkstra B W, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu Rev Microbiol 56:315-351
- Kouker G, Jaeger K-E (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl Environ Microbiol 53:211-213
- Martínez A, Ostrovsky P, Nunn D (1999) LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. Mol Microbiol 34:317-326
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 431-435
- Palmeros B, Guereca L, Alagon A, Soberón-Chávez G (1994) Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. Process Biochem 29:207-212
- Rosenau F, Jaeger K-E (2000) Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanism of secretion. Biochimie 82:1023-1032

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Shinkai A, Hirano A, Aisaka K (1996) Substitutions of Ser for Asn-163 and Pro for Leu-264 are important for thermal stabilization of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem* 120:915-921

Soberón-Chávez G, Palmeros B (1994) *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Crit Rev Microbiol* 20:95-105

Spaink H, Okker R, Wijffelman C, Pees E, Lugtenberg B (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9:27-39

Wild M, Caro AD, Miller RM, Soberón-Chávez G (1997) Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol Lett* 153:279-285

Wohlfarth S, Hoesche C, Strunk C, Winkler UK (1992) Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Gen Microbiol* 138:1325-1335

Wolfgang S, Jaeger KE, Winkler UK (1986) Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 168:1070-1074

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors *Gene* 33:103-119