



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LOS PROMOTORES DEL OPERÓN *betIBA* Y DE  
*betT1* EN *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ERICK JAEL PALOMO PAZ**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2016**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Nuria Victoria Sanchez Puig  
**VOCAL:** Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
**SECRETARIO:** Dr. Javier Andrés Juárez Díaz  
**1er. SUPLENTE:** M EN C Laura Carmona Salazar  
**2° SUPLENTE:** Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Bioquímica, Edificio de Bioquímica y Farmacia,  
Laboratorio 102, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

**SUPERVISOR TÉCNICO:** Dra. Rosario A. Muñoz Clares

**SUSTENTANTE:** Erick Jael Palomo Paz

## **Agradecimientos**

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares por permitirme ser parte de su laboratorio desde el principio y por su apoyo incondicional en mi formación académica. Gracias por enseñarme que “la ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia”.

A mi asesor, el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, por su apoyo, enseñanzas y amistad otorgadas a lo largo de toda esta tesis. Gracias por la dedicación a este trabajo, por la disciplina con que se deben documentar los experimentos, por mostrarme el enfoque que la ciencia debe tener y por el tiempo que me ha permitido estar en su laboratorio.

Al Biol. Carlos Mújica Jiménez, por su valiosa asistencia técnica para el desarrollo de esta tesis. A su paciencia y eterna disponibilidad para ayudarme a mí y a mis compañeros de laboratorio en cada experimento que realizamos.

A la M. en B. María Eugenia Muñoz Díaz de León por su valiosa asistencia técnica y por permitirme el acceso al Taller de Plantas I y II (Facultad de Ciencias) para hacer uso del equipo de biología molecular, así como por su enorme amabilidad.

A la Dra. Lilian González Segura por su ayuda incondicional y por la motivación que me ha inspirado.

Al Dr. Víctor Javier Zaldívar Machorro, por su amistad y ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Erik, Javier, Ezdraz, Darío, Daniela, Carlos Alberto y Yudi. Ha sido un placer conocerlos y convivir con ustedes.

A la Dra. Nuria Victoria Sanchez Puig por el tiempo que invirtió en la revisión de esta tesis, por ofrecerme su ayuda de forma tan amable y por sus consejos académicos.

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por revisar con detenimiento mi tesis y por aportarme parte de su conocimiento.

Al CONACyT por su apoyo financiero al proyecto 59654

Al SNI por la beca otorgada de ayudante de investigador.

## **También quiero agradecer**

A mi madre, por su amor, apoyo incondicional y su modo de mostrarme a como dar siempre un paso adelante aunque las cosas parezcan difíciles. Gracias por los consejos, que han hecho de mí lo que soy y lo que seré.

A mi padre, también por su amor, apoyo y amistad, y por siempre tener oído para escuchar mis ideas y conocimientos, por esas pláticas que llevan de un tema a otro y que podrían durar días enteros.

A mi hermano, Edgar, por mostrarme que siempre se puede sonreír aunque haya tenido días pesados y por contagiarme de la vitalidad que tiene.

# Índice

Abreviaturas	i
I. Resumen	ii
II. Introducción	8
III. Antecedentes experimentales	14
IV. Planteamiento del problema	19
V. Hipótesis	20
VI. Objetivos	
VI.1. Objetivo general	20
VI.2. Objetivos particulares	20
VII. Materiales y métodos	
VII.1. Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento	21
VII.2. Construcciones moleculares	22
VII.3. Transformación y selección de las células transformantes	28
VII.4. Condiciones de crecimiento para estimular la transcripción	30
VII.5. Determinación de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa	31
VIII. Resultados	
VIII.1. Construcciones moleculares	32
VIII.1.1. Fusión transcripcional <i>pbetIBA-ABCD:lacZ</i>	33
VIII.1.2. Clonación de las construcciones <i>pbetIBA-D:lacZ</i> y <i>pbetT1-D:lacZ</i> en células de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	36
VIII.2. Actividad transcripcional de las fusiones <i>pbetIBA-D:lacZ</i> , <i>pbetT1-D:lacZ</i> y <i>pbetIBA-ABCD:lacZ</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	
VIII.2.1. Actividad transcripcional de la construcción <i>pbetIBA-D:lacZ</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	38
VIII.2.2. Actividad transcripcional de la construcción <i>pbetT1-D:lacZ</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	39
VIII.2.3. Actividad transcripcional de la construcción <i>pbetIBA-ABCD:lacZ</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	41
IX. Discusión	50
X. Conclusiones	60
XI. Perspectivas	61
XII. Bibliografía	62
Anexo 1	66
Anexo 2	67

## Abreviaturas

**ALDH** Aldehído deshidrogenasa

**BAL** Betaína aldehído

**BADH** Betaína aldehído deshidrogenasa

**CDH** Colina deshidrogenasa

**Cb** Carbenicilina

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

*EcBetI* Proteína reguladora BetI de *Escherichia coli*

**EDTA** Ácido etilendiamino tetra-acético

**GB** Glicina betaína

*lacZ* Gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa (**LacZ**)

**LB** Luria Bertani

**NAD(P)<sup>+</sup>** Dinucleótido de nicotinamida y adenina (fosfato), forma oxidada

**NAD(P)H** Dinucleótido de nicotinamida y adenina (fosfato), forma reducida

*PaBADH* Betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*

*PaBetI* Proteína reguladora BetI de *Pseudomonas aeruginosa*

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

**SDS** Dodecil sulfato de sodio

## I. Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista en pacientes que se encuentran inmunocomprometidos. Posee resistencia a múltiples antibióticos, lo que la vuelve difícil de eliminar, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. En este grupo de investigación se propone a la betaína aldehído deshidrogenasa (*PaBADH*) como un posible blanco de inhibidores, como el Disulfiram y sus metabolitos, para provocar la acumulación de betaína aldehído, intermediario tóxico de la ruta de síntesis de glicina betaína, a partir de colina y así combatir las infecciones causadas por el patógeno.

El gen que codifica la *PaBADH* se encuentra en el operón *betIBA*, de manera contigua y en dirección divergente se posiciona el gen *betT1*, que codifica un transportador de colina. En la secuencia intergénica hay tres dominios promotores, dos de los cuales están sobrelapados y divergentes, *A* y *C*, que donde se une la proteína reguladora, *BetI*. El tercer promotor, denominado *B*, se encuentra río arriba de *A*.

Para conocer el papel de estas secuencias promotoras en la regulación de *betIBA-betT1*, previamente en el laboratorio se realizaron fusiones transcripcionales con *lacZ* como gen reportero, utilizando a la secuencia intergénica en dirección a *betIBA* (*pbetIBA-ABC:lacZ*) y en dirección al gen *betT1* (*pbetT1-CAB:lacZ*). Se encontró que la regulación de la expresión de *betT1* no se limita a la secuencia intergénica, por lo que se realizaron otros estudios con la fusión transcripcional *pbetT1-CDAB:lacZ*, que abarca 90 pb más a partir del codón de inicio del gen *betI*, donde también se predijo un promotor, denominado *D* y que se localiza río arriba de *C*.

En este trabajo se realizó el estudio de la actividad transcripcional de *betIBA-betT1* en diferentes estímulos, ya sea con colina, con glucosa o con succinato o en condiciones mixtas de colina más glucosa o colina más succinato generando las construcciones *pbetIBA-D:lacZ*, *pbetT1-D:lacZ* (sólo incluyen al promotor *D*) y la fusión *pbetIBA-ABCD:lacZ* para conocer así el papel de los cuatro promotores en la regulación transcripcional hacia *betIBA*. Se encontró que *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* no contienen los elementos suficientes para dirigir la transcripción de *betIBA-betT1*, pues no hubo respuesta a ninguno de los estímulos utilizados. También se encontró que *pbetIBA-ABCD:lacZ* sí contiene los elementos en *cis* necesarios para regular la transcripción de *betIBA-betT1*, pues presentó mayor aumento de actividad en estímulo con solamente colina respecto al observado con *pbetIBA-ABC:lacZ*, sugiriendo que los cuatro promotores están involucrados en la regulación de *betIBA*. Esto podría deberse a un rearrreglo estructural del DNA promovido por cambios conformacionales de la proteína *BetI* que podría interactuar con los elementos promotores estudiados.

Finalmente, se propone un modelo de regulación en el que señalamos el papel que desempeñan cada uno de los promotores estudiados. De esta manera, los promotores *C* y *D* son necesarios en conjunto para promover la transcripción de *betT1* en estímulo con colina aún en presencia de glucosa o succinato. De manera similar, las cajas *A* y *B* son necesarias para promover la transcripción de *betIBA* en las mismas condiciones nutrimentales. Sin embargo, la caja *D* parece regular negativamente la transcripción inducida por *A* en ausencia de colina, *B* estaría regulando negativamente la transcripción inducida por *C* también en ausencia de colina.

Además, se concluyó que con las cuatro cajas promotoras, la expresión de *betIBA* se estimula con colina aun en presencia de glucosa o succinato, fuentes de carbono que podrían reprimir su expresión.

## II. Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa con una gran versatilidad metabólica, gracias a ello, puede crecer en una amplia variedad de hábitats, desde suelo, pantanos, costas marinas hasta tejidos de plantas y de animales. Forma parte de la microbiota habitual de la piel en humanos y rara vez provoca infecciones. Sin embargo, representa serios problemas en los hospitales, donde es responsable de alrededor del 10 % de las infecciones intrahospitalarias en pacientes que se encuentran inmunocomprometidos tales como aquellos que padecen cáncer, diabetes, fibrosis quística, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y aquellos que han recibido un trasplante, víctimas de quemaduras y pacientes en terapia intensiva o bajo quimioterapia (Korvik *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 2004; Diab *et al.*, 2006; Ho Sui *et al.*, 2012).

Esta bacteria destaca por su capacidad de producir múltiples factores de virulencia para infectar a su hospedero, entre los cuales se encuentra la resistencia a una gran variedad de antibióticos (Wagner *et al.*, 2004). Esto genera serios problemas de salud debido a las infecciones causadas por este patógeno, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para combatirlas (Ho Sui *et al.*, 2012).

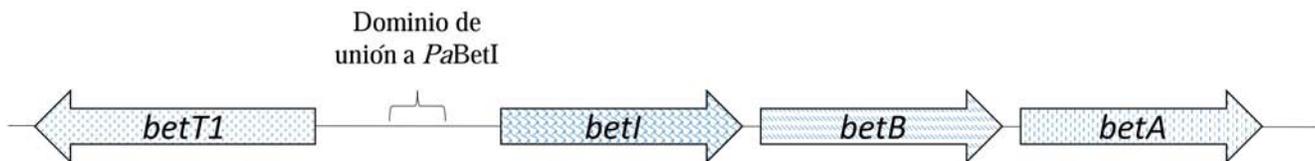
Como se mencionó anteriormente, este microorganismo posee la habilidad de adaptarse a los cambios en su entorno, puesto que en su genoma contiene numerosos genes involucrados en el transporte y en el metabolismo de una amplia gama de nutrientes (Andonova y Urumova, 2013). Un ejemplo de esta adaptación es que este patógeno, como muchos otros, necesita adquirir o sintetizar osmolitos orgánicos, conocidos como solutos compatibles, para acumularlos a niveles intracelulares elevados y así obtener osmoprotección, la cual previene la difusión de agua al exterior de la célula (Landfald *et al.*, 1986) causada por el estrés osmótico que el hospedero genera y de esta manera prevalece en los tejidos que usualmente infecta (Fitzsimmons *et al.*, 2012).

Una de las moléculas que se considera como soluto compatible más eficiente y de uso más extendido en la naturaleza es la glicina betaína (GB). Esta sustancia puede obtenerse directamente del medio o sintetizarse a partir de colina (Mandon *et al.*, 2003) mediante mecanismos que son muy parecidos entre varias especies de bacterias, incluyendo

a *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2006a), *Escherichia coli* (Lamark *et al.*, 1996), *Sinorhizobium meliloti* (Mandon *et al.*, 2003), *Yersinia pestis*, *Vibrio harveyi* (van Kessel *et al.*, 2015), entre otras.

Estas bacterias cuentan con los genes necesarios para la conversión de colina a GB. Frecuentemente, estos genes están incluidos en un operón, denominado *betIBA*, con una variante en *S. meliloti*, que además incluye el gen que codifica una colina sulfatasa en el mismo operón (Mandon *et al.*, 2003).

El operón consiste en el gen *betI*, que codifica la proteína reguladora del mismo operón (BetI), el gen *betB*, que codifica una betaína aldehído deshidrogena (BADH) y *betA*, el cual codifica una colina deshidrogenasa. En cuanto al transporte de la colina al citoplasma, existen transportadores específicos, tales como BetT1, cuyo gen en el caso de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *Y. pestis*, tienen en común que el gen *betT1* está dispuesto de manera contigua y divergente al operón *betIBA* (Lamark *et al.*, 1996; Malek *et al.*, 2011) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema del operón *betIBA* y de *betT1* en *P. aeruginosa*. Se observan los genes estructurales de *betIBA* y de *betT1*. También se señala el sitio donde se une la proteína reguladora *PaBetI*.

### *Catabolismo de colina en P. aeruginosa*

En los tejidos donde *P. aeruginosa* infecta, generalmente abundan los precursores de colina, tales como fosfatidilcolina, fosforilcolina y acetilcolina. La bacteria es capaz de incrementar la concentración de colina en el medio degradando estos precursores por la acción de la fosfolipasa C, la fosfatidilcolina fosfatasa y la colinesterasa, respectivamente (Fitzsimmons *et al.*, 2012). De esta manera, *P. aeruginosa* obtiene la capacidad de colonizar diferentes tejidos (Wargo *et al.*, 2008), pues se ha propuesto que la adquisición de colina

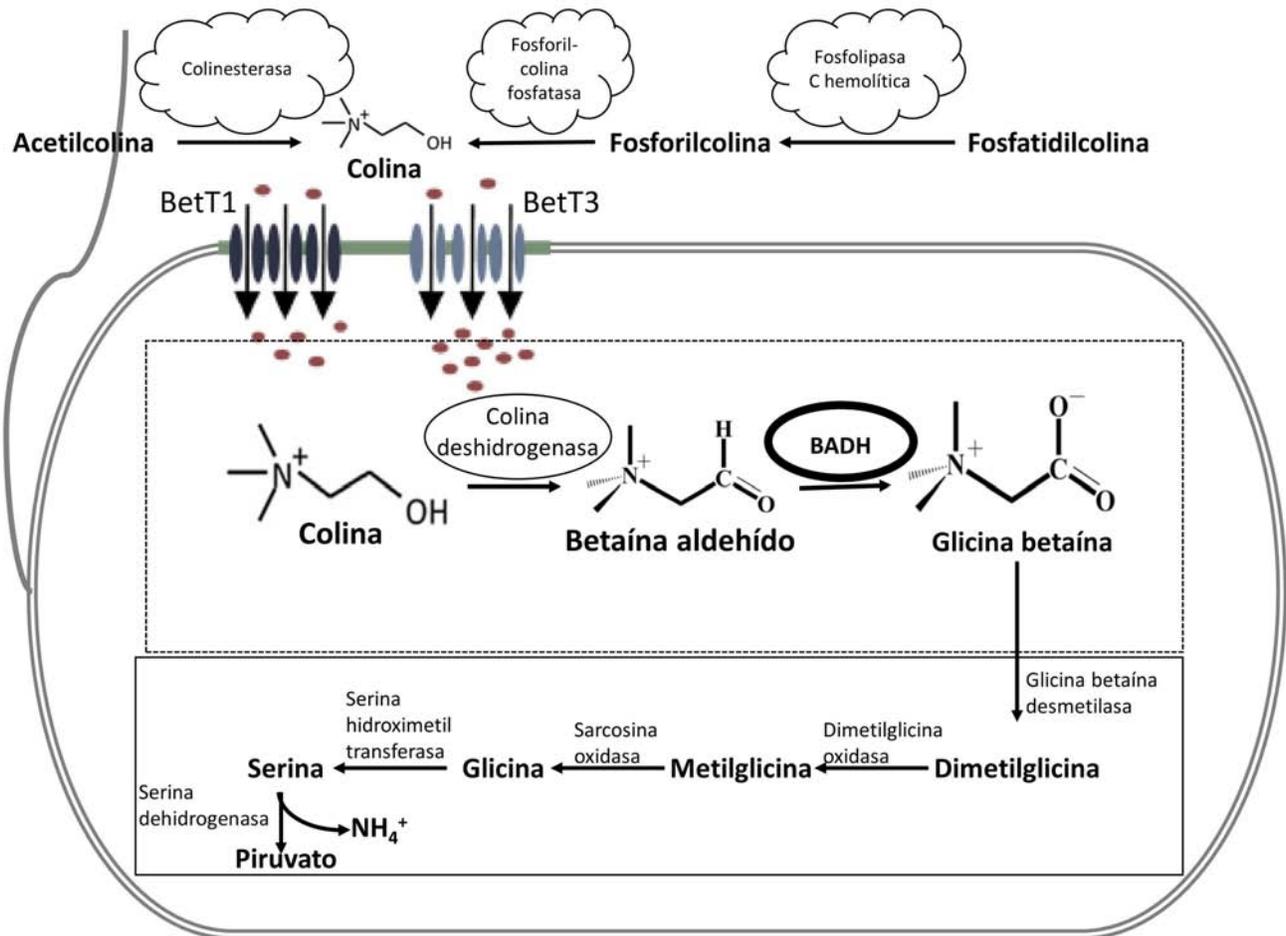
por *P. aeruginosa* promueve su sobrevivencia y su virulencia (Fitzsimmons *et al.*, 2012), lo que ha motivado el estudio del catabolismo de colina y sus precursores en esta bacteria.

En un estudio de microarreglos se investigaron los perfiles de expresión genética de *P. aeruginosa* proveniente de esputo de pacientes con fibrosis quística y se encontró que los genes *betT1* y *betT3* incrementan su expresión. Estos genes codifican dos de los transportadores de colina, BetT1 y BetT3, respectivamente. Así mismo, se encontraron altos niveles de expresión del operón *betIBA*. Esto sugiere que la colina se importa activamente durante las infecciones en estos enfermos y que participa de manera importante en la colonización de los pulmones por medio de su efecto sobre la expresión del operón *betIBA* (Malek *et al.*, 2011).

En el operón *betIBA* están codificadas la colina deshidrogenasa (*betA*) y la *PaBADH* (*betB*), enzimas involucradas en la biosíntesis de GB en *P. aeruginosa* mediante la conversión de colina a BA y ésta a GB, respectivamente (Figura 2). Es posible que la ruta catabólica de GB se detenga para así acumularla cuando la bacteria la requiere como osmoprotector, o bien, puede continuar su degradación hasta la obtención de piruvato, siendo así una fuente de energía (Diab *et al.*, 2006).

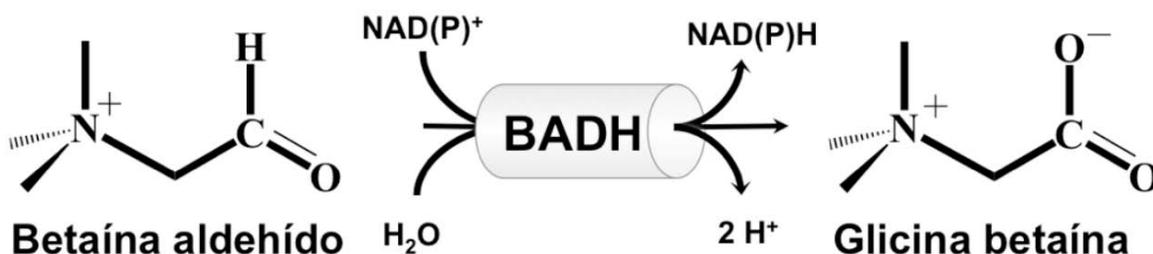
En la primera etapa de la biosíntesis de GB se produce como intermediario aldehído la betaína aldehído (BA) que, de acumularse, podría resultar tóxico para la bacteria, pues se sabe que los aldehídos son compuestos electrofílicos, altamente reactivos frente a tioles y grupos amino; pocos de ellos tienen efectos terapéuticos, como el retinaldehído, indispensable para la visión, siendo la mayoría citotóxicos, genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos, aun a muy bajas concentraciones (Zaldívar-Machorro, 2011).

Una forma para eliminar los efectos nocivos de los aldehídos es su biotransformación en sus correspondientes ácidos carboxílicos en una reacción catalizada por las aldehído deshidrogenasas (ALDH), presentes en todos los organismos, lo que muestra su gran relevancia fisiológica. Como se ha ido mencionando, en *P. aeruginosa*, la ALDH responsable de la conversión de BA a GB es la BADH (*PaBADH*), siempre y cuando la bacteria se encuentre creciendo en un medio que contenga colina o alguno de sus precursores (Zaldívar-Machorro, 2011).



**Figura 2.** Catabolismo de colina y sus precursores en *P. aeruginosa*. En el recuadro punteado se enmarca la primera parte de la ruta catabólica de degradación de colina involucrada en la producción de GB así como la representación esquemática de la arquitectura del operón *betIBA* y de *betT1*. En el recuadro inferior se muestra la parte del catabolismo de GB hasta piruvato.

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, betaína aldehído NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreductasa, E.C. 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible de la BAL con la simultánea reducción del NAD(P)<sup>+</sup> (Figura 3) (Velasco-García *et al.*, 1999).



**Figura 3.** Reacción de oxidación de la betaína aldehído catalizada por la BADH.

Gracias a la actividad de la *Pa*BADH, la bacteria no sólo puede obtener carbono y nitrógeno a partir de colina o de sus precursores, sino que además obtiene un osmoprotector muy eficiente, la GB, y al NAD(P)H como equivalente de reducción para el anabolismo y la defensa frente al estrés oxidativo que le imponen las defensas del hospedero. Se propone que esta enzima está involucrada en la fisiopatología de la bacteria y es un blanco potencial de agentes antimicrobianos (Velasco-García *et al.*, 2003; 2006b).

La inhibición específica de la *Pa*BADH provocaría la acumulación de BAL en *P. aeruginosa*, que como ya se mencionó, es un compuesto altamente tóxico que si alcanza niveles altos, podría matar a la bacteria o detener su crecimiento coadyuvando a la acción de otros agentes antimicrobianos. En nuestro grupo de trabajo, se han probado el disulfiram y sus metabolitos, mismos que son reactivos específicos de tioles, como inhibidores de la actividad de la *Pa*BADH (Velasco-García *et al.*, 2003; 2006b; Zaldívar-Machorro, *et al.* 2011) (Anexo 1). Estos compuestos podrían tener un uso en el combate de la infección por *P. aeruginosa*, ya que el disulfiram es un fármaco actualmente aprobado y usado en clínica para otros fines, tal como en el tratamiento contra el alcoholismo. (Hald y Jacobsen, 1948; Brien y Loomis, 1985).

### *Represión catabólica por fuentes de carbono*

Cuando las bacterias se encuentran en medios con dos fuentes de carbono y de energía frecuentemente presentan un crecimiento bifásico (diaúxico). Esto indica que hay un uso secuencial de las fuentes de carbono y de energía presentes, en lugar de un uso simultáneo. Durante la primera fase exponencial de crecimiento, en donde la fuente de carbono preferida para el microorganismo está siendo utilizada, la expresión de los genes que codifican las enzimas catabólicas requeridas para la asimilación de la segunda fuente de carbono se encuentran reprimidos, a pesar de la presencia de esta segunda fuente de carbono en el medio. Este comportamiento es denominado represión catabólica. El crecimiento celular puede hacerse lento (fase *lag*) o detenerse hasta que la primera fuente de carbono se agote y la maquinaria catabólica requerida para asimilar a la segunda fuente de carbono se establece por completo. Esto genera entonces una segunda fase de crecimiento exponencial (Collier *et al.*, 1996).

Existe la posibilidad de que la transcripción de la *PaBADH* se inhiba por represión catabólica debido a otras fuentes de carbono diferentes a colina, tales como el succinato y la glucosa, ya que en los sitios de infección ambos están presentes. Se conoce que los cultivos de *P. aeruginosa* presentan una curva de crecimiento diaúxico cuando en el medio de cultivo hay una cantidad limitada de succinato más un exceso de glucosa. Esto refleja el control por medio de represión catabólica debida al succinato, de genes catabólicos inducibles (Wolff *et al.*, 1991). Además se sabe que el succinato dispara un mecanismo de represión catabólica sobre la expresión de *plcH*, que codifica a la fosfolipasa C hemolítica (Sage, 1997), pues disminuye la actividad transcripcional de *plcH*, provocando una baja producción de esta enzima que es importante en la conversión de fosfatidilcolina a fosforilcolina (Figura 2) para la posterior obtención de colina.

Por otra parte, se sabe que el grado de crecimiento de la bacteria es mayor en medios con sólo succinato, seguido de medios con sólo glucosa, y por último con sólo GB. (Diab *et al.*, 2006).

En *E. coli*, la glucosa produce represión catabólica sobre varios operones, un ejemplo de ellos es el operón *lac*, pues cuando esta fuente de carbono está presente, no se activa la transcripción del operón aún en presencia de lactosa. Para que se pueda encender

la actividad transcripcional del operón *lac*, es necesario que no haya glucosa en presencia de lactosa. De manera similar ocurre con el catabolismo de galactosa, pues cuando las células de *E. coli* crecen en un medio con glucosa y galactosa se observa una curva de crecimiento diáuxico (Snyder y Champness. 2007).

Debido a lo anterior, es necesario conocer el comportamiento de la expresión del operón *betIBA* en presencia de distintas fuentes de carbono como succinato o glucosa, mismas que se probaron en este trabajo para conocer si la *PaBADH* continúa expresándose aún en presencia de estos compuestos y así investigar si la *PaBADH* pudiera ser un buen candidato de inhibición para combatir las infecciones provocadas por *P. aeruginosa*.

### III. Antecedentes experimentales

Para evaluar la transcripción del operón *betIBA* y del gen *betT1* se realizó en el laboratorio un análisis *in silico* para identificar a las posibles secuencias con características de promotor. Se encontró que las secuencias, denominadas *A* y *C* tienen características de promotor y, además, están traslapadas y en posición divergente (Figuras 4 y 5). La secuencia *A* es el promotor que dirige la transcripción hacia el operón *betIBA* y la *C* hacia el gen *betT1* (Velasco-García *et al.*, 2006b). Asimismo, se observó que donde estas dos secuencias se traslapan se encuentra el sitio de unión de la proteína reguladora BetI, de la cual se ha descrito que en *E. coli* responde a colina (Røkenes *et al.* 1996). Además, se encontró una tercera secuencia promotora río arriba de *A*, denominada *B* (Figuras 4 y 5), también sobre la secuencia intergénica, que podría regular la transcripción hacia *betIBA*.

En base a esto, se decidió clonar la secuencia intergénica que comprende 332 pb y fusionarla a *lacZ*, como gen reportero, en el vector pLP170 (Linn y St. Pierre, 1990) (Anexo 2). Las fusiones transcripcionales resultantes, llamadas *pbetIBA-ABC:lacZ* y *pbetT1-BAC:lacZ*, respectivamente, se usaron para realizar el análisis de actividad transcripcional de forma divergente, considerando que sólo las cajas *A* y *C* estarían involucradas en la regulación.

Dicho análisis se realizó utilizando células de *P. aeruginosa* transformantes con cada fusión transcripcional creciendo en medios con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno o, succinato o glucosa más NH<sub>4</sub>Cl, o en condiciones mixtas, es decir, con succinato o glucosa más NH<sub>4</sub>Cl y colina. La actividad transcripcional se determinó midiendo la actividad de la β-galactosidasa (LacZ) expresada en unidades Miller (U.M.) que contemplan el aumento en la producción de *o*-nitrofenol (ONP) debido a la hidrólisis de *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) por la actividad de esta enzima. Esta metodología se utilizó en todos los casos.

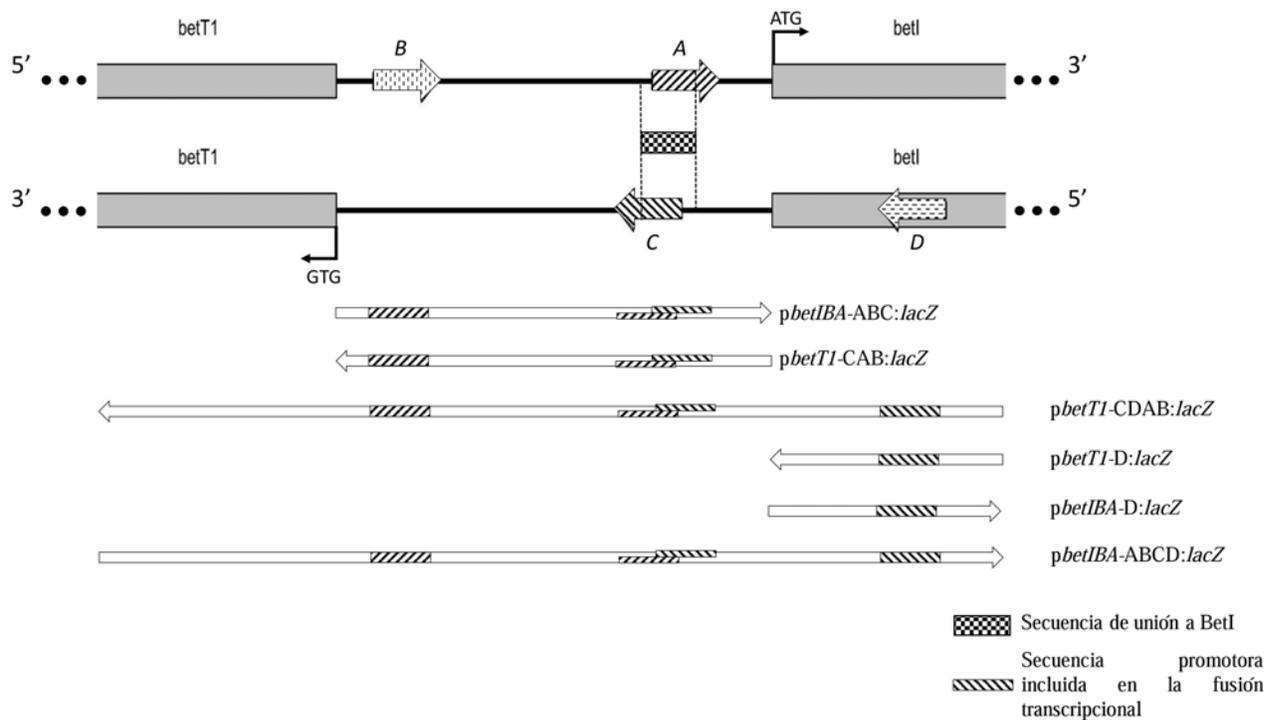
Los resultados obtenidos con las fusiones *pbetIBA-ABC:lacZ* y *pbetT1-CAB:lacZ* se muestran de forma resumida en las Figuras 6A, 6B y 6D. Con estos datos fue posible sugerir que las cajas *A* y *B* regulan la expresión del operón *betIBA*, pero que la caja *C*, en esta región en dirección hacia *betT1*, no es suficiente para lograr la regulación de la expresión y era necesario analizar una secuencia más extensa. Se decidió tomar 209 pb del gen *betI* y de *betT1*, lo cual representaría apenas 69 aminoácidos de los 197 de la proteína BetI y de los más de 500 del transportador BetT1, para analizar un fragmento de 750 pb.

Sobre el fragmento tomado de la secuencia de *betI* se encontró otra secuencia con probable actividad promotora, denominada *D* (Figuras 4 y 5), la cual pensamos que regularía la transcripción hacia *betT1*. En base a ese análisis se realizó la fusión transcripcional *pbetT1-CDAB:lacZ*, y los resultados obtenidos con ella se resumen en la Figura 6C y 6D. Claramente se diferencian de los obtenidos con la fusión *pbetT1-CAB:lacZ*, ya que con el promotor *D* la actividad a t=0 fue significativamente mayor ( $p=0.00002$ ) y el aumento máximo de actividad fue de 9 veces, a diferencia de las dos veces que se obtuvo sin el promotor en presencia de colina. En el medio con succinato o glucosa se encontró que la actividad no aumentó y se mantuvo constante, pero aún no se habían hecho pruebas en medios de cultivo mixtos, lo cual forma parte de este trabajo de tesis.

Estos datos nos motivaron a analizar si el promotor *D* tiene los elementos suficientes para dirigir la transcripción por sí solo o si depende del promotor *C*. Para ello, se construyeron las fusiones transcripcionales *pbetT1-D:lacZ* y *pbetIBA-D:lacZ* que incluyen 209 pb a partir del codón de inicio del gen *betI* (Figura 4). Las pruebas realizadas en los

diferentes medios de cultivo conteniendo diferentes fuentes de carbono forman parte de este trabajo de tesis.

Debido a que en los experimentos con la fusión transcripcional *pbetIBA-ABC:lacZ* sí hay una regulación evidente con los promotores *ABC*, se pensó que el promotor *D* también podría estar involucrado en la regulación de la transcripción del operón *betIBA*, por lo que para este trabajo de tesis se decidió construir también la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ* para conocer su comportamiento en los mismos medios de cultivo en los que se han probado las otras fusiones transcripcionales.



**Figura 4.** Esquema de la secuencia intergénica más 209 pb a partir del codón de inicio de los genes *betI* y *betT1*. Secuencias que poseen características de promotor están indicadas con flechas diferentes, *A*, *B*, *C* y *D*. Debajo del esquema se muestran las secuencias que se clonaron para fusionarlas a *lacZ* y su extensión. Las flechas indican la dirección en que inician la transcripción. Cada fusión transcripcional está indicada con su nombre asignado.

A: 5'-AGTTGATTGAACGTTCAATAAAAAACAAAATAGACTGGCCACCAATGACGT-3'

Puntaje: 1.00

Caja -10: 5'-AAATAGACT-3' Score: 36

Caja -35: 5'-TTGATT-3' Score: 53

B: 5'- TGTTTTTATTGGCGAAGCAGTACTCATTGGAGGATGACCCCATGGCAGTG-3'

Puntaje: 0.85

Caja -10: 5'-TTGGAGGAT-3' Score: 18

Caja -35: 5'-TTTATT-3' Score: 34

C: 5'- ATTTTGTTTTTATTGAACGTTCAATCAACTAAGAATAAGCTCGGCGTCCA-3'

Puntaje: 1.00

Caja -10: 5'-GAATAAGCT-3' Score: 32

Caja -35: 5'-TTGAAC-3' Score: 38

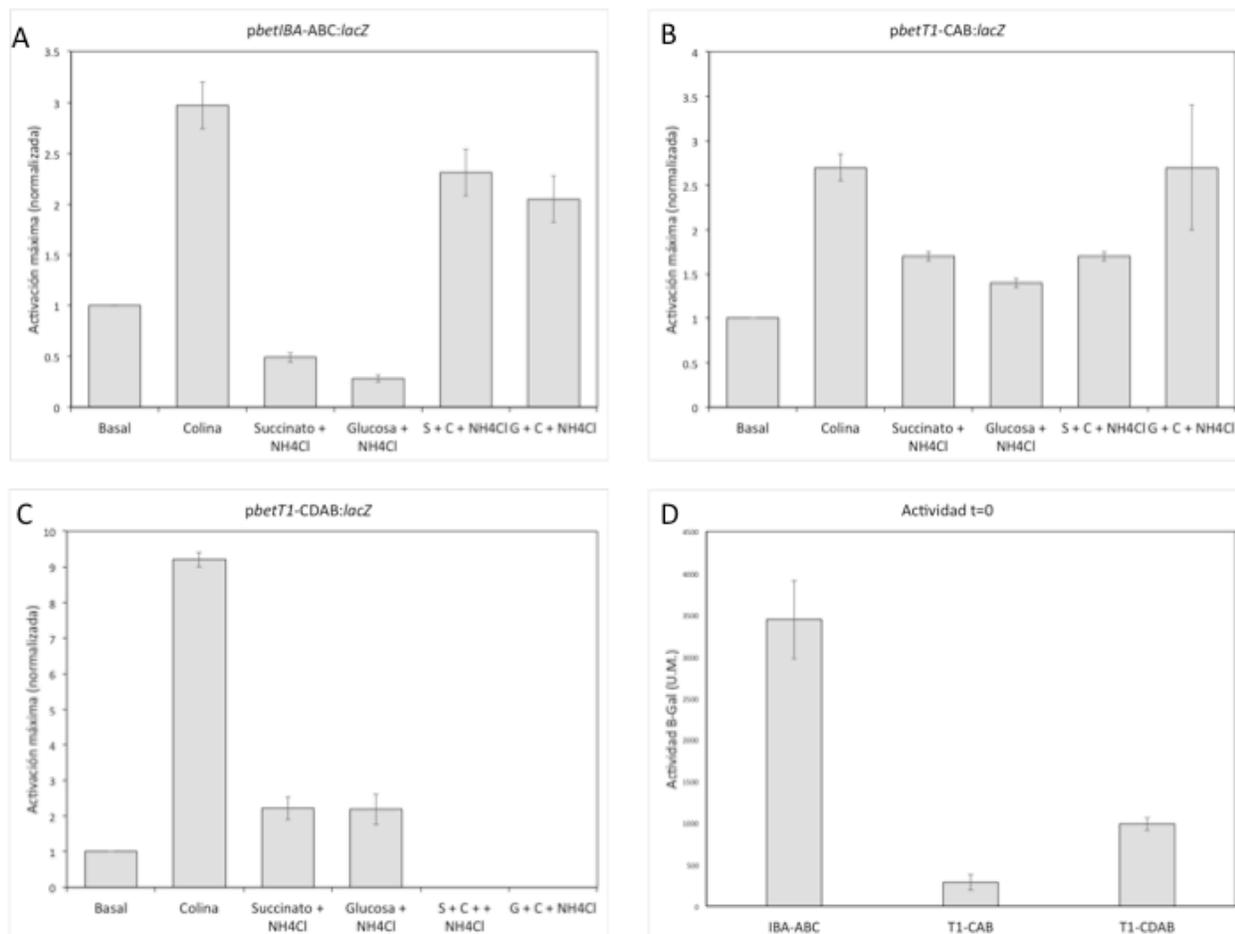
D: 5'- CTGATGATGCCGTTGGAAACACCCGCCAGGCGGGCTATCAGGGCGATGCT-3'

Puntaje: 0.99

Caja -10: 5'-GGCTATCAG-3' Score: 29

Caja -35: 5'-TTGGAA-3' Score: 32

**Figura 5.** Promotores del operón *betIBA* y del gen *betI1*. Se muestran las secuencias promotoras con sus respectivos scores de promotor así como las cajas -10 y -35 también con sus propios puntajes obtenidos con los algoritmos, *Neural Network* (Reese *et al.*, 2000;2001) y *Softberry BPROM* (Solovyev y Salamov, 2011).



**Figura 6.** Datos normalizados de los niveles de activación máxima de la transcripción bajo las distintas condiciones nutrimentales con respecto a la actividad inicial absoluta inicial. **A.** Actividad de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ*. **B.** Actividad de la construcción *pbetT1-CAB:lacZ*. **C.** Actividad de la construcción *pbetT1-CDAB:lacZ*. **D.** Actividad transcripcional absoluta a t=0 en medio de cultivo con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno de las fusiones *pbetIBA-ABC:lacZ* (IBA-ABC), *pbetT1-CAB:lacZ* (T1-CAB) y *pbetT1-CDAB:lacZ* (T1-CDAB) (Juarez-Díaz, datos no publicados). S: succinato; C: colina; G: glucosa; Basal: actividad t=0.

#### IV. Planteamiento del problema

Los resultados obtenidos previamente en el laboratorio sugieren que la regulación transcripcional de *betT1* requiere del elemento adicional localizado fuera de la región intergénica (caja *D*) y que, posiblemente, éste también influye en la regulación del operón *betIBA*. Por tal motivo, consideramos necesario analizar las fusiones transcripcionales *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* (Figura 4) para determinar el papel del promotor *D* en la regulación transcripcional de *betT1*.

Así mismo, pensamos que es necesario analizar la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ*, la cual incluye a los promotores *A*, *B*, *C* y *D*, para estudiar el comportamiento de la transcripción en sentido al operón *betIBA* (Figura 4). De esta manera, se pensamos que tendríamos un modelo experimental más cercano al fisiológico existente en las células de *P. aeruginosa* PAO1 para analizar a la regulación transcripcional del operón *betIBA* y del gen *betT1* en los estímulos probados previamente en el laboratorio. Esto con el objetivo de conocer si el gen *betB* se transcribe en las células creciendo con fuentes de carbono que se podía pensar que podrían ejercer represión catabólica sobre su expresión, lo que de ocurrir reforzaría la propuesta de la *PaBADH* como blanco de inhibición para el combate de infecciones por *P. aeruginosa* (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011), como se mencionó en la Introducción.

En este trabajo de tesis se estudió la actividad transcripcional de las fusiones transcripcionales *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* para conocer su papel de manera independiente en la regulación transcripcional de *betIBA* y de *betT1*, respectivamente, así como de la fusión *pbetIBA-ABCD:lacZ*, para conocer si el promotor *D* junto con los promotores de la región intergénica influyen en la regulación transcripcional de *betIBA* en células de *P. aeruginosa* transformantes, tanto en estímulo con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno como con glucosa o succinato más  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; o en condiciones mixtas con colina más glucosa o succinato, en ambos casos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno.

## V. Hipótesis

Debido a que la actividad transcripcional de la fusión *pbetT1-CDAB:lacZ* aumentó relativamente más que la de *pbetT1-CAB:lacZ* en estímulo con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno, es posible que la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ* también muestre la misma tendencia con respecto a la fusión *pbetIBA-ABC*. Así mismo es posible que las fusiones *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* induzcan la transcripción por sí solas debido a que se predice un promotor en estas regiones.

## VI. Objetivos

### VI.1. Objetivo general

Evaluar la actividad transcripcional de la región *pbetIBA-ABCD* y determinar si el promotor *D* por sí mismo tiene actividad promotora de manera divergente hacia *betIBA* y *betT1*).

### I.2. Objetivos particulares

1. Determinar si las regiones *pbetIBA-D* y *pbetT1-D* activan la transcripción del gen reportero *lacZ* en células de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en medios de cultivo con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno; con glucosa o succinato más NH<sub>4</sub>Cl; o en condiciones mixtas (-colina más glucosa o succinato más NH<sub>4</sub>Cl).
2. Evaluar la actividad transcripcional de la región *pbetIBA-ABCD:lacZ* en células de *P. aeruginosa* PAO1 creciendo en medios de cultivo con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno, con glucosa o succinato más NH<sub>4</sub>Cl, o en condiciones mixtas con colina más glucosa o succinato más NH<sub>4</sub>Cl.
3. Proponer un modelo de la regulación de la transcripción que ejercen los factores en *cis* sobre el operón *betIBA* y el gen *betT1* en *P. aeruginosa* PAO1.

## VII. Materiales y métodos

### VII.1. Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, la cual se cultivó aeróbicamente a 37 °C en medio líquido Luria-Bertanii (LB) y se almacenó en alícuotas de 1 ml de glicerol estéril al 50% con LB (v/v) a -80 °C hasta su uso.

La actividad transcripcional se determinó a partir de la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) creciendo a las células de la siguiente manera.

1. Se inoculó medio LB líquido con carbenicilina (Cb) a 200  $\mu\text{g/ml}$  (LB+Cb200) para preparar un precultivo con una colonia o con 5  $\mu\text{l}$  de bacterias congeladas. Se incubó con agitación a 37 °C por 12-16 h.
2. El precultivo se diluyó 1:10 en medio LB+Cb200 fresco. Se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6.
3. Se colectaron las células por centrifugación a 10,000 g y se sembraron en los siguientes medios (todos con carbenicilina a 200  $\mu\text{g/ml}$ ).
  - a) M9, medio mínimo de sales adicionado con glucosa 16 mM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  15 mM.
  - b) M9S, contiene lo mismo que el medio M9, pero con succinato 20 mM en lugar de glucosa.
  - c) M9C, igual que el M9, pero con colina 20 mM en lugar de glucosa y de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
  - d) M9+C, es el medio M9 más colina 20 mM.
  - e) M9S+C, es el medio M9S más colina 20 mM.

El medio mínimo de sales contiene  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM y  $\text{NaCl}$  8 mM. Al momento de realizar la siembra se adiciona  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM, 1 mM de  $\text{MgSO}_4$  y las fuentes de carbono y nitrógeno correspondientes, pH 7.2.

También se utilizaron las cepas de *E. coli* XL10-Gold y DH5 $\alpha$ . Ambas cepas se crecieron aeróbicamente a 37 °C en medio LB y se almacenaron en glicerol estéril con LB al 50% (v/v) a -80 °C por separado hasta su uso.

Las células de *P. aeruginosa* PAO1 transformantes con los diferentes plásmidos pLP170 se crecieron aeróbicamente a 37 °C en medio LB+Cb200.

Las células de *E. coli* XL10-Gold y DH5 $\alpha$  transformantes con los diferentes plásmidos pLP170 se crecieron aeróbicamente a 37 °C en medio LB más 100  $\mu$ g/mL de Cb (LB+Cb100).

## VII.2. Construcciones moleculares

Para evaluar la actividad transcripcional de las regiones a analizar, se generaron las fusiones transcripcionales respectivas utilizando el vector pLP170, el cual contiene el gen *lacZ* como reportero, el marcador de selección que confiere resistencia a carbenicilina y un sitio múltiple de clonación que contiene los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (Linn y St. Pierre, 1990) (Anexo 2). Este vector fue donado amablemente por la Dra. Soberón (IIBB, UNAM) y se clonó en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las células transformantes fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en medio LB+Cb100.

### *Purificación de plásmidos*

Todos los plásmidos, con o sin la fusión, se purificaron a partir de las células de *E. coli* (DH5 $\alpha$  ó XL-Gold) o de las células transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 utilizando el kit de purificación de plásmidos *StrataPrep Plasmid Miniprep Kit* (Agilent), siguiendo el protocolo que a continuación se describe.

1. Inocular 3 ml de LB+Cb100 o LB+Cb200 dependiendo de si se parte de células transformantes de *E. coli* o de *P. aeruginosa*, respectivamente, con una colonia.
2. Incubar por 16 h a 37 °C con agitación.
3. Colectar las células por centrifugación en un microtubo a 10,000 g por 1 min. Después de centrifugar, descartar el sobrenadante.
4. Agregar 100  $\mu$ L de Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNasa A 50  $\mu$ g/ml, pH 7.5. Agitar vigorosamente o mezclar con la pipeta hasta resuspender completamente el botón celular.
5. Adicionar 100  $\mu$ L de solución de NaOH 0.2 M con SDS al 1.0 %. Mezclar cuidadosamente el contenido mediante inversión del tubo de forma repetida.
6. Añadir 125  $\mu$ L de la solución 3 (composición no indicada por el proveedor, generalmente se usa acetato de sodio 3 M, pH 5.0) al tubo. Mezclar el contenido mediante inversión del tubo de forma repetida y suave.

7. Centrifugar a 10,000 g por 5 min.
8. Recuperar cuidadosamente el sobrenadante por decantación para no remover el precipitado y transferirlo a la columna (*microspin cup*) acoplada en la tapa de un tubo para microcentrífuga de 2 ml.
9. Centrifugar a 10,000 g por 30 s.
10. Sacar la columna del tubo y descartar el eluato. Volver a colocar la columna en el tubo de 2 mL.
11. Eliminar las endonucleasas de la muestra de acuerdo al siguiente protocolo:
  - a. Agregar 750  $\mu$ L de amortiguador eliminador de nucleasas a la columna. Tapar la columna con la tapa del tubo de 2 mL.
  - b. Centrifugar la muestra en una microcentrífuga a 10,000 g por 30 s.
  - c. Sacar la columna y descartar la fase líquida. Colocar de nuevo la columna en el tubo de 2 mL y tapparla con la tapa del tubo.
  - d. Centrifugar la muestra a 10,000 g por otros 30 s.
  - e. Sacar la columna y descartar la fase líquida.
  - f. Colocar de nuevo la columna en el tubo de 2 mL.
12. Agregar 750  $\mu$ L de Tris HCl 5 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1.25 mM, Etanol 50 % (v/v), pH 7.5 a la columna. Tapar la columna con la tapa del tubo de 2 mL.
13. Centrifugar a 13,000 rpm por 30 s.
14. Sacar la columna y descartar la fase líquida. Colocar de nuevo la columna en el tubo de 2 mL y tapparlo.
15. Centrifugar la muestra por 30 s a 10,000 g y asegurarse que toda la solución de lavado se ha eliminado de la columna.
16. Transferir la columna a un tubo para microcentrífuga nuevo.
17. Cargar 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril para eluir el DNA plasmídico.
18. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 5 min.
19. Tapar la columna y centrifugar a 10,000 g por 30 s.
20. Descartar la columna.
  - i. El DNA plasmídico purificado se encuentra en el fondo del tubo de 1.5 mL y puede almacenarse a -20°C.

### *Generación de las fusiones transcripcionales*

En la sección de Antecedentes experimentales se mencionó que previo a este trabajo se generaron en el laboratorio las fusiones transcripcionales *pbetIBA-ABC:lacZ*, *pbetT1-CAB:lacZ*, *pbetT1-CDAB:lacZ*, *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* (Figura 5). La construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ* se generó en este trabajo.

Para la clonación del fragmento *pbetIBA-ABCD* (Figura 5), éste se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la fusión transcripcional *pbetT1-CDAB:lacZ* como molde y los oligonucleótidos en sentido 5'CCGGAATTCTGCTCCTCGCCGGCTTGGGGTGC3' y en antisentido 5'CGCGGATCCTTGCTCGGCGCTGGCGGTGCC3' con el sitio de restricción *EcoRI* y con el sitio *BamHI*, respectivamente.

Se utilizó la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq pol; Fermentas) con la solución amortiguadora correspondiente.

El programa de amplificación fue el siguiente:

- a) Desnaturalización inicial. 1 ciclo a 94 °C por 5 min
- b) Reacción en cadena. 30 ciclos  
Desnaturalización: 94 °C por 30 s  
Alineamiento: 65 °C por 30 s  
Extensión: 72 °C por 60 s
- c) Extensión final. 1 ciclo a 72 °C por 5 min

### *Análisis del DNA por electroforesis en gel de agarosa*

Los análisis de DNA por electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1.0 % (m/v) en amortiguador TAE (Tris 0.04 M, ácido acético 0.02 M, EDTA 0.1 mM, pH 8.0) y con bromuro de etidio para teñir el DNA.

Para analizar los productos de amplificación por PCR del fragmento *pbetIBA-ABCD*, se cargó el volumen total de la reacción.

Este mismo procedimiento se utilizó en los demás análisis por electroforesis que se mencionan más adelante.

### *Purificación del producto de la amplificación del fragmento pbetIBA-ABCD*

Una vez finalizada la electroforesis, se cortaron las bandas del gel de agarosa correspondientes al producto de amplificación y se procedió a su purificación siguiendo el protocolo del kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) el cual consiste en lo siguiente:

1. Captura de muestra
  - a. Pesar un tubo de 1.5 mL y registrar el peso.
  - b. Con ayuda de un bisturí limpio, un transiluminador de luz UV y con el mínimo tiempo de exposición posible, cortar la banda de la muestra de interés. Colocar la banda del gel de agarosa dentro del tubo ya mencionado.
  - c. Pesar nuevamente el tubo eppendorf más la banda y calcular el peso de la banda.
  - d. Adicionar 10 µL de “Amortiguador de captura tipo 3” por cada 10 mg de la banda de agarosa.
  - e. Mezclar por inversión e incubar a 60 °C por 15 – 30 min mezclando por inversión cada 3 min, hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
  - f. Una vez que la agarosa esté completamente disuelta se debe verificar que el color del amortiguador de captura haya conservado su color amarillo o naranja pálido.
  - g. Utilizar un tubo colector de 2 mL y una columna GFX por cada purificación a realizar. Colocar la columna dentro del tubo colector.

2. Fijación de la muestra
  - a. Centrifugar la mezcla muestra-amortiguador de captura tipo 3 para asegurar que se tiene toda la fase líquida en el fondo del tubo.
  - b. Transferir no más de 800  $\mu$ L de la mezcla muestra-amortiguador de captura tipo 3 a la columna mencionada en el paso 1.g.
  - c. Incubar a temperatura ambiente por 1 min
  - d. Centrifugar la columna-tubo colector a 16,000 x g por 30 s
  - e. Descartar la fracción líquida que no se capturó
3. Lavado y secado
  - a. Adicionar 500  $\mu$ L de amortiguador de lavado tipo 1 a la columna-tubo colector.
  - b. Centrifugar la columna-tubo colector a 16,000 x g por 30 s.  
Nota: Si la muestra va a ser usada para una reacción de ligado, repetir el lavado una vez más.
  - c. Descartar el tubo colector (de 2 mL) y transferir la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL, fresco y libre de DNAsas.
4. Elución
  - a. Adicionar 10-50  $\mu$ L de amortiguador tipo 4 o tipo 6 al centro de la membrana de la columna-tubo eppendorf-muestra.
  - b. Incubar a temperatura ambiente por un minuto.
  - c. Centrifugar a 16,000 x g por 1 minuto para recuperar el DNA.
  - d. Descartar la columna y almacenar el DNA a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### *Clonación del fragmento *pbetIBA-ABCD* en el plásmido *pLP170**

Para la clonación del fragmento *pbetIBA-ABCD* en el vector *pLP170* y generar la construcción/fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ*, el producto de la amplificación por PCR fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y el vector fue linealizado con las mismas enzimas. La digestión se hizo incubando por 12 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A pesar de que ambas enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* (New England Biolabs) son compatibles con las condiciones de reacción a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con el amortiguador de

reacción, se verificó por electroforesis la actividad de cada enzima mediante reacciones de digestión independientes con el vector *pLP170*, viendo que en dichas reacciones se observara una banda que corresponde al plásmido linealizado (resultados no mostrados) lo que aseguró que tanto el fragmento como el vector fueran correctamente digeridos por ambas enzimas al realizar la digestión simultánea.

#### *Purificación del vector pLP170 y del fragmento pbetIBA-ABCD digeridos*

Se purificó el vector pLP170 linealizado a partir de la mezcla de reacción de digestión utilizando fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI por sus siglas en inglés) en proporción 25:24:1 así como el fragmento *pbetIBA-ABCD* de manera independiente de acuerdo al siguiente procedimiento.

1. Llevar a 200  $\mu$ L la mezcla de reacción de la digestión utilizando H<sub>2</sub>O desionizada estéril.
2. Agregar 200  $\mu$ L de PCI y agitar vigorosamente por 30 s.
3. Centrifugar la emulsión a 10,000 g durante 5 min.
4. Colectar la fase acuosa y transferirla a un tubo limpio. Llevarlo a un volumen de 200  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O desionizada estéril
5. Agregar 1/3 de volumen (*i.e.* 66  $\mu$ L) de acetato de amonio 10 M, homogenizar y agregar dos volúmenes (*i.e.* 400  $\mu$ L) de etanol absoluto a -20 °C y mezclar por inversión.
6. Incubar la solución 12-16 h a -20 °C.
7. Centrifugar a 10,000 g por 30 min a 4 °C.
8. Decantar cuidadosamente para no perder el botón de DNA.
9. Lavar el botón agregando 1 mL de etanol al 70 % (v/v) y centrifugar a 10,000 g por 5 min. Decantar cuidadosamente para no perder el botón de DNA.
10. Para secar el DNA, centrifugar la muestra en el equipo SpeedVac hasta desecación.
11. Resuspender el DNA en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril.

12. El DNA digerido y purificado se analiza por electroforesis en gel de agarosa con la finalidad de estimar las cantidades del vector linealizado y del fragmento a ligar.

#### *Ligado del fragmento *pbetIBA-ABCD* con el vector *pLP170**

Para la reacción de ligado se utilizó la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) en una mezcla de reacción con 1  $\mu$ L de enzima, 2  $\mu$ L del amortiguador recomendado por el proveedor, 1  $\mu$ L del fragmento *pbetIBA-ABCD* digerido, 1  $\mu$ L de DNA del vector *pLP170* linealizado y 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril. Se incubó la reacción por 18 h a 20 °C. La construcción resultante fue *pbetIBA-ABCD:lacZ* (Figura 5).

### **VII.3. Transformación y selección de las células transformantes**

Para clonar la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ* en *P. aeruginosa*, primero se obtuvieron múltiples copias de dicha fusión transcripcional subclonándola en células de *E. coli* XL10-Gold.

#### *Generación de células competentes*

Para la transformación de *E. coli* XL10-Gold, se utilizaron células competentes, que fueron obtenidas de la siguiente manera:

1. Crecer un cultivo de células de *E. coli* XL10-Gold por 12 h a 37 °C en medio LB.
2. Inocular 5 mL del precultivo en 50 mL de medio LB fresco, incubar a 37 °C hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0.6$ .
3. Centrifugar a 10,000 g durante 1 min a 4 °C, decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril e incubar por 15 min a 4 °C. Repetir los pasos 3 y 4 dos veces más.
5. Resuspender el botón celular en 5 mL de una solución estéril que contenga CaCl<sub>2</sub> 50 mM y glicerol al 20 % (v/v).

6. Hacer alícuotas de 45  $\mu\text{L}$  y conservar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Por otro lado, las células competentes de *P. aeruginosa* PAO1 se obtuvieron siguiendo el este protocolo:

1. Crecer un cultivo de células de *P. aeruginosa* PAO1 por 12 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio LB.
2. Resembrar 10 mL del precultivo en 50 mL de medio LB fresco e incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una  $\text{D.O.}_{600} = 0.6$ .
3. Centrifugar a 10,000 g durante 1 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 15 mL de  $\text{MgCl}_2$  100 mM estéril a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Centrifugar a 10,000 g durante 1 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , decantar el sobrenadante.
6. Resuspender el botón celular en 3 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM estéril a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
7. Adicionar 27 mL más de  $\text{CaCl}_2$  100 mM estéril e incubar en hielo por 20 min.
8. Centrifugar a 10,000 g por 1 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , decantar el sobrenadante.
9. Resuspender el botón celular en 1.5 mL de de una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  85 mM más glicerol al 15 %.
10. Hacer alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  y almacenar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### *Transformación de células competentes de E. coli y de P. aeruginosa PAO1.*

El método para transformar células competentes de *E. coli* XL10-Gold y de *P. aeruginosa* PAO1 fue el de choque térmico, el cual se describe a continuación.

1. Tomar una alícuota de células competentes de *E. coli* XL10-Gold y descongelar lentamente en hielo.
2. Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de DNA plasmídico de la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ*, homogenizar suavemente e incubar en hielo por 30 min.
3. Realizar el choque térmico a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 s e inmediatamente se incubar en hielo por 5 min.
4. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de medio LB e incubar por 1 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación.
5. Centrifugar a 10,000 g por 15 s, decantar el sobrenadante y con el remanente resuspender el botón celular.
6. Resembrar las células por extensión en agar LB+Cb100 e incubar por 16 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

7. Seleccionar colonias aisladas y resembrar las colonias de *E. coli* XL10-Gold en agar LB+Cb100 y en medio LB+Cb100; o en su caso resembrar las colonias de *P. aeruginosa* PAO1 en agar LB+Cb200 y en medio LB+Cb200.
8. Realizar una PCR de las colonias de *E. coli* XL10-Gold con los oligonucleótidos para amplificar el fragmento *pbetIBA-ABCD*.
9. Realizar un análisis por electroforesis de la amplificación e identificar la banda más intensa como indicativo de la colonia con mayor número de copias de la fusión transcripcional.
10. Purificar el plásmido de la colonia seleccionada utilizando el protocolo del kit comercial Miniprep antes descrito.
11. Con el plásmido purificado, transformar células competentes de *P. aeruginosa* PAO1 como se menciona en los pasos 1 a 6 de este protocolo.
12. Realizar la selección de colonia como se menciona en el paso 6.
13. Purificar plásmido siguiendo el protocolo antes mencionado.
14. Realizar una PCR con los oligonucleótidos para clonar la región *pbetIBA-ABCD*.
15. Realizar el análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (m/v) de los productos de amplificación y seleccionar la colonia cuya banda sea la más intensa.
16. Resembrar la colonia seleccionada en medio LB+Cb200 y preservar las células en medio LB+Cb200 + Glicerol 50 % a -80 °C.

#### **VII.4. Condiciones de crecimiento para estimular la transcripción**

Se creció un precultivo de células de *P. aeruginosa* PAO1 transformante con alguna de las construcciones a evaluar en medio de cultivo líquido LB+Cb200 por 12 h a 37 °C. Posteriormente, se inoculó 150 mL de medio LB+Cb200 fresco y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6. Se tomaron alícuotas de 25 mL y se centrifugaron a 10,000 g por 5 min; el sobrenadante fue desechado y se lavaron los botones celulares con 25 mL de medio mínimo de sales sin fuentes de carbono ni de nitrógeno. Se volvieron a centrifugar las alícuotas y posteriormente se resuspendieron los botones celulares en 25 mL de cada

uno de los siguientes medios de cultivo: M9, M9S, M9C, M9+C y M9S+C, todos adicionados con carbenicilina a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cada cultivo se incubó a 37 °C con agitación durante el tiempo del ensayo.

Se tomaron alícuotas de 1 mL en los tiempos indicados para cada experimento. Estas alícuotas se centrifugaron a 10,000 g por 60 s, se decantaron los sobrenadantes y se lavaron los botones celulares con 1 mL de solución salina fisiológica estéril (SSFE; NaCl 0.9 % m/v) a 4 °C; se centrifugaron de nuevo las alícuotas y se realizó un segundo lavado. Posteriormente, se les retiró el mayor volumen posible de la solución a los botones celulares y se almacenaron a -20 °C hasta su uso, sin exceder un tiempo de 2 días.

### **VII.5. Determinación de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa**

Para medir la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, se utilizó la metodología descrita previamente por Miller (1972), la cual consiste en la detección a 420 nm de la producción de *o*-nitrofenol (ONP) a partir de la hidrólisis de *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) por acción de la  $\beta$ -galactosidasa, que al final se expresa como Unidades Miller (U.M.), siguiendo los pasos que a continuación se describen.

1. Los botones celulares almacenados por no más de 2 días a -20 °C se resuspendieron en 1 mL de amortiguador Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM, pH 6.0 y 2-mercaptoetanol 50 mM adicionado al momento de realizar el ensayo)
2. Se determinó la  $\text{DO}_{600}$  de cada suspensión celular.
3. Se diluyó cada suspensión celular por triplicado tomando 25  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensión en 975  $\mu\text{L}$ , 950  $\mu\text{L}$  y 900  $\mu\text{L}$  de amortiguador Z respectivamente.
4. Para permeabilizar las células se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de cloroformo y 10  $\mu\text{l}$  de SDS al 0.1 % (m/v) a cada dilución y se agitaron en vórtex por 5 s.
5. Se incubaron las diluciones a temperatura ambiente por 10 min y después se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de ONPG a una concentración de 4 mg/mL.
6. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente hasta observarse una coloración amarilla, registrando los tiempos de cada reacción, deteniéndola con 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M.

7. Se leyeron las absorbancias a 420 nm y a 550 nm con el equipo FLUOstar OMEGA de BMG Labtech y se colectaron los datos.

La ecuación para determinar la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa es la siguiente (Miller, 1972).

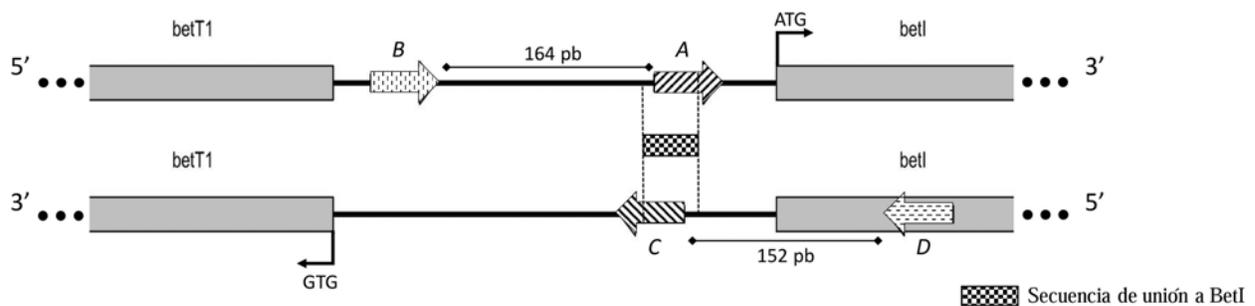
$$\text{U.M.} = 1000 \times \frac{[\text{DO}_{420} - (1.75 \times \text{DO}_{550})]}{(t \times v \times \text{DO}_{600})}$$

Donde  $t$  es el tiempo de reacción y  $v$  el volumen de la suspensión celular utilizado.

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1. Construcciones moleculares

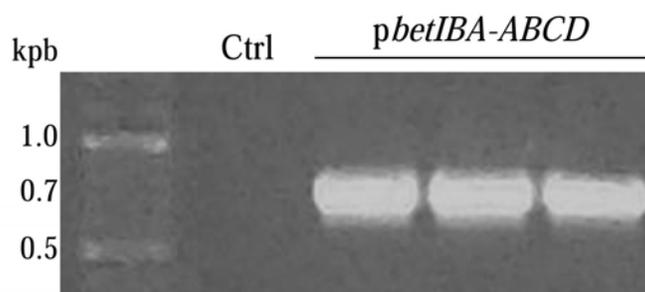
Basándonos en los resultados de los análisis *in silico* mencionados en los antecedentes experimentales, se construyó el modelo que se muestra en la Figura 7 para mostrar la simetría que tienen los promotores en su disposición a lo largo de la secuencia de 750 pb. Con este modelo se ilustra cómo es que participan cada uno de los promotores en la regulación transcripcional de *betIBA* y de *betT1*, lo que ayuda a interpretar los resultados de actividad transcripcional de las fusiones *pbetIBA-ABCD:lacZ*, *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-ABCD:lacZ* que serán mostrados a continuación.



**Figura 7.** Modelo de la disposición de las secuencias promotoras. Se muestran los promotores previamente descritos (A y C) los cuales contienen el sitio de unión a BetI. Además se muestran las secuencias con posible actividad promotora B y D, así como la distancia física entre cada caja (A-B; C-D).

### VIII.1.1. Fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ*

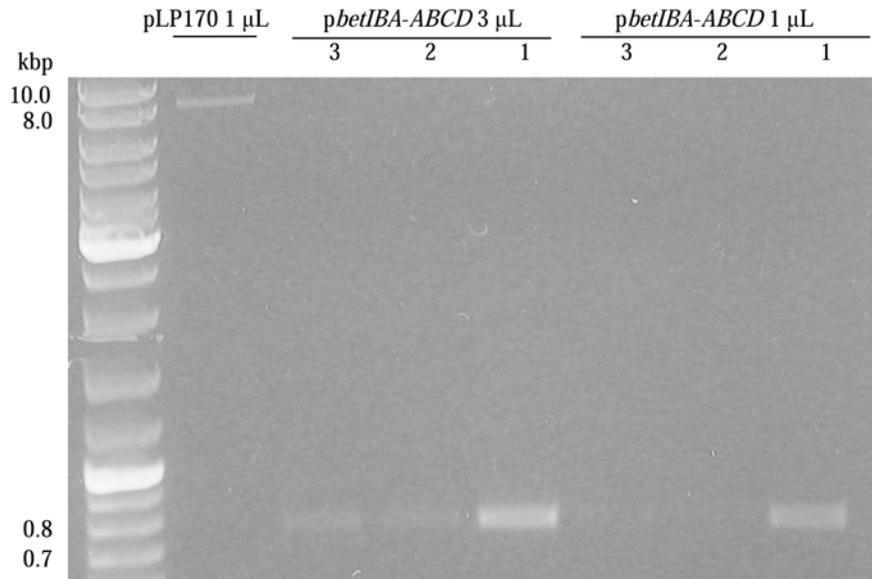
Para generar la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ*, primero se amplificó la región *pbetIBA-ABCD* (Figura 4) utilizando la fusión transcripcional *pbetT1-CDAB:lacZ* como molde y los oligonucleótidos correspondientes (descritos en la sección de Materiales y métodos). En el análisis por electroforesis del producto de amplificación se obtuvo una banda muy intensa del peso molecular esperado (*i.e.* 750 pb; Figura 8).



**Figura 8.** Amplificación de *pbetIBA-ABCD*. Análisis por electroforesis del producto de la amplificación por PCR en el que se utilizó como molde a la fusión *pbetT1-CDAB:lacZ* y los oligonucleótidos correspondientes. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1 % (m/v) y el DNA se tiñó con bromuro de etidio.

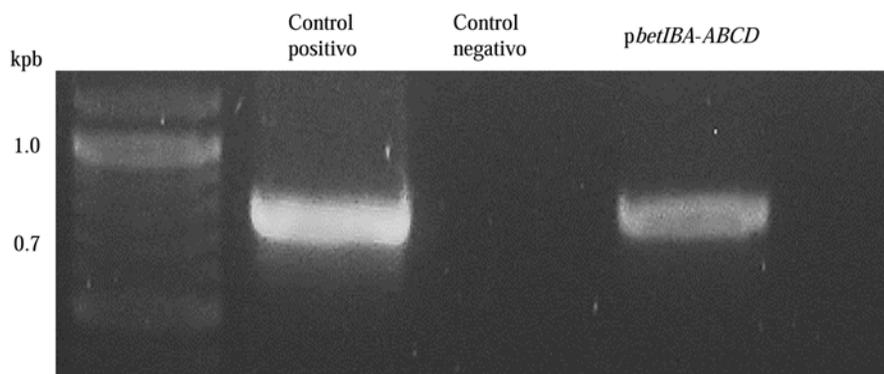
El fragmento *pbetIBA-ABCD* amplificado se purificó a partir del gel de agarosa mostrado en la Figura 8. Posteriormente, se realizó la doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Este mismo procedimiento se realizó con el plásmido pLP170 para linealizarlo.

El DNA del vector y del fragmento digeridos se purificaron por el método de PCI como se describe en Materiales y métodos. Posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 9) donde se observó que la banda correspondiente al vector pLP170 tiene características de un plásmido linealizado y se encuentra en el peso molecular esperado (Anexo 2). Es decir, una banda discreta, indicando que la digestión fue positiva, tanto para el plásmido como para el fragmento. También se estimó de forma cualitativa la cantidad de DNA del fragmento *pbetIBA-ABCD* en los distintos carriles por la intensidad de cada banda, la cual indica la proporción vector:fragmento que se debe utilizar para la reacción de ligado.



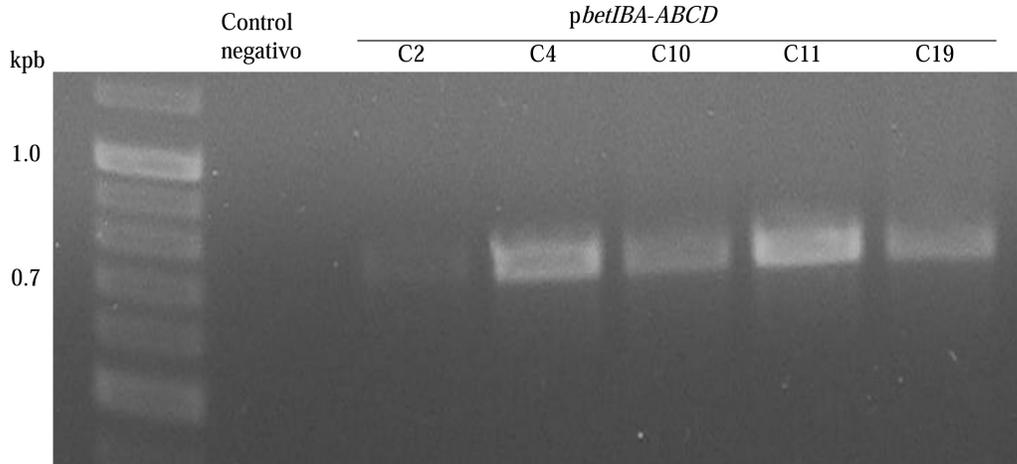
**Figura 9.** Digestión con *Bam*HI y *Eco*RI del fragmento *pbetIBA-ABCD* y del vector pLP170. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión. Se analizaron tres muestras diferentes (1, 2 y 3) del fragmento digerido y sólo una del vector linealizado. Se indica la cantidad de DNA purificado y digerido cargado en cada carril.

Se procedió a la reacción de ligado del fragmento *pbetIBA-ABCD* con vector pLP170 como se describe en la sección de Materiales y métodos, generando así la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ* (Figura 4). Esta fusión se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL10-Gold. La presencia del inserto se demostró al realizar una amplificación por PCR a partir de una colonia transformante, utilizando los oligonucleótidos correspondientes. En la Figura 10 se observa una de las bandas correspondientes a una de las colonias de *E. coli* XL10-Gold transformante, La banda migró a la altura de los 750 pb, tal y como se esperaba, y que a su vez es de igual tamaño que el del control positivo *pbetTI-CDAB:lacZ* usado como molde en la reacción de amplificación.



**Figura 10.** Amplificación de la región *pbetIBA-ABCD* a partir de células de *E. coli* transformantes. Control positivo: amplificación del fragmento *pbetT1-CDAB*. Control negativo: agua en lugar de DNA. *pbetIBA-ABCD*: resultado de la amplificación de una colonia resistente a carbenicilina.

Después de verificar que las células de *E. coli* XL10-Gold contenían la fusión *pbetIBA-ABCD:lacZ*, se procedió a la purificación del plásmido recombinante y se secuenció por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, lo que mostró que no ocurrieron mutaciones en la secuencia estudiada. Posteriormente se transformaron células competentes de *P. aeruginosa* PAO1. La selección de las células transformantes se realizó creciendo a las bacterias en medio LB+Cb200, y a partir de ellas se purificó el plásmido *pbetIBA-ABCD:lacZ*. Posteriormente, se hizo una amplificación por PCR utilizando el plásmido purificado como molde y los oligonucleótidos para el fragmento *pbetIBA-ABCD*. La amplificación se analizó por electroforesis y se observó que la banda resultante migró a la altura del peso molecular esperado para el fragmento correspondiente a *pbetIBA-ABCD* (Figura 11). Estos resultados indicaron que las colonias seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1 transformantes contienen la construcción deseada (*pbetIBA-ABCD:lacZ*), y además indicaron qué colonia seleccionar, que fue aquella cuya banda mostró una mayor intensidad, para realizar con ésta los experimentos consecutivos.



**Figura 11.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región *pbetIBA-ABCD* a partir de plásmido recombinante purificado de células de *P. aeruginosa*. La numeración indica el número de colonia seleccionada. Las colonias 4, 10 y 11 se resembraron en medio líquido LB+Cb200 y se almacenaron por criogenia en medio líquido LB más glicerol al 50 %. (v/v). La colonia 11 se utilizó para los ensayos de actividad transcripcional posteriores.

### VIII.1.2. Clonación de las construcciones *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* en células de *P. aeruginosa* PAO1

Las fusiones transcripcionales *pbetIBA-D:lacZ* y *pbetT1-D:lacZ* se subclonaron en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  en trabajos previos del laboratorio.

En este trabajo se purificaron dichas fusiones transcripcionales a partir de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se transformaron células competentes de *P. aeruginosa* PAO1 con cada fusión de manera independiente. Se realizó la selección de colonias en LB+Cb200 y, posteriormente, se hizo una amplificación por PCR con los plásmidos purificados como DNA molde y con sus respectivos oligonucleótidos, como se indica a continuación.

Para amplificar el fragmento *pbetIBA-D* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido en sentido: 5'CCGGAATTCCAAAATAGACTGGCCACCAATGACGTCG3' con el sitio de restricción *EcoRI*.

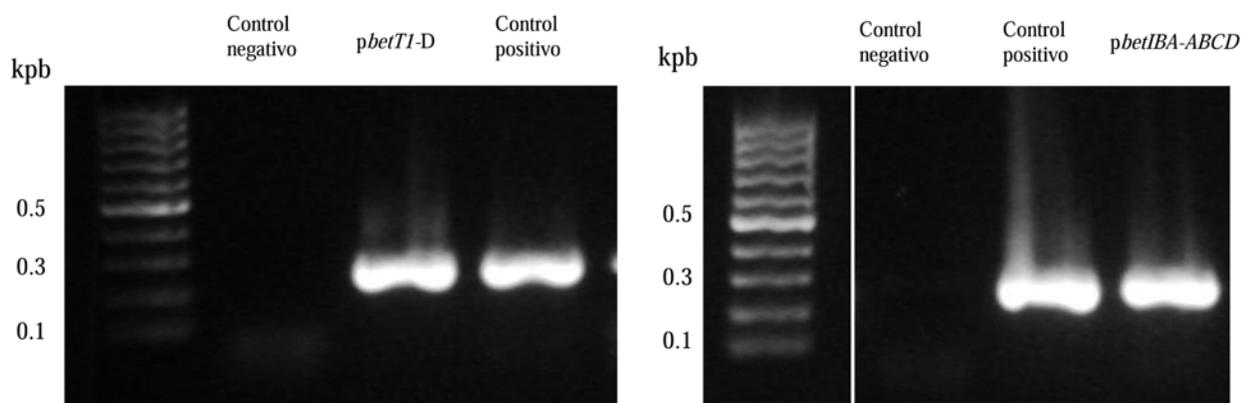
Oligonucleótido en contrasentido: 5'CGCGGATCCTTGCTCAAGGCGCTGAGCAGGTGCC 3' con el sitio de restricción *BamHI*.

Para amplificar el fragmento *pbetT1-D* se utilizó:

Oligonucleótido en sentido:  
5'CCGGAATTCTTGCTCAAGGCGCTGAGCAGGTGCC3' con el sitio de  
restricción *EcoRI*.

Oligonucleótido en contrasentido:  
5'CGCGGATCCCAAATAGACTGGCCACCAATGACGTCG3' con el sitio de  
restricción *BamHI*

Posteriormente, se efectuó el análisis por electroforesis de los productos de amplificación, observándose que las bandas presentaban un peso molecular aproximadamente igual al esperado (250 pb) (Figura 12). Con estos resultados se confirmó que los plásmidos purificados efectivamente contienen las fusiones transcripcionales correspondientes, *pbetIBA-D* y *pbetT1-D*.



**Figura 12.** Amplificación de las regiones *pbetT1-D* y *pbetIBA-D* a partir de plásmidos purificados de colonias de *P. aeruginosa* PAO1 transformantes con las respectivas fusiones transcripcionales. En el control positivo se utilizó DNA genómico de *P. aeruginosa* PAO1 como molde y en el negativo agua. El análisis de la reacción de PCR se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (m/v) tñiendo al DNA con bromuro de etidio.

## VIII.2. Actividad transcripcional de las fusiones *pbetIBA-D:lacZ*, *pbetT1-D:lacZ* y *pbetIBA-ABCD:lacZ* en *P. aeruginosa* PAO1

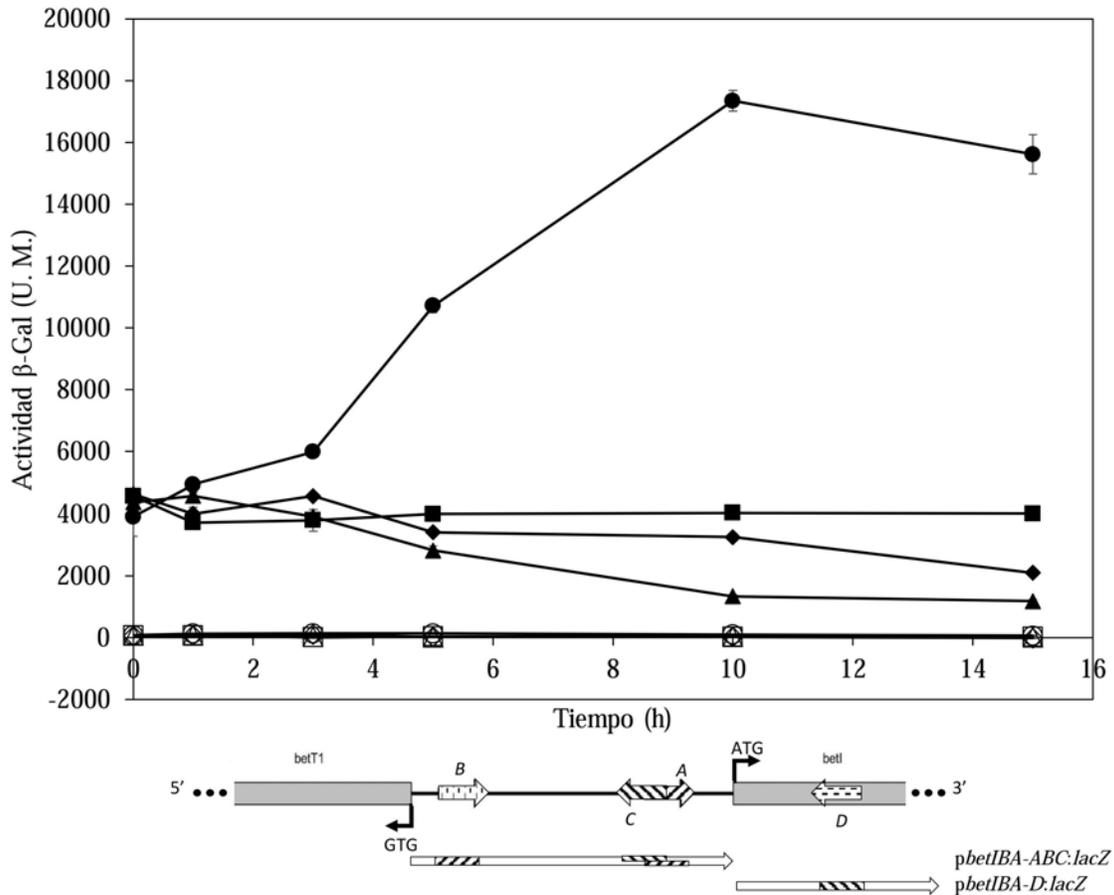
### VIII.2.1. Actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-D:lacZ* en *P. aeruginosa* PAO1

La actividad transcripcional se determinó midiendo la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de acuerdo a la metodología previamente descrita (Miller, 1972), tal y como se detalla en la sección de Materiales y métodos.

Como control positivo para el ensayo de actividad transcripcional, se consideró la fusión *pbetIBA-ABC:lacZ*, generada y evaluada previamente en el laboratorio por Juárez-Díaz (datos sin publicar).

En la Figura 13 se observa que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa obtenida a partir de la construcción *pbetIBA-D:lacZ* fue prácticamente nula bajo las diferentes condiciones nutrimentales probadas a lo largo de todo el experimento (15 h; Figura 13, símbolos vacíos); mientras que a partir de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ* se obtuvo la actividad esperada, es decir, un incremento de alrededor de 4 veces con respecto a la actividad basal observada en medio M9C y una disminución o ningún cambio de la actividad basal observada en medios con glucosa o succínico como fuente de carbono y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno (Figura 13, símbolos llenos).

Estos resultados indican que la región *pbetIBA-D* no posee los elementos en *cis* suficientes para dirigir la expresión del operón *betIBA*.

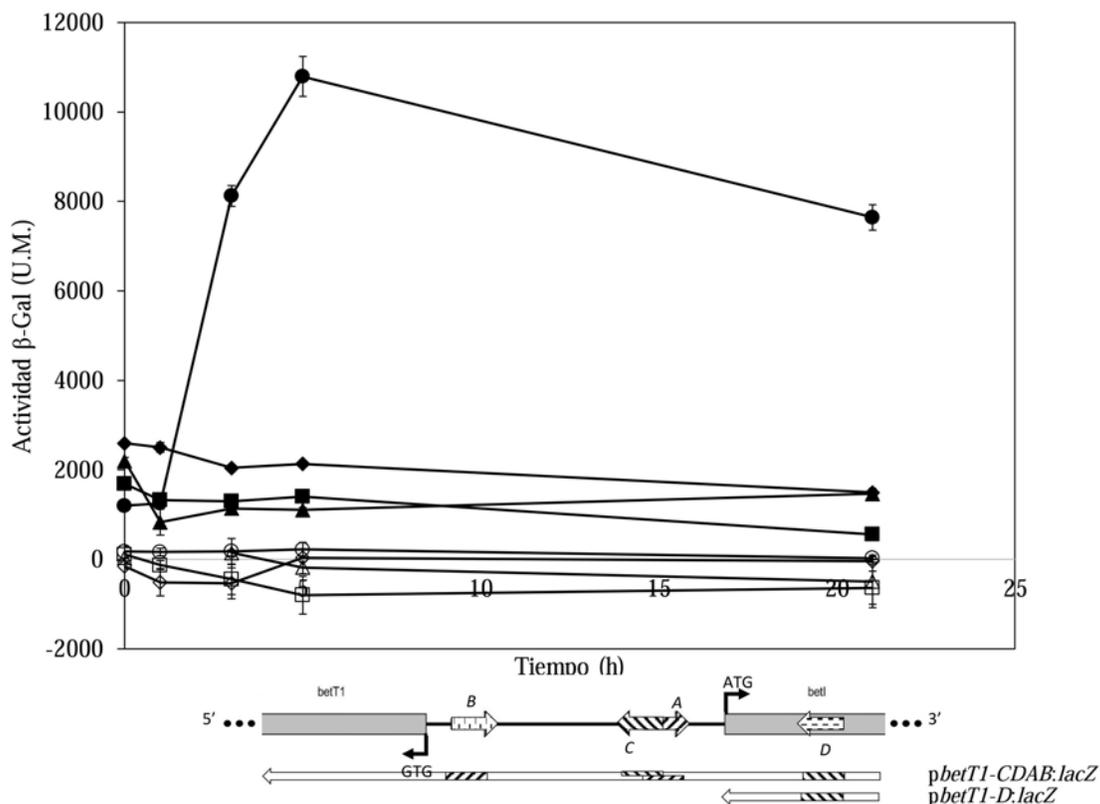


**Figura 13.** Actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-D:lacZ* en *P. aeruginosa* creciendo bajo distintas condiciones nutrimentales (símbolos vacíos). La actividad de LacZ [en unidades Miller (U.M.)] se determinó a los tiempos indicados después de que el cultivo crecido en LB hasta una  $DO_{600}$  se transfiriera a medio M9C (círculos), M9S (cuadros), M9 (triángulos) o LB fresco (rombos). Los símbolos llenos representan la actividad obtenida a partir de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ*. El esquema inferior indica las regiones correspondientes que se fusionaron al gen *lacZ* y su ubicación.

### VIII.2.2. Actividad transcripcional de la construcción *pbetT1-D:lacZ* en *P. aeruginosa*

La actividad transcripcional de la construcción *pbetT1-D:lacZ* fue, al igual que la de *pbetIBA-D:lacZ*, prácticamente nula (Figura 14, símbolos vacíos), mientras que la actividad del control positivo, que en este caso fue la fusión *pbetT1-CDAB:lacZ*, dio el perfil de activación esperado de acuerdo a los datos obtenidos previamente en el laboratorio (Juárez-Díaz, datos no publicados).

Estos resultados también indican que la secuencia *pbetT1-D* no contiene los elementos suficientes para dirigir y/o regular por sí sola la expresión del gen *betT1*, lo cual sugiere que para su expresión, se requiere de los cuatro promotores (A, B, C y D) o de al menos de C y D, contenidos en la región *pbetT1-CDAB*.



**Figura 14.** Actividad transcripcional de la fusión *pbetT1-D:lacZ* en *P. aeruginosa* creciendo bajo distintas condiciones nutrimentales (símbolos vacíos). La actividad de LacZ [en unidades Miller (U.M.)] se determinó a los tiempos indicados después de que el cultivo crecido en LB hasta una  $DO_{600}$  se transfiriera a medio M9C (círculos), M9S (cuadros), M9 (triángulos) o LB fresco (rombos). Los símbolos llenos representan la actividad obtenida a partir de la construcción *pbetT1-CDAB:lacZ*. El esquema inferior indica las secuencias correspondientes que se fusionaron al gen *lacZ* y a su ubicación.

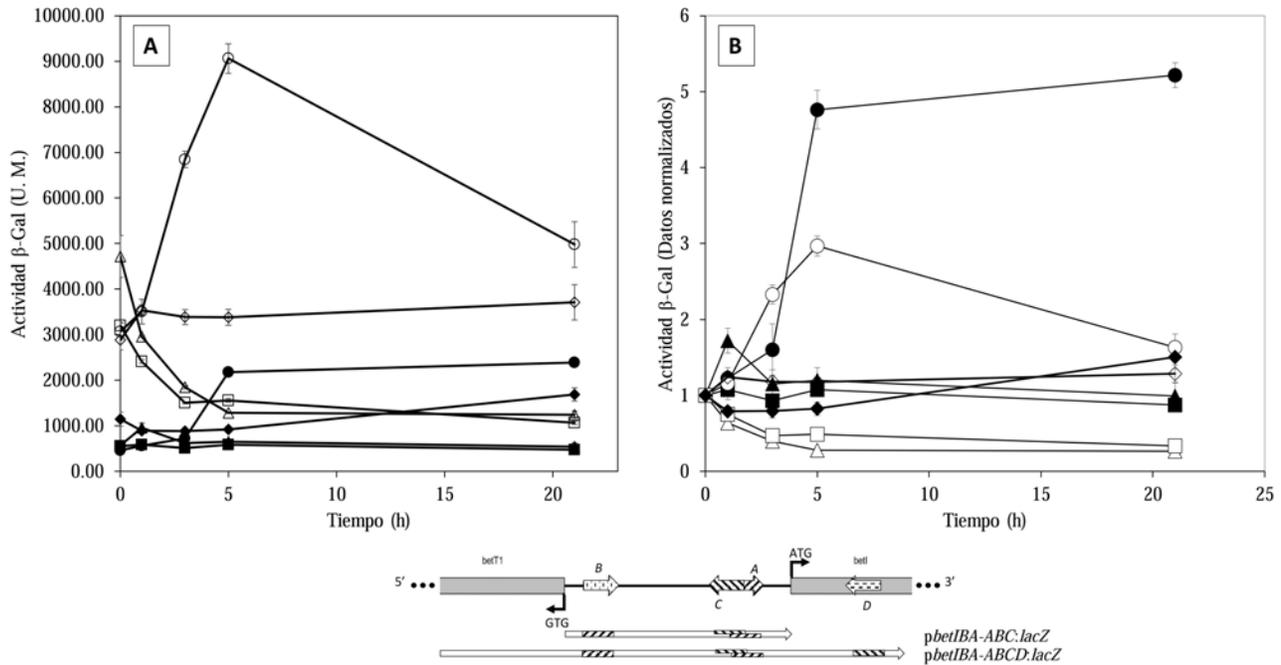
Los resultados de las Figuras 13 y 14 indican que la región promotora que se encontró sobre el gen *betI* en dirección hacia el gen *betT1*, denominado promotor D, no es capaz de activar la transcripción por sí sola hacia ningún sentido, pero sí es posible que actúe en conjunto con el promotor C, ubicado en la secuencia intergénica en sentido hacia el gen *betT1*, ya que ambos, C y D, logran una mayor activación de la transcripción en

presencia de colina como única fuente de carbono y de nitrógeno (Juárez-Díaz, sin publicar).

### **VIII.2.3. Actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ* en *P. aeruginosa***

En estudios previos a este trabajo, se observó que la secuencia *pbetIBA-ABC* sí es capaz de dirigir y de regular la transcripción del operón *betIBA*, respondiendo de manera positiva a colina y de manera negativa a glucosa o succinato más  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sin embargo, también se observó que esta misma secuencia pero en dirección hacia el gen *betT1* (*pbetT1-CAB*), no responde con la misma intensidad, lo que llevó a analizar una secuencia más amplia, *pbetT1-CDAB*, la cual presentó una activación significativamente mayor con colina que la región *pbetT1-CAB* y que la misma *pbetIBA-ABC*. Debido a estos resultados surgió la interrogante de cómo respondería la secuencia *pbetT1-CDAB* pero en sentido opuesto, es decir, hacia el operón *betIBA*, secuencia que denominamos *pbetIBA-ABCD*.

Por tal motivo se decidió generar la fusión transcripcional *pbetIBA-ABCD:lacZ* y se determinó su actividad transcripcional bajo distintas condiciones nutrimentales, utilizando la actividad de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ* como control. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ* bajo distintas condiciones nutrimentales. A. Actividad transcripcional absoluta [en unidades Miller (U.M.)]. B. Actividad transcripcional relativa (datos normalizados con respecto a la inicial). Círculos: medio M9C; cuadrados: medio M9S; triángulos: medio M9; rombos: medio LB. Símbolos vacíos: *pbetIBA-ABC:lacZ*; símbolos llenos: *pbetIBA-ABCD:lacZ*.

De manera interesante, las construcciones, *pbetIBA-ABC:lacZ* y *pbetIBA-ABCD:lacZ* mostraron un perfil de actividad transcripcional muy diferente (Figura 15). Con la construcción *betIBA-ABC* se obtuvo una mayor actividad absoluta en todas las condiciones nutrimentales probadas que con la construcción *pbetIBA-ABCD* (Figura 15A), por lo que se decidió normalizar todos los puntos a la actividad inicial correspondiente (Figura 15B).

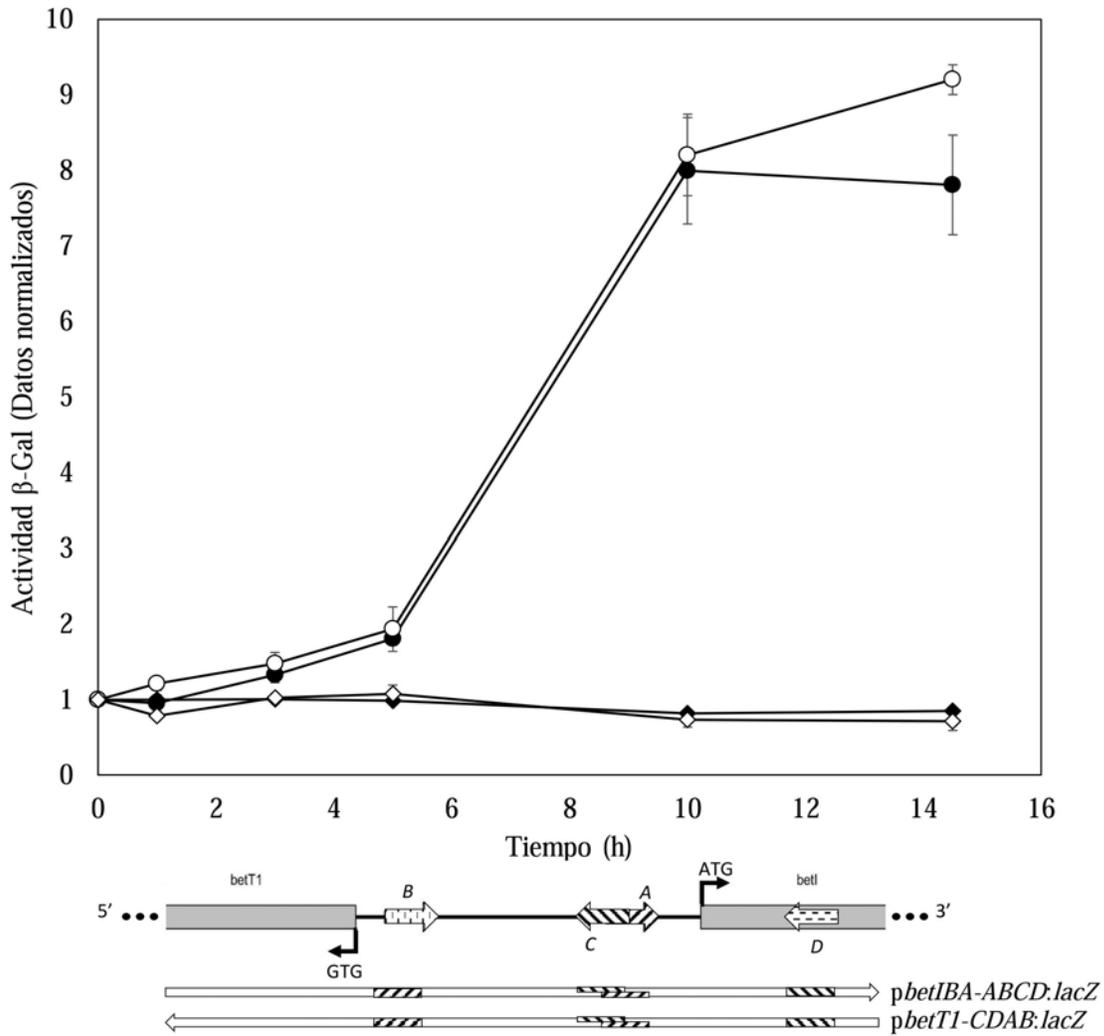
Se observó que el aumento de la actividad transcripcional en medio M9C obtenido con la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ* es casi el doble que el obtenido con la construcción de *pbetIBA-ABC:lacZ*, indicando que en realidad la actividad de la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ* contiene los elementos necesarios para la expresión y la regulación del operón *betIBA*.

Los datos normalizados también mostraron de una manera más clara cómo es que ocurre el aumento en la actividad transcripcional a lo largo del tiempo. La secuencia

*pbetIBA-ABCD* no sólo contiene los elementos en *cis* para la expresión del operón *betIBA* su activación, sino a aquellos necesarios para mantener una actividad basal relativamente baja (observada en medio LB). Esto sugiere que para la expresión y la regulación del operón *betIBA* no sólo se requieren las cajas *A* y *B* sino que también, las cajas *C* y *D* tienen un papel muy importante en estas funciones.

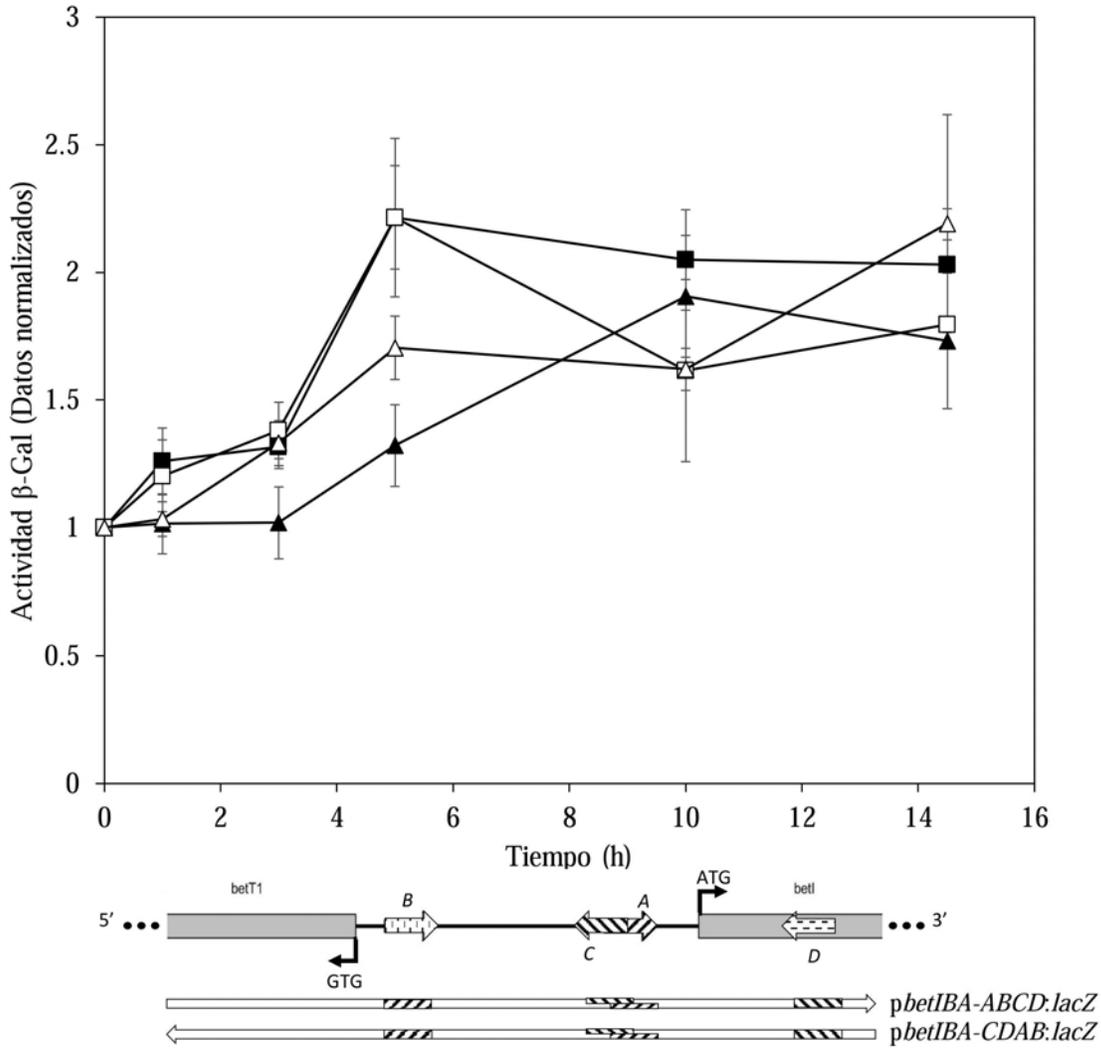
En la Figura 15 también se observa que cuando las células transformantes se crecen en medio con succinato y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , la actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ* disminuye respecto a la actividad inicial, contrario a lo que se observó con la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ*, con lo que la actividad transcripcional presentó un aumento en la primera hora (Figura 16B, cuadrados vacíos y llenos, respectivamente). De manera similar, la actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ* disminuyó respecto a la inicial cuando las células crecieron en medio con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pero la actividad transcripcional de la fusión *pbetIBA-ABCD:lacZ* se mantuvo constante (Figura 15B, triángulos vacíos y llenos, respectivamente).

Por otra parte, al comparar los resultados de la actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABCD* con la de la construcción *pbetTI-CDAB*, se observa que ambas construcciones se comportan de manera muy similar cuando las células se crecen en un medio con colina como única fuente de carbono y nitrógeno, tanto si se considera la actividad absoluta como actividad relativa (Figura 16).



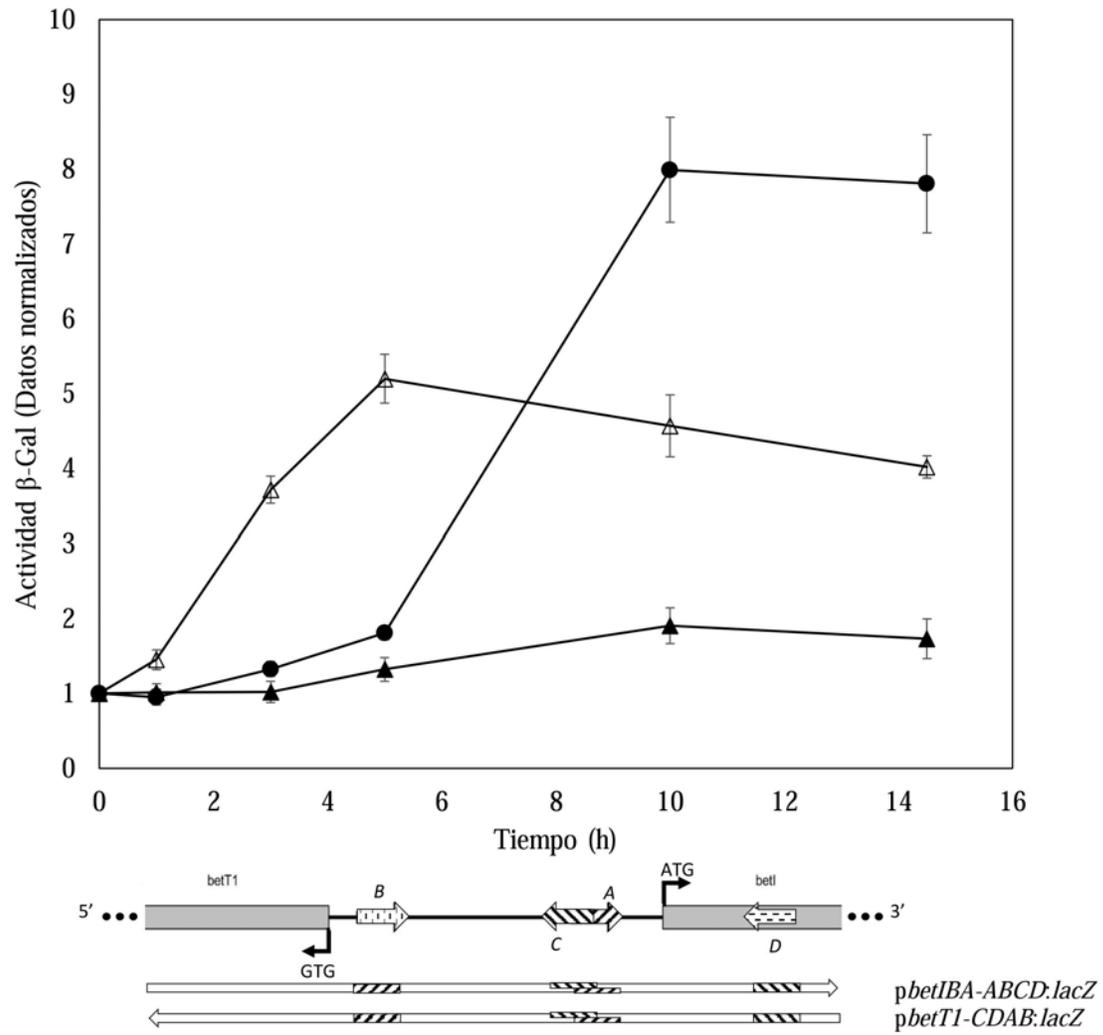
**Figura 16.** Actividad transcripcional de las construcciones *pbetIBA-ABCD:lacZ* (símbolos llenos) y *pbetT1-CDAB:lacZ* (símbolos vacíos). Actividad transcripcional relativa (datos normalizados con respecto a la inicial correspondiente). Círculos: medio M9C; rombos: medio LB.

Así mismo, la actividad transcripcional de las construcciones *pbetIBA-ABCD* y *pbetT1-CDAB* en células creciendo con succinato y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (medio M9S) o con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (medio M9) aumentó en ambos casos alrededor de dos veces tras 15 h de cultivo (Figura 17).

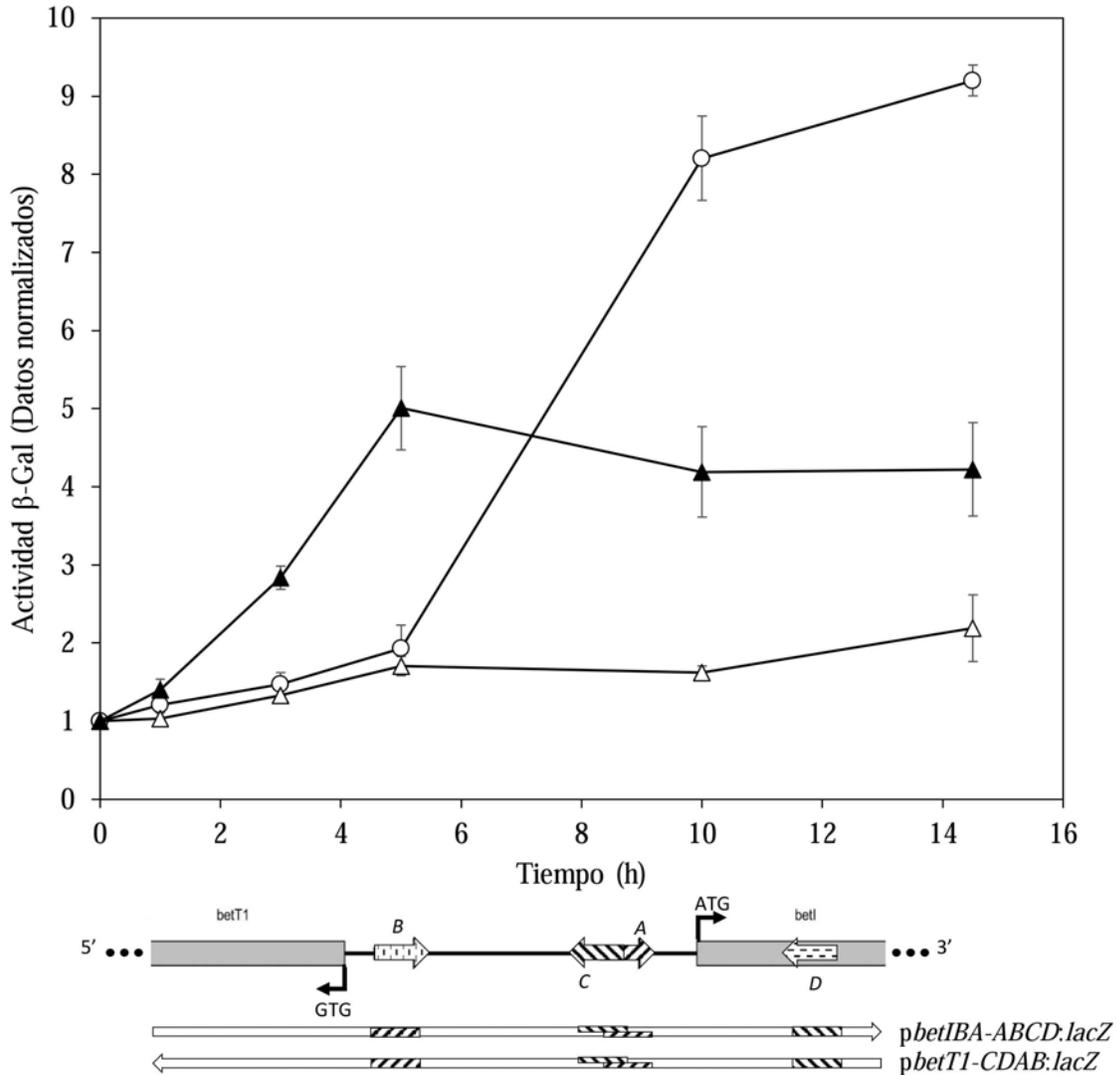


**Figura 17.** Actividad transcripcional relativa (datos normalizados con respecto a la inicial correspondiente) de las construcciones *pbetIBA-ABCD:lacZ* (símbolos llenos) y *pbetTI-CDAB:lacZ* (símbolos vacíos). Los cuadrados indican la actividad determinada en células crecidas en el medio M9S y los triángulos en el medio M9.

Para poder entender mejor los datos mostrados en las Figuras 16 y 17, se procedió a determinar la actividad transcripcional de las regiones *pbetIBA-ABCD* y *pbetTI-CDAB* en células crecidas en medios mixtos, es decir, colina más glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (M9+C) y en medio con colina más succinato y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (M9S+C). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 18 y 19. Se encontró que en células creciendo en medio M9+C (Figuras 16 y 17) el aumento máximo de actividad alcanzado, respecto a la inicial fue de aproximadamente 50 % del aumento alcanzado con el estímulo en M9C para ambas regiones, *pbetIBA-ABCD* (Figura 16) y *pbetTI-CDAB* (Figura 17).



**Figura 18.** Actividad transcripcional relativa (datos normalizados) de la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ*. Círculos: medio M9C como control positivo; triángulos rellenos: medio M9 como control sin colina; triángulos vacíos: medio M9+C.

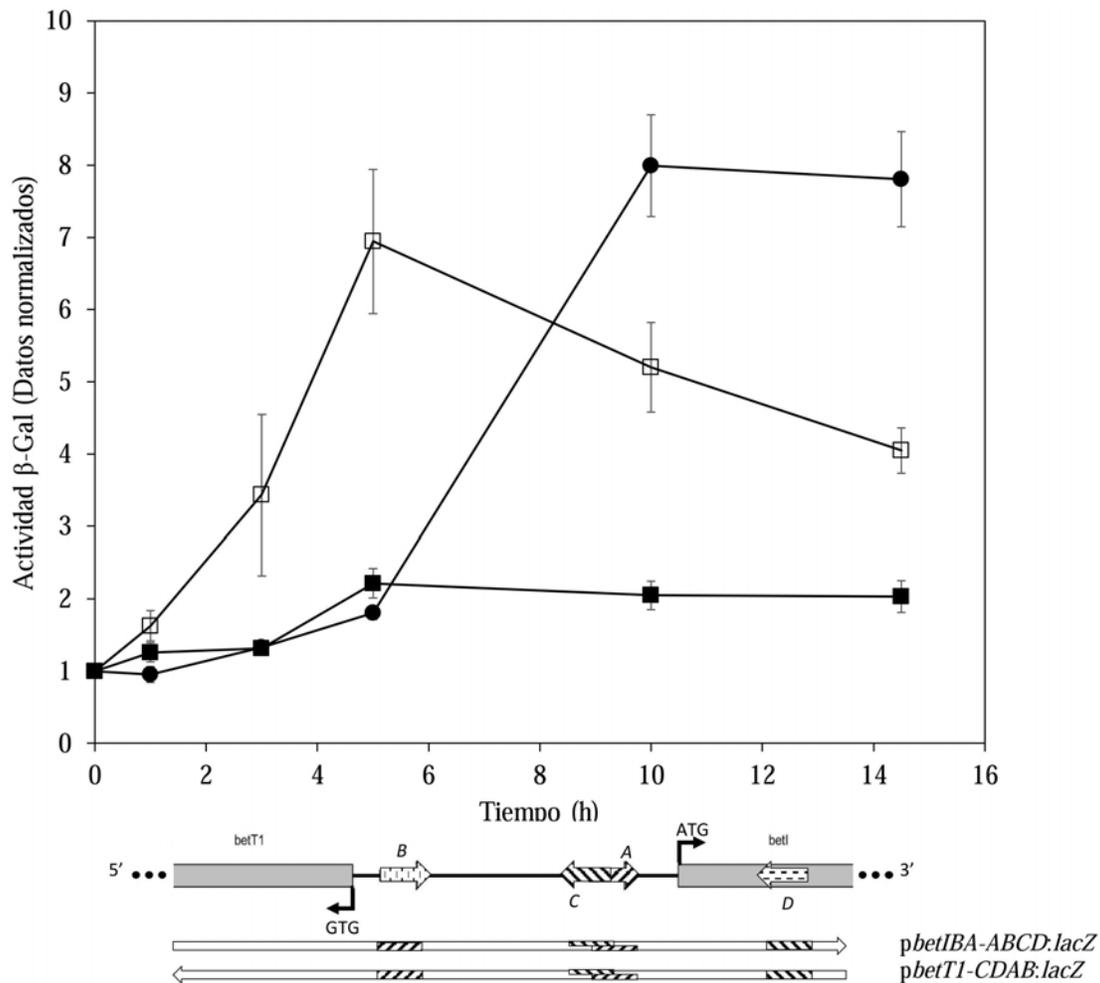


**Figura 19.** Actividad transcripcional (datos normalizados a  $t=0$ ) de la construcción *pbetT1-CDAB:lacZ*. Círculos: medio M9C; triángulos vacíos: medio M9 como control sin colina; triángulos rellenos: medio M9+C.

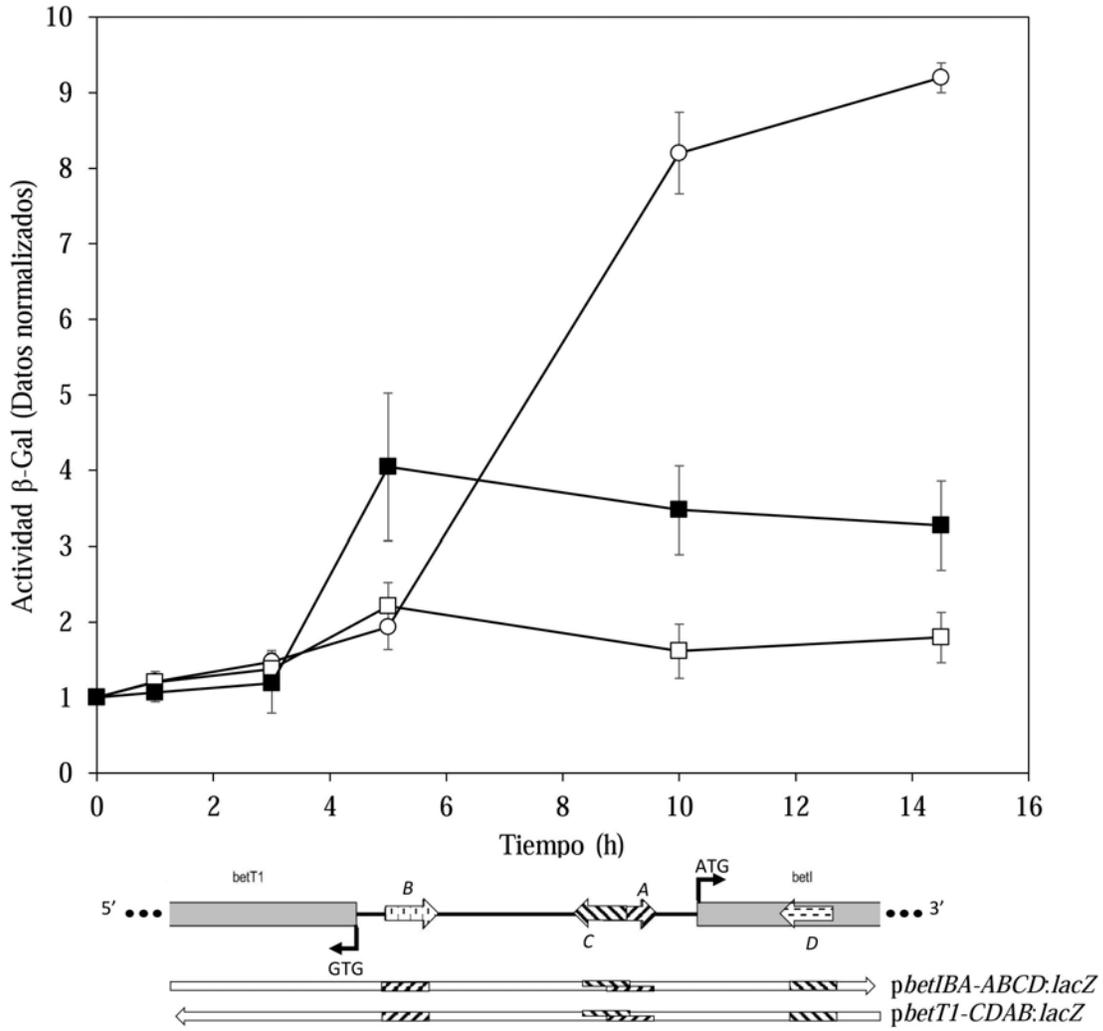
La actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABCD* (Figura 20) en medio M9S+C aumentó de manera similar a la que se observó en medio M9C, pero disminuyó a lo largo del tiempo hasta llegar a casi el 50 % de la actividad en medio M9C. Este fenómeno se asemeja a lo previamente observado por Juárez-Díaz con la actividad de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ* (Figura 6A).

Cuando se determinó la actividad transcripcional en células crecidas en medio M9S+C de la secuencia *pbetT1-CDAB*, se encontró que la actividad máxima alcanzada fue

de un poco mayor al 50 % de la actividad máxima alcanzada en el medio M9C, y ésta se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo (Figura 21).



**Figura 20.** Actividad transcripcional relativa (datos normalizados) de la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ*. Círculos: medio M9C; cuadrados rellenos: medio M9S; cuadrados vacíos; medio M9S+C.



**Figura 21.** Actividad transcripcional relativa (datos normalizados) de la construcción *pbetT1-CDAB:lacZ*. Círculos: medio M9C; cuadrados vacíos: medio M9S; cuadros rellenos medio M9S+C.

## IX. DISCUSIÓN

En el grupo de investigación encabezado por la Dra. Muñoz-Clares (Facultad de Química, UNAM), se propone a la *PaBADH* como un blanco de inhibición por fármacos tales como el Disulfiram o sus metabolitos (Velasco-García *et al.*, 2006b; Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011) para provocar la acumulación citoplásmica de BAL hasta alcanzar niveles tóxicos para *P. aeruginosa* y así combatir infecciones causadas por la misma. Por lo tanto, es fundamental conocer la regulación de la expresión de la *PaBADH* bajo diferentes condiciones nutrimentales y así asegurar la efectividad del uso de este tipo de fármacos sobre la vía catabólica de colina a GB.

### *Contexto genómico del operón betIBA y del gen betT1 y el papel de la proteína BetI en su regulación transcripcional*

Se sabe que bacterias como *E. coli*, *S. meliloti* (Andresen *et al.* 1988; Pocard *et al.* 1997; Velasco-García *et al.*, 2006a; Mandon *et al.* 2009), *V. harveyi* (van Kessel *et al.*, 2015) y *P. aeruginosa* (Lucchesi *et al.*, 1995; Velasco-García *et al.*, 2006a) poseen mecanismos para importar colina y GB al citoplasma. La colina se utiliza como precursor de GB y ésta, a su vez, como osmoprotector para enfrentar el estrés osmótico (Csonka, 1989). En un contexto genómico, los genes involucrados en la biosíntesis de GB y del transporte de colina, poseen un arreglo muy semejante entre las especies bacterianas mencionadas. El gen que codifica al transportador de colina, *BetT1*, se encuentra contiguo al operón *betIBA* y en dirección divergente.

Entre el operón *betIBA* y *betT1* se encuentra una secuencia intergénica que contiene patrones de reconocimiento para factores de transcripción como ocurre en la mayoría de las bacterias (Jacques *et al.*, 2006). Por lo tanto, es posible encontrar promotores en esta secuencia. Los promotores que se encontraron entre el operón *betIBA* y el gen *betT1* de *P. aeruginosa* son A (hacia *betIBA*) y C (hacia *betT1*), sobre las que se encuentra la caja de unión de la proteína reguladora *PaBetI* (Figura 4) (Velasco-García *et al.*, 2006a).

La expresión de *betT1-betIBA* en *E. coli* se debe a su arquitectura genómica (Malek *et al.*, 2011), la cual es muy parecida a la que se encuentra en *P. aeruginosa* (Velasco-

García *et al.*, 2006a). La liberación de la represión por colina genera dos actividades: (1) la inducción de *betT1* que resulta en un mayor transporte de la colina circundante al interior de la célula; y (2) la transcripción del mRNA policistrónico que codifica al represor *EcBetI* y las enzimas betaína aldehído deshidrogenasa (*EcBetB*; BADH) y colina deshidrogenasa (*EcBetA*; CDH) para la oxidación de colina a GB (Lamark *et al.*, 1996; Røkenes *et al.*, 1996).

Cuando se crecieron las células de *P. aeruginosa* PAO1 en un medio con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno se observó un aumento en la actividad transcripcional hacia *betT1* y hacia *betIBA* (Figura 16). Esto sugiere que el mecanismo de activación de *betT1-betIBA* en *P. aeruginosa* es muy semejante al observado en *E. coli* (Lamark *et al.*, 1996; Røkenes *et al.*, 1996). Por lo tanto, se propone que la proteína *PaBetI* responde de manera similar a la proteína *EcBetI* en presencia de colina.

Se sabe que la proteína reguladora *EcBetI* se une en forma de dímero al DNA en una caja localizada en la secuencia intergénica *betT1-betIBA*, y que esta unión tiene un comportamiento interesante, pues en presencia de colina no se separa del DNA, al contrario, se une con mayor afinidad (Røkenes *et al.*, 1996). La secuencia de la caja de unión a BetI presenta 91 % de similitud a la que se encuentra en la secuencia intergénica *betT1-betIBA* de *P. aeruginosa* PAO1 (Velasco-García *et al.*, 2006a) (Figura 22), situada sobre las cajas denominadas A y C (Figura 4), regulando así la transcripción en ambos sentidos.

*EcBetI*: TTTTATATTGAACGTC CAATCAATAA  
*PaBetI*: GTTTTATTGAACGTTCAATCAACTA

**Figura 22.** Secuencia del sitio de unión a BetI (modificado de Velasco-García *et al.*, 2006a). Las secuencias sombreadas indican las similitudes entre ambas regiones de unión a sus respectivas proteínas BetI.

#### *Caja D, secuencia con características de promotor*

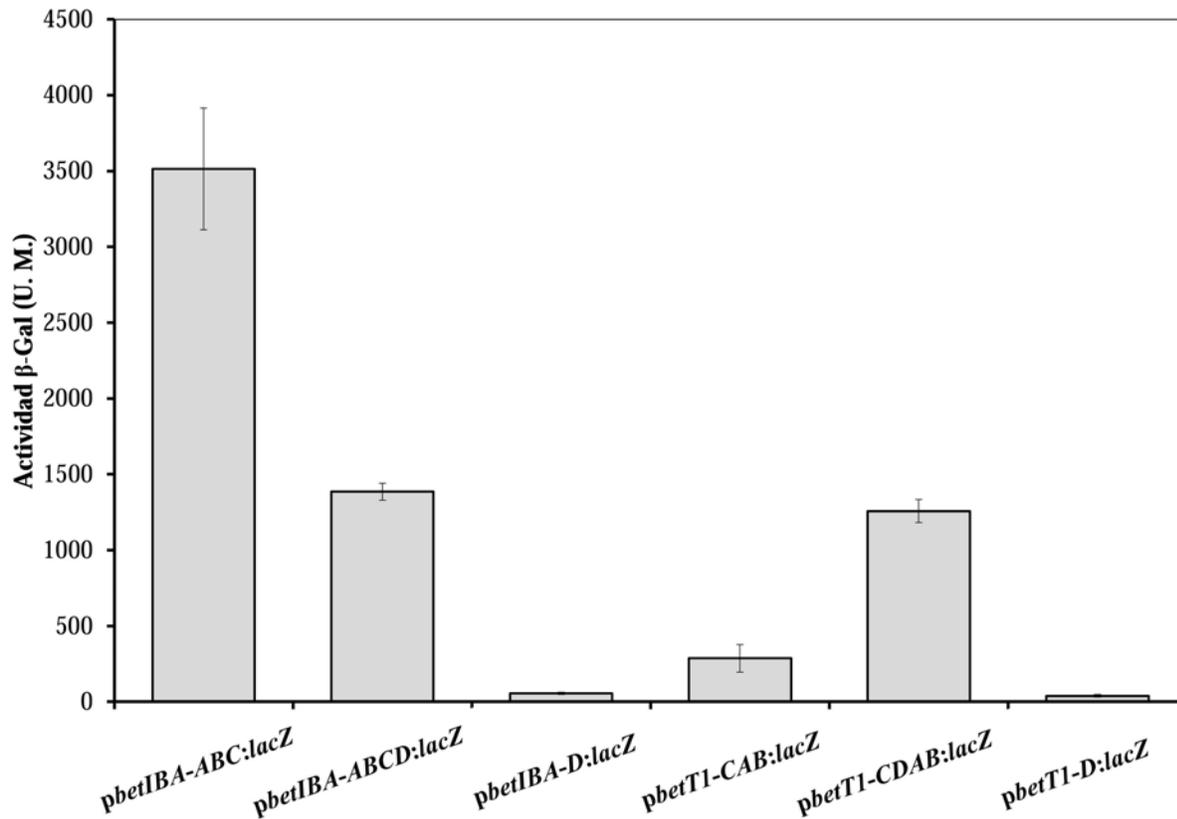
Más allá de las dos secuencias promotoras sobrelapadas (A y C) (Velasco-García *et al.*, 2006a), también se predijeron otras dos secuencias promotoras, B y D (Figura 4 y 5), localizadas río arriba de las cajas A y C, respectivamente, a distancias prácticamente

idénticas (Figura 7), por lo que se sugiere que estas cajas (*B* y *D*) sean elementos *cis* involucrados en el mecanismo de la regulación de la expresión tanto del operón *betIBA* como del gen *betTI*.

Lo anterior podría ser cierto si *PaBetI* se comporta en forma similar a *EcBetI*, ya que posiblemente la unión al DNA por inducción con colina permite la expresión de *betTI* y de *betIBA* estructuralmente involucrando a los cuatro promotores ilustrados en la Figura 4. Además, los resultados obtenidos previamente en el laboratorio a partir de la evaluación de la actividad transcripcional en *P. aeruginosa* PAO1 y los que se obtuvieron en esta tesis sugieren que sí están involucrados estos cuatro promotores.

#### *Análisis de las secuencias pbetIBA-ABC, pbetIBA-ABCD y pbetIBA-D*

En estudios previos, realizados en el laboratorio de la Dra. Muñoz Clares, se observó que la secuencia *pbetIBA-ABC*, que abarca solamente la secuencia intergénica (Figuras 4 y 6), sí activa la transcripción cuando las células crecen en un medio mínimo con colina como única fuente de carbono y de nitrógeno. Sin embargo, si se comparan las actividades transcripcionales de las dos construcciones a  $t=0$ , se observa que la actividad de *pbetIBA-ABC* es mayor que la actividad de *pbetIBA-ABCD*. (Figuras 15 y 23;  $p=0.003$ ). Es por esta razón que la actividad transcripcional basal de *pbetIBA-ABC* sólo se incrementa alrededor de 3 veces, mientras que la secuencia *pbetIBA-ABCD* no sólo mantiene una actividad basal significativamente menor (Figuras 15 y 23;  $p=0.003$ ), sino que logra incrementos de alrededor de 8 veces con respecto a la basal. Estos resultados sugieren que esta última secuencia contiene dominios de regulación fuera de la secuencia intergénica, que reprimen la transcripción en las células cuando crecen en medio LB. En conjunto, todo esto parece indicar que la regulación de la transcripción de *betIBA* hay un arreglo estructural en el DNA que involucra a la secuencia promotora *D*, la cual aparentemente tiene un papel represor en ausencia de colina sobre la expresión del operón *betIBA*.



**Figura 23.** Actividad transcripcional a  $t=0$  de cada fusión transcripcional analizada en cualquiera de los estímulos utilizados. Las columnas indican la actividad transcripcional de cada construcción analizada y las barras indican el error estándar de cada caso ( $n=9$ ).

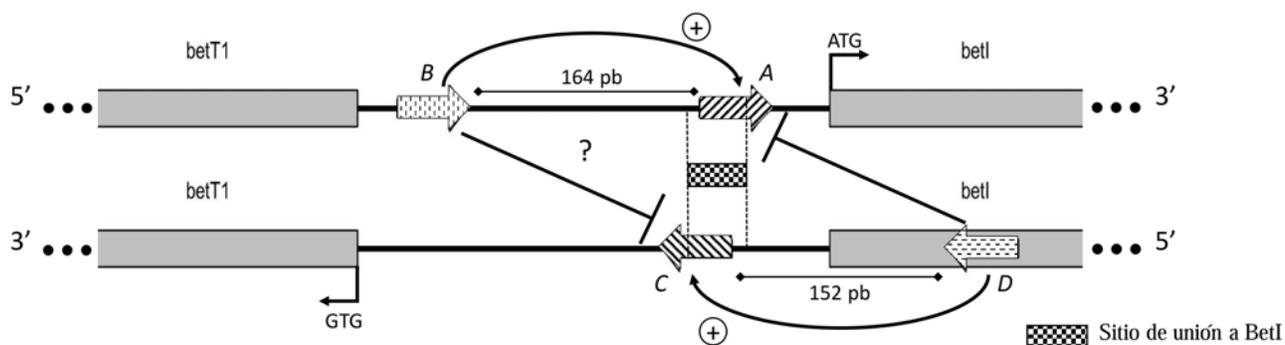
Para confirmar las hipótesis aquí propuestas, es necesario determinar la actividad transcripcional de la fusión *pbetIBA-D:lacZ*, la cual sólo contiene al promotor caja *D* (Figura 4). Los resultados de estos experimentos mostraron que la actividad de LacZ de esta construcción fue prácticamente indetectable, sugiriendo que la función de esta caja es más estructural que promotora, pues no contiene los elementos necesarios para activar la transcripción sobre los genes del operón *betIBA* al estudiarla de manera individual (Figuras 13 y 23).

En cuanto a los estudios enfocados en la posible represión catabólica inducida por glucosa y succinato (medios M9 y M9S, respectivamente), se observó que la actividad transcripcional de la construcción *pbetIBA-ABC:lacZ*, disminuyó en ambas condiciones respecto a la obtenida a  $t=0$  hasta en un 50% en contraste a la actividad transcripcional de la

fusión *pbetIBA-ABCD:lacZ* que no presentó disminución respecto a la actividad inicial; al contrario, aumentó hasta dos veces (Figura 17), lo cual sugiere que se requieren ciertos niveles de expresión del transportador para que en el momento en que aparezca colina en el medio sea incorporada a la célula y así poderla utilizar para la síntesis de GB.

Adicionalmente, cuando las células se crecen en los medios M9+C o M9S+C, la actividad transcripcional de *pbetIBA-ABCD:lacZ* aumentó, lo que sugiere que el operón *betIBA* se siguió expresando cuando hay colina en el medio sin importar la presencia de glucosa o succinato. Sin embargo, estas otras fuentes de carbono sí evitaron que la actividad transcripcional aumentara hasta el grado alcanzado cuando crecen únicamente en colina (Figuras 18 y 21). Esto podría significar que ocurre la inducción de una represión catabólica parcial por parte de la glucosa y del succinato, ya que permiten una expresión parcial de *betIBA* para aprovechar la colina del medio, ya sea para convertirla a GB, como osmoprotector, o continuar su catabolismo hasta obtener piruvato y obtener energía. Además, esto sugiere que no es necesaria una expresión de *betIBA* tan grande porque se pueden aprovechar las otras fuentes de carbono para generar energía. La razón por la cual podría ocurrir este fenómeno se menciona más adelante.

Estos resultados ayudan a proponer un modelo de regulación (Figura 24) en el que la caja *D*, incluida en la secuencia *pbetIBA-ABCD*, regularía negativamente la expresión del operón *betIBA* causada por el promotor *A* en ausencia de colina. Además, es posible que la secuencia *B* no activara la transcripción del operón *betIBA* por sí sola pero que regulara positivamente la transcripción provocada por *A* en presencia de colina, como ocurre con las secuencias *D* y *C* lo que se discute más adelante.



**Figura 24.** Modelo de la participación de los cuatro promotores analizados en este trabajo en la regulación transcripcional del operón *betIBA* y del gen *betT1* en *P. aeruginosa* PAO1. La caja A es el promotor del operón *betIBA* y es regulado positivamente por la caja B. La caja C es el promotor del gen *betT1* y está regulada positivamente por la caja D. Las cajas B y D actúan negativamente sobre las cajas C y A en ausencia de colina, regulando así la transcripción del gen *betT1* y del operón *betIBA*, respectivamente, en ausencia de colina.

#### *Análisis de las secuencias pbetT1-CAB, pbetT1-CDAB y pbetT1-D*

Los resultados de la actividad transcripcional del gen *betT1* de *P. aeruginosa* obtenidos en estudios previos que se realizaron en el laboratorio con la fusión *pbetT1-CAB:lacZ* mostraron un incremento modesto de la transcripción cuando las células se crecieron en colina (Figura 6B). En un análisis *in silico* más extenso, se encontró otra secuencia promotora (la caja D; Figura 4), razón por la cual se generó la fusión transcripcional *pbetT1-CDAB:lacZ* que incluye a la caja D junto con las otras tres previamente encontradas (C, A y B).

La fusión transcripcional *pbetT1-CDAB:lacZ* presentó una actividad a t=0 significativamente mayor que la de la construcción *pbetT1-CAB:lacZ* ( $p=0.00002$ ) (Figura 23). Se propone que la caja D promueve, en conjunto con la caja C, la transcripción del gen *betT1* y que los elementos involucrados en la expresión de *betT1* son los cuatro promotores predichos, incluidos en la región *pbetT1-CDAB* (Figura 4).

Además, la actividad transcripcional que se obtuvo con la construcción *pbetT1-D:lacZ* fue prácticamente nula (Figura 14), lo que sugiere que el promotor D no posee los elementos para regular la transcripción del gen *betT1* y requiere trabajar en conjunto con la caja C. Por esto se propone que los cuatro promotores están involucrados en la regulación de la transcripción del operón *betIBA* y de *betT1*.

Con respecto al análisis de la posible represión catabólica inducida por glucosa o succinato, la construcción *pbetT1-CDAB:lacZ* mostró un aumento de actividad transcripcional de aproximadamente dos veces en ambos casos (Figura 17), lo que sugiere que *betT1* no se reprime totalmente pero tampoco se activa hasta los niveles observados en presencia de únicamente colina. Cuando se estimuló a las células en condiciones mixtas (medios M9+C ó M9S+C) se observó un aumento de actividad de hasta cuatro veces mayor a la observada a t=0, lo que representa la mitad de la actividad alcanzada con colina, y este nivel de activación se mantuvo constante hasta las 15 h (Figuras 19 y 20).

Estos datos indican que el promotor *D* en realidad funciona como un potenciador de la actividad transcripcional del promotor *C* en presencia de solamente colina y también cuando además de colina hay glucosa o succinato, como se ilustra en el modelo de la Figura 24. Por lo tanto es posible proponer que debido al arreglo simétrico de las cajas AB contra CD, la caja B promoviera la actividad de la caja A. Esta hipótesis podría demostrarse generando la construcción *pbetIBA-ACD:lacZ*.

De acuerdo a las actividades a t=0 absolutas (Figura 23), la fusión *pbetIBA-ABC:lacZ* fue mayor que la de *pbetIBA-ABCD:lacZ* sugiriendo que la caja *D* tiene un efecto negativo sobre las cajas *A* y *B* (Figura 24), por lo tanto, de acuerdo al arreglo simétrico entre las cajas *A* y *B* respecto a las cajas *C* y *D*, se propone que la caja *B* tiene un efecto negativo sobre las cajas *C* y *D* (Figura 24), lo cual podría demostrarse generando la construcción *pbetT1-CDA:lacZ* esperando que su actividad basal fuese mayor que la de la fusión *pbetT1-CDAB:lacZ*.

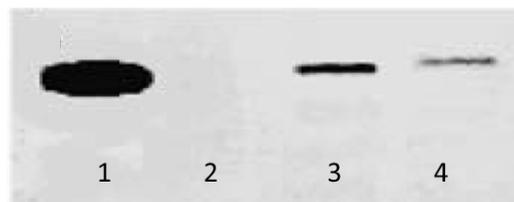
#### *Represión parcial de la expresión del operón betIBA y de betT1*

Los resultados de actividad transcripcional de la construcción *pbetT1-CDAB:lacZ* son similares a los que se obtuvieron con la construcción *pbetIBA-ABCD:lacZ*. Debido a que la actividad a t=0 no presenta diferencias significativas (p=0.108; Figura 23) y, en todos los estímulos probados, se observó una respuesta muy parecida a lo largo del tiempo, se sugiere que tanto la glucosa como el succinato reprimen parcialmente la expresión tanto de *betT1*

como de *betIBA* en *P. aeruginosa* PAO1 (Figuras 17 a 21), hasta niveles que permiten captar la colina del medio y realizar su metabolismo posterior hasta GB.

Esta represión parcial en la transcripción tanto de *betT1* como de *betIBA* se ve reflejado a nivel traduccional cuando las células de *P. aeruginosa* crecen en medios con sólo glucosa, sólo colina o glucosa más colina, ya que la actividad transcripcional que se observó en este trabajo coincide con los niveles de actividad específica de *PaBADH* reportados (Velasco-García *et al.*, 2006a). Esta actividad fue muy baja (<10 mU/mg de proteína) cuando se crecieron las células de *P. aeruginosa* en un medio con solamente glucosa. Sin embargo, la actividad incrementó hasta casi 100 veces cuando las células se crecieron en solamente colina. Adicionalmente, se observó que la actividad de la *PaBADH* se mantiene en presencia de glucosa más colina, siendo casi 40 veces mayor a la observada con sólo glucosa, sugiriendo una represión parcial de la expresión de la *PaBADH* inducida por glucosa.

También se determinó que las diferencias de actividad de la *PaBADH* se deben a la cantidad de esta enzima (Figura 25). Al crecer células de *P. aeruginosa* en medio con sólo glucosa, la cantidad de *PaBADH* es tan baja que es indetectable en los análisis por Western blot (WB), mientras que en el medio con sólo colina, la cantidad de la enzima es mayor, siendo más evidente la inmunodetección y en el medio con glucosa más colina, la banda es menos intensa (Figura 25) (Velasco-García *et al.*, 2006a). Esto sugiere que lo que aquí se reporta sobre la represión catabólica parcial que la glucosa ejerce sobre la expresión de la *PaBADH* a nivel transcripcional sea la causa de lo que se observa a nivel de proteína y de actividad enzimática (Velasco-García *et al.*, 2006a).



**Figura 25.** Análisis por WB del grado de expresión de la *PaBADH* en *P. aeruginosa*. Cada carril contiene 5 µg de proteína total. La banda 1 corresponde *PaBADH* purificada, la banda 2 corresponde al extracto crudo de las células de *P. aeruginosa* que se crecieron en un medio con glucosa más  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , la banda 3 corresponde a cuando se crecieron en un medio con solamente colina y la banda 4 corresponde a cuando se crecieron en un medio con colina, glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Modificado de Velasco-García *et al.* (2006a)

Cuando las células de *P. aeruginosa* crecen por 5.5 h en un medio sin colina, el nivel de mRNA de *betT1* es casi 20 veces menor comparado con el que se observa en células que crecieron en un medio con colina más glucosa, lo cual indica que la colina induce la transcripción de *betT1* aún en presencia de glucosa (Malek *et al.*, 2011). Cuando las células de *P. aeruginosa* tienen el gen *betI* interrumpido y se crecen en las mismas condiciones mixtas nutrimentales, el nivel de transcripción de *betT1* es aproximadamente 20 veces mayor que el observado en células de *P. aeruginosa* con el gen *betI* silvestre (Malek *et al.*, 2011), lo cual podría significar que la proteína *PaBetI* regula la transcripción de *betT1* en ausencia o presencia de colina de manera negativa o positiva, respectivamente, y que además su permanente interacción con el DNA de alguna manera impide que *betT1* se sobreexpresa, posiblemente interfiriendo estereoquímicamente con la RNA polimerasa.

Por las razones anteriores, se sugiere que la represión parcial de *betT1-betIBA* permite a las células mantener la maquinaria bioquímica necesaria para transformar colina en GB y quizá continuar la ruta catabólica de GB a piruvato para cuando las otras fuentes de carbono se agoten o exista un cambio abrupto en el ambiente en el que se encuentre la bacteria.

De acuerdo con los resultados de esta tesis, es posible proponer que los elementos *cis* necesarios para regular la transcripción de *betT1-betIBA* se encuentran en la región que contiene las secuencias *pbetT1-CDAB* y *pbetIBA-ABCD*, ya que se mostró que las cuatro cajas promotoras tienen una función regulatoria importante (Figura 24). Es posible que ocurra un arreglo estructural del DNA que involucre a las cuatro secuencias promotoras y que dicho arreglo cambie dependiendo de la concentración intracelular de colina así como de un cambio conformacional de *PaBetI* inducido por la unión de colina, ya que aunque esta proteína se mantiene unida al DNA en presencia de colina, la actividad transcripcional del operón *betIBA* aumenta.

El mecanismo por el cual ocurre la represión parcial de la expresión del operón *betIBA* y de *betT1* no se ha descrito aún; se sabe que en *E. coli* la concentración de colina es un factor importante para la unión de la proteína *EcBetI*, puesto que a mayor concentración de colina hay una mayor interacción DNA-*EcBetI* (Røkenes *et al.*, 1996). Si la proteína

*PaBetI* se comporta de la manera en que *EcBetI* lo hace, entonces, podría correlacionarse con el mantenimiento de concentración intracelular de colina y de GB en *P. aeruginosa*.

Se ha descrito que cuando se crece a *P. aeruginosa* en medios con sólo colina y NaCl 50 mM, la concentración de esta fuente de carbono y de nitrógeno se mantiene constante, tal y como ocurre con la concentración de GB. Sin embargo, cuando se crece en un medio con glucosa más colina y NaCl 50 mM, la concentración intracelular de colina disminuye más de la mitad de lo que se alcanza con sólo colina en el medio, mientras que la concentración de GB se mantiene en el mismo nivel (Fitzsimmons *et al.*, 2012).

Es posible que la concentración de colina influya de manera directa sobre la regulación de la transcripción del operón *betIBA* y del gen *betT1*, coincidiendo con el hecho de que en medios con glucosa y colina hay una actividad transcripcional menor que la observada con solo colina, que a su vez coincide con una menor actividad y cantidad de la *PaBADH*, y esto a su vez con una menor concentración intracelular de colina en condiciones de cultivo semejantes (Fitzsimmons *et al.*, 2012).

Lo anterior permite proponer que en el caso del estímulo con colina más succinato ocurra lo mismo, es decir, la concentración de colina intracelular es menor debido a la presencia de succinato y de esta manera tener una menor actividad transcripcional de *betT1-betIBA*.

## X. CONCLUSIONES

Se encontraron cuatro secuencias promotoras, denominadas cajas *A*, *B*, *C* y *D*, que están involucradas en la regulación transcripcional de *betT1-betIBA*.

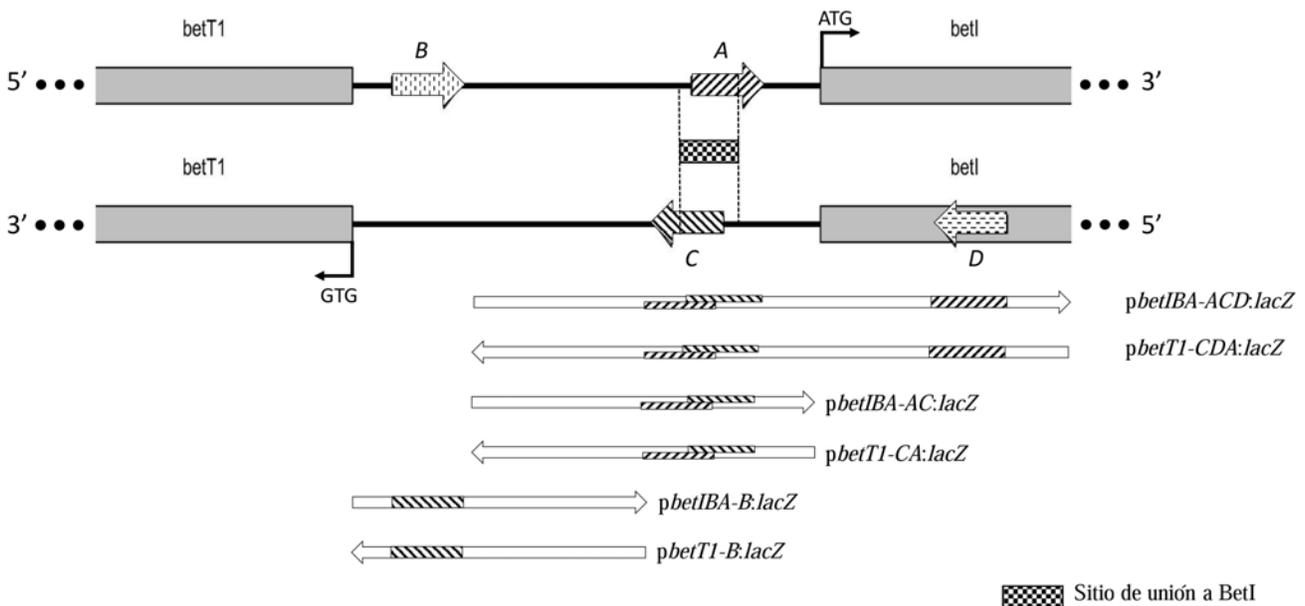
Los datos previamente reportados sobre la actividad enzimática de la *PaBADH* en la célula así como sus niveles detectados en medio con glucosa y colina (Velasco-García *et al.*, 2006a; Zaldívar-Machorro, datos no publicados) se deben a que no solo el gen *PaBADH* sino también el gen *PaBetT1* se transcriben aún en presencia de otras fuentes de carbono distintas a colina, siempre y cuando ésta esté presente en el medio.

El arreglo simétrico de los promotores *A*, *B*, *C* y *D* sugiere que en presencia de colina, la unión de *PaBetI* al DNA provoca un rearrreglo estructural involucrando a las cuatro cajas con características de promotor, regulando así la expresión de *betT1-betIBA*.

Finalmente, también se concluye que la *PaBADH* sigue siendo un potencial blanco de inhibición por fármacos porque, de acuerdo a los resultados, esta enzima se expresaría en *P. aeruginosa* cuando esté infectando tejidos en los que haya gran cantidad de colina y/o sus precursores sin importar que estén presentes otras fuentes de carbono, tales como glucosa y/o succinato. Como ya se mencionó, la inhibición de la *PaBADH* seguramente provocará la acumulación de BAL hasta niveles tóxicos para la bacteria.

## XI. PERSPECTIVAS

Para probar que en la regulación divergente de *betT1-betIBA* están involucradas las cuatro cajas promotoras de las regiones *pbetT1-CDAB* y *pbetIBA-ABCD* sería necesario generar otras fusiones transcripcionales que abarquen: (1) las secuencias sobrelapadas con la caja de unión a *PaBetI*, es decir, *A* y *C*, de tal manera que se evaluaría la función únicamente de estas cajas sobre la transcripción del conjunto *betT1-betIBA*; (2) las cajas *ACD* con la finalidad de evaluar la función de *B*, esperando que la transcripción del operón *betIBA* sea menor que la observada con *A* y *B* y que la transcripción de *BetT1* sea similar a la actividad obtenida a partir de la fusión *pbetIBA-ABC:lacZ*; y (3) otras fusiones que sólo contengan a *B* (Figura 26).



**Figura 26.** Fusiones transcripcionales necesarias para probar que las cuatro cajas promotoras están involucradas en la regulación transcripcional del operón *betIBA* y del gen *betT1* como se propone en el modelo de la Figura 24.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

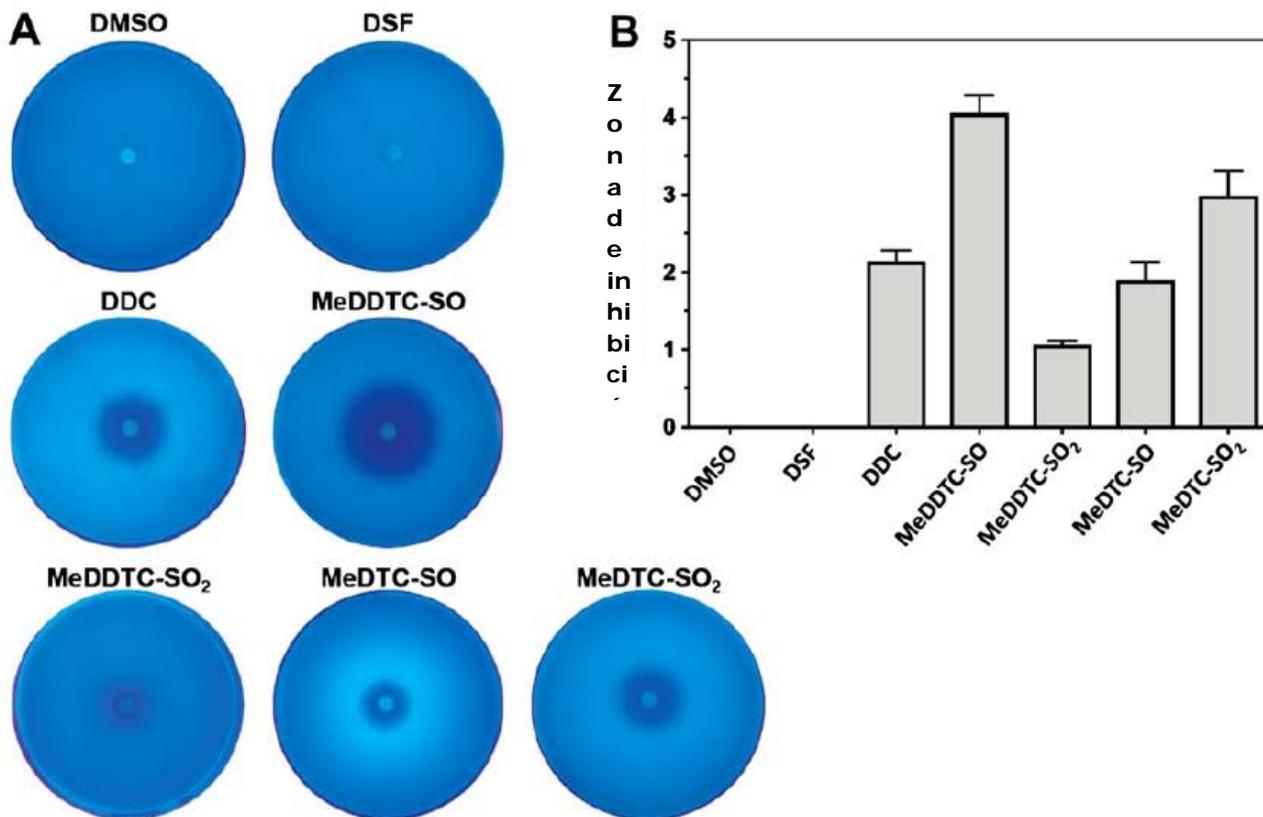
- Andonova, M. y Urumova, V. 2013. Immune surveillance mechanism of the skin against the stealth infection strategy of *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp Immunol Infect Dis* **36**:433-48.
- Andresen, P.A., Kaasen, I., Styrvold, O.B., Boulnois, G. y Strøm, A.R. 1988. Molecular cloning, physical mapping and expression of the *bet* genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *N Gen Microbiol* **134**: 1737-1746.
- Brien, J.F. y Loomis, C.W. 1985, Aldehyde dehydrogenase inhibitors as alcohol sensitizing drugs: a pharmacological perspective. *Trends Pharmacol Sci* **6**: 477-480.
- Collier, D.N., Hager, P.W. y Phibbs, P.V. 1996. Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. *Res Microbiol* **147**: 551-561.
- Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol* **53**: 121-147.
- Diab, F., Bernard, T., Bazire, A., Haras, D., Blanco, C. y Jebbar, M. 2006. Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology* **152**: 1395-1406
- Eshoo, M.W. 1988. *Lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J Bacteriol* **170**: 5208-5215.
- Fitzsimmons, L.F., Hampel, K.J. y Wargo, M.J. 2012. Cellular choline and glycine betaine pools and phospholipase C production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **194**:4718-4726.
- Hald, J., y Jacobsen, E. 1948. A drug sensitizing the organism to the ethyl alcohol. *Lancet* **2**:1001-1004.
- Ho-Sui, S.J., Lo, R., Fernandes, A.R., Caulfield, M.D.G., Lerman, J.A., Xie, L., Bourne, P.E., Baillie, D.L. y Brinkman, F.S.L. 2012. Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *Int J Antimicrob Agents* **40**: 246-251.
- Jacques, P.É., Rodrigue, S., Gaudreau, L., Goulet, J. y Brzezinski, R. 2006. Detection of procaryotic promoters from the genome distribution of hexanucleotide pairs. *BMC Bioinformatics* **7**:423.

- Korvik, J.A., Marsh, J.W., Starzl, T.E. y Yu, V.L. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients undergoing liver transplantation: an emerging problem. *Surgery* **109**:62-8.
- Lamark, T., Røkenes, T.P., McDougall, J. y Strøm, A.N. 1996. The complex *bet* promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J Bacteriol* **178**: 1655-1662.
- Landfald, B. y Strøm, A.R. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 849-855.
- Linn, T. y St. Pierre, R. 1990. Improved vector system for constructing transcriptional fusions that ensures independent translation of *lacZ*. *J Bacteriol* **172**:1077-1084.
- Lucchesi, G.I., Lisa, T.A., Casale, C.H. y Domenech, C.E. 1995. Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* **30**: 55-60.
- Malek, A.A., Chen, C., Wargo, M.J., Beattie, G.A. y Hogan, D.A. 2011. Roles of three transporters, CbcXWV, BetT1, and BetT3, in *Pseudomonas aeruginosa* choline uptake for catabolism. *J Bacteriol* **193**:3033.
- Mandon, K., Østerås, M., Boncompagni, E., Trinchant, J.C., Spennato, G., Poggi, M.C. y Le Rudulier, D. 2009. The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (*betICBA*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 709-719.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. *CSH Protoc* 352.
- Pocard, J.A., Vincent, N., Boncompagni, E., Tombras-Smith, L., Poggi, M.C. y Le Rudulier, D. 1997. Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143**: 1369-1379.
- Røkenes, T.P., Lamark, T. y Strøm, A.R. 1996. DNA-Binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. *J Bacteriol* 1663-1670.
- Sage, A. y Vasil, M. 1997. Osmoprotectant-dependent expression of *plcH*, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **179**: 4874-4881.

- Solovyev V. y Salamov A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies. *Nova Science Publishers* p. 61-78.
- Snyder, L. y Champness, W. 2007. *Molecular Genetics of Bacteria*. 3a Ed. ASM Press. Washington D.C., E.U.A. 735 pp.
- van Kessel, J.C., Rutherford, S.T., Cong, J.P., Quinodoz, S., Healy, J. y Bassler, B.L. 2015. Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **197**:73-80.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G., y Muñoz-Clares, R.A. 1999. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**:1292-1300.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramírez-Romero, M.A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G. y Muñoz-Clares, R.A. 2006a. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch Microbiol* **185**: 14-22.
- Velasco-García, R., Zaldívar-Machorro, V.J., Mújica-Jiménez, C., González-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A., 2006b. Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase - A potential for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 408-415.
- Wagner, V.E., Gillis, R.J. y Iglewski, B.H. 2004. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **22S**:S15-S20.
- Wargo, J.M. 2013. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2112-2120
- Wargo, J.M., Ho, T.C., Gross, M.J., Whittaker, L.A. y Hogan, D.A. 2009. GbdR Regulates *Pseudomonas aeruginosa* *plcH* and *pchP* transcription in response to choline catabolites. *Infect Immun* **77**: 1103-1111.
- Wolff, J.A., MacGregor, C.H., Eisenberg, R.C. y Phibbs, P.V. Jr. 1991. Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *P. aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* 4700-4706.

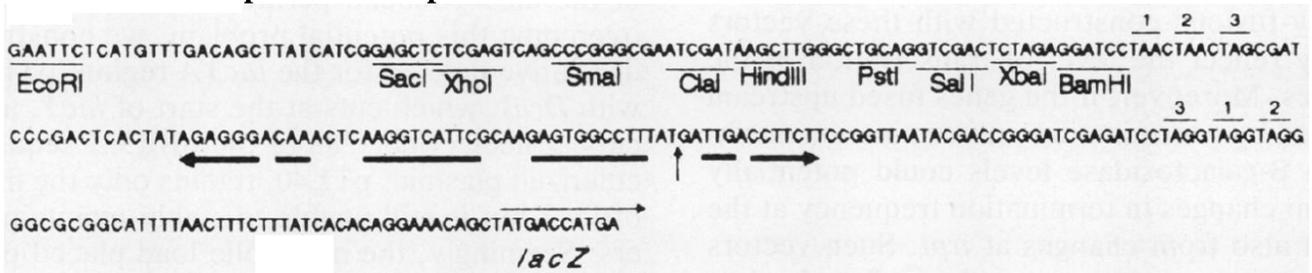
- Zaldívar-Machorro, V.J., López-Ortíz, M., Demare, P., Regla, I. y Muñoz-Clares, R.A. 2011. The disulfiram metabolites S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. *Biochimie* **93**: 286-296.
- Zaldívar-Machorro, V.J. 2011. Inhibición de la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Bioquímica). UNAM.
- Ziegler, C., Bremer, E. y Krämer, R. 2010. The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol* **78**:13-34.

## Anexo 1.

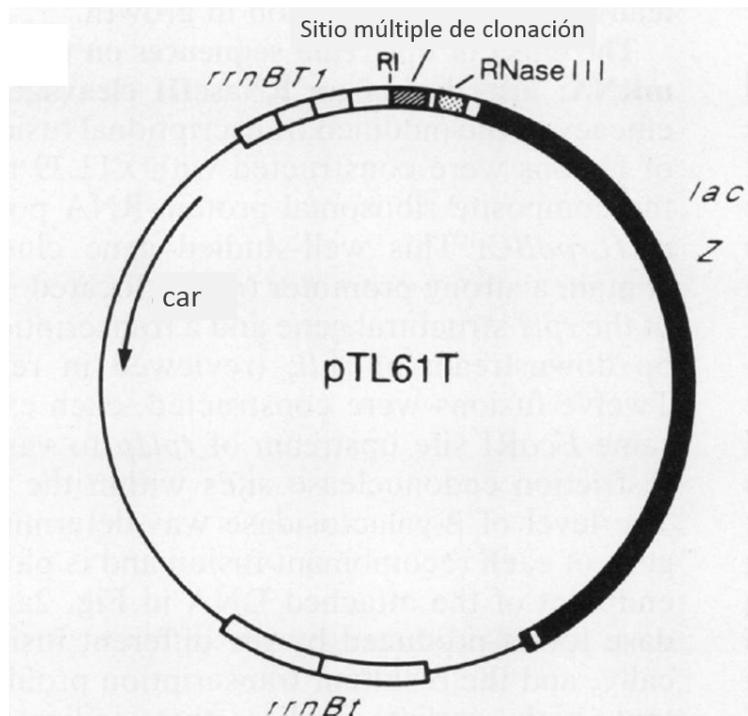


Inhibición del crecimiento de células de *P. aeruginosa* en agar M9C debido al Disulfiram y sus metabolitos. (A) Discos de papel filtro que contenían DMSO o 5  $\mu$ moles de uno de los reactivos (disuelto en DMSO) sobre placas de agar M9C inoculadas con 100  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a un  $DO_{600}$  de 0.1. (B) Diámetro de la zona de inhibición después de 18 h de incubación a 37 °C. Los datos consideran la media de tres experimentos independientes. DMSO=dimetil sulfóxido; DSF=Disulfiram; DDC=Dietilditiocarbamato; MeDDTC-SO=S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfóxido; MeDDTC-SO<sub>2</sub>=S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfona; MeDTC-SO=S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamiol sulfóxido; MeDTC-SO<sub>2</sub>=S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamoil sulfona (Tomado de Zaldívar-Machorro, *et al.* 2011).

## Anexo 2. Mapa del vector pLP170



**Figura A.** Secuencia de las primeras 238 pb del vector pTL61T. En esta secuencia se encuentra el sitio múltiple de clonación donde se señalan los sitios de restricción subrayados y nombrados, también se muestra el sitio de procesamiento de la RNasa III T7 subrayados en líneas gruesas del cual la flecha delgada, orientada de manera vertical indica el sitio de escisión y el extremo 5' del mRNA procesado de *lacZ* deberá ser la G a la derecha de esta flecha la flecha. El codón de inicio de *lacZ* se indica sobrelineado con una flecha. Los codones de paro de la traducción se señalan sobrelineados y numerados de acuerdo a su respectivo marco de lectura.



**Figura B.** Mapa del vector pLP170. El vector consiste de los elementos contenidos en otro vector, el pTL61T (Número de acceso a GenBank M29896) de 8565 pb. Su secuencia se numera a partir del inicio del sitio de restricción *EcoRI* señalado como RI en el sitio múltiple de clonación. RNase III es el sitio de procesamiento de la RNasa III T7. En negro se observa el reportero *lacZ*. Las cajas blancas señaladas como *rrnBt* indican dos copias repetidas de la región transcripcional terminadora de *rrnB*, cada una de las cuales contiene dos terminadores, *T1* y *T2*. Las cajas blancas etiquetadas como *rrnBT1* indican cuatro copias repetidas del terminador *rrnBT1*. La flecha delgada indica el gen de resistencia a Carbenicilina (Linn y St. Pierre, 1990) (Este vector fue otorgado para este estudio por la Dra. Gloria Soberón del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).