



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

Atenuación de virulencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y optimización de su producción de ramnolípidos mediante estrategias genéticas

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

M. en C. Uriel Gutiérrez Gómez

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Gloria Soberón Chávez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**COMITÉ TUTOR:**

Dr. Dimitris Georgellis  
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Luis Servín González  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria. CD. MX.  
Junio 2019



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.

Para ustedes, mamá y papá...

*“El éxito es ir de fracaso en fracaso, sin perder el entusiasmo”*

*“El éxito no es el final, el fracaso no es total. Lo que cuenta es el valor de continuar”*

Winston S. Churchill (1874 – 1965)

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Gloria Soberón Chávez, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El sustentante Uriel Gutiérrez Gómez (CVU: 422007) fue apoyado económicamente durante sus estudios de doctorado con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Durante el desarrollo del proyecto de doctorado, el sustentante fue apoyado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM para realizar una estancia en la Universidad Estatal de Pennsylvania (Penn State University) de los Estados Unidos de América. Asimismo, el presente proyecto contó con financiamiento por parte del CONACyT (Proyecto No. 252269) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM (Proyectos Nos. IN200416 e IN201819).

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México; porque es un privilegio, un honor y un alto compromiso ser egresado de la más prestigiosa institución académica de México.

A los integrantes de mi jurado de titulación, por su apoyo, interés y paciencia para la culminación de este proceso.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez; por abrir las puertas de su laboratorio y permitirme realizar este proyecto, y así contribuir a mi formación académica y personal a través de su visión, observaciones, sugerencias y apoyo.

A mi comité tutor, Dr. Dimitris Georgellis y Dr. Luis Servín González; porque sus comentarios y sugerencias fueron parte medular para el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Bertha González Pedrajo y al Dr. Alfonso Dueñas González; por apoyarnos en la realización de experimentos importantes en sus respectivos laboratorios para la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Thomas K. Wood; por permitirme aplicar mi conocimiento en su grupo de investigación de Penn State University y tener una experiencia de aprendizaje inmensa e invaluable.

A mis amigos Michael J. McAnulty y Venkata Giridhar Poosarla; por sus consejos en el laboratorio y hacer mi estancia en State College mucho más agradable. A mis hermanos Caheri, César y Pedro; porque, cada quien a su manera, me ayudó a transitar y salir adelante en los momentos más difíciles (académicos y personales) que he tenido durante el desarrollo de este proyecto. En una época y un ambiente laboral-académico complicado para encontrar una amistad auténtica, es un verdadero privilegio poder presumir que no sólo son mis colegas, sino también mis amigos y hermanos. Ustedes son la prueba de que no se trata de tener a muchos a tu lado, sino de tener a los necesarios.

A ti Angélica; porque eres de lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias por ayudarme a recuperar mi confianza, por tu paciencia, amor y por ser un apoyo importantísimo en mis mejores y peores momentos. Gracias por darle el sentido de equilibrio y estabilidad que necesitaba mi vida. Tu impulso a continuar y a seguir mis sueños han sido esenciales para mi evolución como persona, mientras que tu perspectiva y consejos siempre fueron muy valiosos para guiarme y tomar decisiones. Realmente soy muy afortunado de tener a alguien como tú a mi lado.

A mis papás; porque, sin duda, este doctorado es también de ustedes. Ni con todas las frases o reflexiones de agradecimiento que se han escrito en toda la historia sería suficiente para agradecer lo que han hecho por mí. Su amor, valor, entrega, consejos, honestidad y apoyo han sido la principal inspiración para seguir su ejemplo, y así hacer de ustedes los pilares en los que he edificado mi vida.

## RESUMEN

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, como parte de los diversos metabolitos que sintetiza de manera natural, produce unos glicolípidos denominados ramnolípidos (RL). Estos biosurfactantes son metabolitos secundarios compuestos por una fracción hidrofílica polar de L-ramnosa, y una fracción hidrofóbica no polar de un dímero de ácidos grasos denominado ácido 3-(3-hidroxi)alcanoil(oxi)alcanoico (HAA). Éste último se compone por subunidades de (R)-3-hidroxiácidos grasos de diez átomos de carbono. Muchas cepas de *P. aeruginosa* producen dos variedades de RL: el mono-RL (constituído por una molécula de L-ramnosa) y el di-RL (compuesto por dos moléculas de L-ramnosa). Los RL son agentes tensoactivos que participan, directa o indirectamente, en múltiples funciones fisiológicas de *P. aeruginosa*. Debido a esto, los RL han comenzado a ser empleados en diversos ámbitos de la industria con el objetivo de, paulatinamente, reemplazar a los surfactantes de origen sintético que constituyen a la gran mayoría de productos de consumo cotidiano. Aunque *P. aeruginosa* es el mejor productor de RL reportado, esta bacteria está clasificada como patógeno oportunista; por lo que es importante obtener cepas que carezcan de los principales factores de virulencia con una producción considerable de RL. Así como estos últimos, *P. aeruginosa* produce un biopolímero compuesto de subunidades de (R)-3-hidroxiácidos grasos denominado polihidroxi)alcanoato (PHA), el cual representa una competencia metabólica para la optimización de la producción de biosurfactantes. Considerando los problemas de virulencia y producción de PHA, este trabajo consistió en la obtención de cepas *P. aeruginosa* PA14 carentes de sus principales factores de virulencia dentro de un fondo genético de sobreproducción de RL, optimizado mediante estrategias de Ingeniería de Vías Metabólicas. Utilizando *P. aeruginosa* PA14 como cepa parental, se obtuvo un incremento de RL totales del 60% al bloquear la biosíntesis de PHA mediante la generación de una triple mutante *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> y sobreexpresando los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlR*. La proporción molar mono-RL:di-RL obtenida en esta cepa sobreproductora fue de 1:1. En un estudio de caracterización más profunda de la vía de biosíntesis de RL y PHA, nuestros resultados indican que la enzima RhlA, previamente asociada exclusivamente a la biosíntesis de RL, genera también intermediarios para la biosíntesis de PHA. Además, contrario a lo previamente descrito, nuestros resultados demuestran que el flujo de carbono que existe a través de  $\beta$ -oxidación no tiene relevancia en la vía de biosíntesis de RL, utilizando glucosa como principal fuente de carbono. También proponemos que las enzimas enoil-CoA hidratasa RhlY y enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ generan los principales precursores de ácidos grasos para la biosíntesis de RL, a través de la vía de biosíntesis *in situ* (*de novo*) de ácidos grasos. Para atenuar la virulencia de la cepa sobreproductora de RL previamente obtenida, generamos una mutación en el gen *pscC* para bloquear la secreción de toxinas del sistema de secreción tipo III (T3SS), obteniendo así la cepa sobreproductora GUG1. Sobre ésta última, se generó una mutación en el gen *rhlC* para sobreproducir exclusivamente mono-RL, obteniendo así la cepa GUG2. Ambas cepas fueron sometidas a ensayos de virulencia utilizando células HeLa (ATCC® CCL-2™) y dos modelos biológicos (*Galleria mellonella* y ratón BALBc/AnNHsd). Tanto la cepa GUG1 como GUG2 fueron avirulentas, al registrar el 100% de sobrevivencia en los ensayos de infección. En nuestras condiciones de cultivo y producción, la cepa GUG1 produjo un título de RL totales (mono- y di-RL, en proporción molar 1:1) de 248.63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la cepa GUG2 (la cual sintetiza mono-RL exclusivamente) produce un título de 162.64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En ambas cepas, se observó un incremento de RL totales con respecto a la cepa tipo PAO1 en nuestras condiciones de cultivo y producción. Por lo tanto, estas cepas consideramos que pueden ser utilizadas en procesos de producción de RL a mayor escala.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
I.1. Generalidades de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
I.2. Rhamnolípidos. Composición química, vía de biosíntesis y aplicaciones en la industria .....	1
I.3. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	4
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	5
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	7
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	7
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	8
V.1. Objetivo general .....	8
V.2. Objetivos particulares .....	8
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
VI.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	8
VI.2. Manipulación de DNA .....	9
VI.3. Deleción de genes cromosomales en <i>P. aeruginosa</i> .....	9
VI.4. Extracción, purificación y cuantificación de RL y PHA .....	10
VI.5. Detección por cromatografía en capa fina (TLC) y estimación semicuantitativa de mono- y di-RL.....	10
VI.6. Detección y análisis de toxinas ExoU y ExoT.....	10
VI.7. Ensayos de citotoxicidad en células HeLa (ATCC® CCL-2™).....	10
VI.8. Ensayos de infección en modelo de polilla de cera ( <i>Galleria mellonella</i> ).....	11
VI.9. Ensayos de infección en modelo de ratón BALBc/AnNHsd .....	11
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	11
VII.1. Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>rhlA</i> , <i>rhlB</i> y <i>rhlR</i> sobre la producción de RL y PHA en la cepa de PA14 .....	11
VII.2. Generación y caracterización de cepa PA14 <i>phaG</i> .....	12
VII.3. Generación de cepa PA14 <i>phaG phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup></i> .....	13
VII.3.1. Caracterización de cepa PA14 <i>phaC2<sup>-</sup></i> .....	13
VII.4. Efecto de la sobreexpresión en <i>trans</i> de los operones <i>rhlAB</i> y <i>rhlAB-R</i> en la cepa PA14 <i>phaG phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup></i> .....	15
VII.5. Función de la proteína RhlA en la biosíntesis de PHA .....	17
VII.6. La enoil-CoA hidratasa RhlY y la enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ generan el principal precursor de ácidos grasos para la biosíntesis de RL, a partir de la vía de síntesis <i>in situ</i> de ácidos grasos.....	19
VII.7. La interrupción del flujo de carbono por la vía de $\beta$ -oxidación no modifica el título de RL .....	20
VII.8. Atenuación de virulencia en cepas de <i>P. aeruginosa</i> sobreproductoras de RL .....	22
VII.8.1. Generación de mutación $\Delta pscC::aac(3)IV$ sobre la cepa PA14 <i>phaG phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup></i> para el bloqueo de la secreción de toxinas por el sistema de secreción tipo III (T3SS).....	22
VII.8.2. Evaluación de la citotoxicidad sobre las células HeLa (ATCC® CCL-2™).....	23
VII.8.3. Generación de cepa sobreproductora de mono-RL derivada de la cepa PA14 con una virulencia atenuada .....	24
VII.8.4. Efecto de atenuación de virulencia en modelo de polilla de cera ( <i>Galleria mellonella</i> ).....	25
VII.8.5. Efecto de atenuación de virulencia en modelo de ratón BALBc/AnNHsd .....	26

VIII. CONCLUSIONES .....	27
IX. PERSPECTIVAS .....	28
X. REFERENCIAS .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. a &amp; b.</b> Estructuras químicas de ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> : di-RL (a) y mono-RL (b). <b>c.</b> Estructura química de 3-(3-hidroxialcanoiloxi)alcanoatos (HAAs) [tomado de Filloux & Ramos, 2014]. .....	1
<b>Figura 2.</b> Regulación de los genes <i>rhlA</i> , <i>rhlB</i> y <i>rhlC</i> , esenciales para la biosíntesis de RL en <i>P. aeruginosa</i> . Aunque la biosíntesis de estos genes forma parte de una red de regulación en la que participan otros sistemas QS (sistemas <i>las</i> y PQS), la biosíntesis de RL se encuentra directamente controlada por el regulador transcripcional RhIR. ....	2
<b>Figura 3.</b> Vía de biosíntesis de RL y PHA en <i>P. aeruginosa</i> . La línea punteada indica una actividad enzimática sugerida, pero no demostrada. ....	3
<b>Figura 4.</b> Algunos ejemplos de las diversas aplicaciones de los RL en la industria. ....	3
<b>Figura 5.</b> Producción de ramnolípidos en cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con expresión en trans del operón <i>rhlAB</i> de <i>P. aeruginosa</i> en vector de expresión pHERD20T- <i>rhlAB</i> . ....	6
<b>Figura 6.</b> Producción de RL en cepas PAO1 y ATCC9027. La unidad transcripcional de los genes <i>rhlAB</i> y <i>rhlAB-R</i> , así como los genes <i>rhlA</i> y <i>rhlR</i> , fueron sobreexpresados en el vector pUCP24 con sus promotores nativos cromosomales. <b>v.</b> Cepas con pUCP24. <b>A.</b> Cepas con construcción pUCP24/ <i>rhlA</i> . <b>AB.</b> Cepas con construcción pUCP24/ <i>rhlAB</i> . <b>ABR.</b> Cepas con construcción pUCP24/ <i>rhlAB-R</i> . <b>ABR/C4.</b> Cepas con construcción pUCP24/ <i>rhlAB-R</i> , adicionada con autoinductor 10 mM C4-HSL. <b>R.</b> Cepas con construcción pUCP24/ <i>rhlR</i> . <b>R/C4.</b> Cepas con construcción pUCP24/ <i>R</i> , adicionada con autoinductor 10 mM C4-HSL. ....	7
<b>Figura 7.</b> Efecto de la sobreexpresión de los operones <i>rhlAB</i> y <i>rhlAB-R</i> sobre la producción de RL y PHA en la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA. ....	12
<b>Figura 8.</b> Efecto de la mutación del gen <i>phaG</i> sobre la producción de RL y PHA en la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos negros representan diferencia en PHA. ....	12
<b>Figura 9.</b> Efecto de la mutación de los genes <i>phaC1</i> y <i>phaC2</i> sobre la producción de PHA en la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos negros representan diferencia en PHA. ....	13
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de secuencia de nucleótidos de las secuencias <i>phaC1</i> <sub>wt</sub> (proveniente de la cepa PA14 <sub>wt</sub> ) y <i>phaC1</i> <sub>m</sub> (proveniente de la cepa PA14 <i>phaC2</i> ), así como su traducción a proteínas. Los nucleótidos sombreados en color negro corresponden a 100% de identidad. ....	14
<b>Figura 11.</b> Efecto de la complementación con los genes <i>phaC1</i> <sub>wt</sub> y <i>phaC1</i> <sub>m</sub> sobre la producción de PHA en una cepa PA14 <i>phaC1</i> <sup>-</sup> . Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), comparando los pares de cepas que están conectados con líneas. Los asteriscos negros representan diferencia en PHA. ....	15



**Figura 12.** Producción de RL y PHA en cepas derivadas de PA14 *phaG<sup>-</sup> phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* sobreexpresando los operones *rhlAB* y *rhlAB-R*. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA. . 16

**Figura 13. A.** TLC de muestras de RL obtenidos de la cepa sobreproductora PA14 *phaG<sup>-</sup> phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup> / pUCP20-rhlABR*. **B.** Estimación semicuantitativa, realizada mediante el software ImageJ, de la proporción de mono- y di-RL en las cepas PA14, PAO1 y PA14 *phaG<sup>-</sup> phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup> / pUCP20-rhlABR*. ..... 16

**Figura 14.** Alineamiento de proteínas RhlA (PA14\_19100) y PhaG (PA14\_54830). Las letras sombreadas con color negro indican identidad, mientras que las sombreadas con color gris indican similitud. Los aminoácidos señalados en rojo son la triada catalítica identificada para RhlA. .... 17

**Figura 15.** La proteína RhlA genera intermediarios para la biosíntesis de PHA. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ). Las cepas PA14 *phaG<sup>-</sup>*, PA14 *phaG<sup>-</sup> / pHERD20T-phaG*, PA14 *rhlA<sup>-</sup>* y PA14 *rhlA<sup>-</sup> / pHERD20T-rhlAB* fueron comparadas tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Adicionalmente, también fueron comparadas los pares de cepas que están conectados con líneas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA. .... 18

**Figura 16.** La enoil-CoA hidratasa RhlY y enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ generan precursores para la biosíntesis de RL y PHA en un medio de cultivo con glucosa como principal fuente de carbono. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), comparando los pares de cepas que están conectados con líneas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA..... 19

**Figura 17.** La sobreexpresión del operón *rhlAB-R* no modifica la producción de RL o PHA en una cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> rhlY<sup>-</sup> rhlZ<sup>-</sup>*. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Adicionalmente, las cepas conectadas con líneas también fueron analizadas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA..... 20

**Figura 18. A.** Curva de crecimiento de mutante PA14 *fadD1<sup>-</sup> fadD2<sup>-</sup>*. **B.** Producción de RL y PHA en mutante PA14 *fadD1<sup>-</sup> fadD2<sup>-</sup>*. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Adicionalmente, las cepas conectadas con líneas también fueron analizadas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA..... 21

**Figura 19.** Vía metabólica propuesta de biosíntesis de RL y PHA en *P. aeruginosa*. ..... 22

**Figura 20.** En la parte superior se observa el gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie con las proteínas totales presentes en el sobrenadante. En la parte inferior, correspondiente al Western blot, se realizó la detección de las toxinas ExoU y ExoT. Se utilizó la cepa PA14 *pscD<sup>-</sup>* como control negativo de la secreción de toxinas. .... 23

**Figura 22. A.** Efecto citotóxico de cepas derivadas de PA14 en infección de células HeLa (ATCC® CCL-2™) a una MOI=20 y MOI=50. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa control PA14 *pscD<sup>-</sup>*. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la MOI = 20, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en la MOI = 50. **B.** Efecto citotóxico y sobrevivencia global a ambas MOI. Se utilizó la cepa PA14 *pscD<sup>-</sup>* como control negativo de citotoxicidad. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa control PA14 *pscD<sup>-</sup>*. Los asteriscos grises representan diferencia significativa. .... 24

**Figura 22. A.** Producción de RL y PHA en cepas sobreproductoras de mono-RL, derivadas de la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), analizando las cepas conectadas con líneas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA. **B.** TLC de RL de la cepa GUG2, sobreproductora de mono-RL (PA14 *phaG<sup>-</sup> phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup> pscC<sup>-</sup> rhIC<sup>-</sup> / pUCP20-rhlABR*). ..... 24

**Figura 23.** Cepas sobreproductoras GUG1 y GUG2, con virulencia atenuada, comparadas con la producción de las cepas de referencia PAO1 y PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PAO1.

Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA. .... 26

**Figura 24.** A. Producción de mono-RL (A) y di-RL (B) en cepas sobreproductoras con virulencia atenuada. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PAO1. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL ..... 27

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en este estudio. .... 8

**Tabla 2.** Conteo de sobrevivientes en la infección de *G. mellonella*. Se utilizó la cepa ATCC9027 como un control positivo de sobrevivencia. .... 25

**Tabla 3.** Conteo de sobrevivientes en la infección de ratón BALBc/AnNHsd. Se utilizó la cepa ATCC9027 como un control positivo de sobrevivencia. .... 26

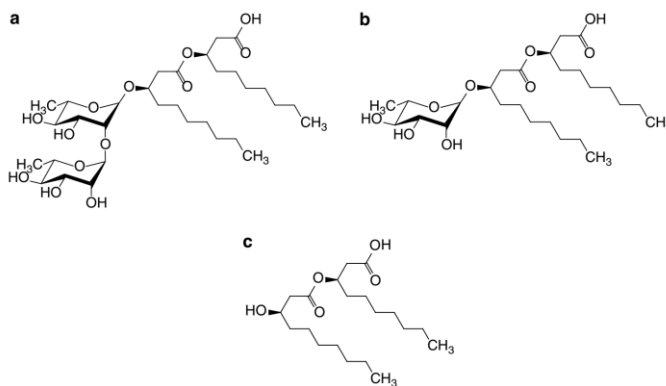
## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Generalidades de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa que filogenéticamente pertenece a la clase  $\gamma$ -Proteobacteria. Se le considera como una bacteria ubicua debido a que se encuentra en diversos ambientes, e inclusive en aquellos que han sido contaminados con mezclas heterogéneas de hidrocarburos o metales pesados. Esta capacidad de *P. aeruginosa* de crecer en estos ambientes diversos se debe a la amplia gama de metabolitos y enzimas que ésta produce, los cuales le confiere ciertas ventajas metabólicas sobre otras poblaciones microbianas para sobrevivir. Sin embargo, algunos de estos metabolitos también son considerados factores de virulencia característicos de esta bacteria para infectar plantas, insectos y mamíferos, incluyendo al hombre; asimismo, algunos de estos factores son regulados mediante un mecanismo distintivo de comunicación microbiana, característica de algunos microorganismos, conocido como sistema sensor de *quórum* – QS, por sus siglas en inglés [Williams & Cámara, 2009]. La producción concertada de diversos factores de virulencia plantea una problemática importante si se desea utilizar a *P. aeruginosa* con fines biotecnológicos, debido a que esta bacteria representa un alto riesgo biológico para su manipulación.

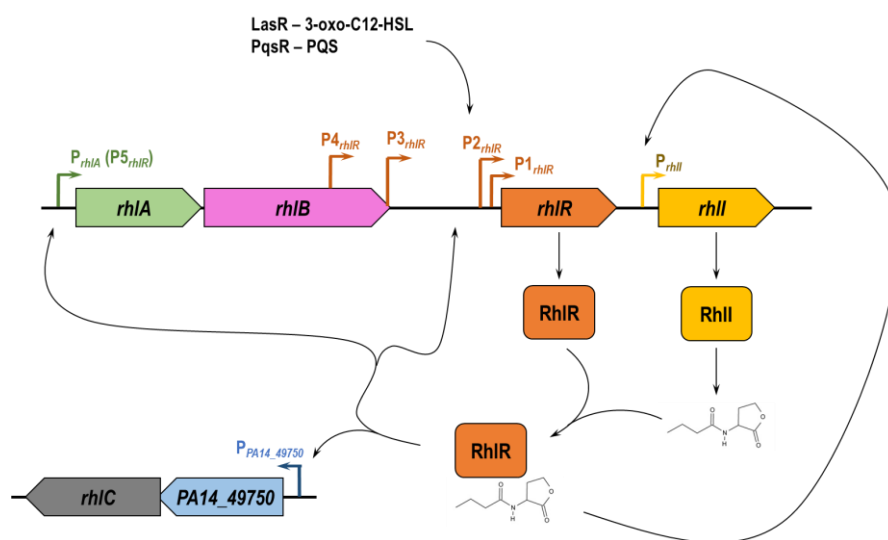
### I.2. Ramnolípidos. Composición química, vía de biosíntesis y aplicaciones en la industria

Uno de estos metabolitos secundarios producidos por *P. aeruginosa* con alto potencial biotecnológico son los ramnolípidos (RL), los cuales son glicolípidos biosurfactantes compuestos por un dímero de (*R*)-3-hidroxiácidos grasos denominado ácido 3-(3-hidroxi)alcanoilo)alcanoico (HAA); éstos se encuentran unidos mediante un enlace glicosídico a una o dos moléculas de (*L*)-ramnosa [Soberón-Chávez *et al.*, 2005]. En *P. aeruginosa*, las cadenas de acilo que constituyen a los HAA tienen una longitud de diez átomos de carbono ( $C_{10}$ ). Si los HAA están asociados a una molécula de ramnosa, se denominan mono-ramnolípidos (mono-RL); y si están unidas a dos moléculas de ramnosa, se denominan di-ramnolípidos (di-RL). Las dos principales variedades químicas de RL que sintetiza *P. aeruginosa* son el ramnosil-3-hidroxi)decanoil-3-hidroxi)decanoato (Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$ ) y ramnosil-ramnosil-3-hidroxi)decanoil-3-hidroxi)decanoato (Rha-Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$ ). La mayoría de cepas de *P. aeruginosa* producen tanto mono-RL como di-RL aunque, de manera natural, existen algunas otras cepas que únicamente producen mono-RL (Figura 1).



**Figura 1. a & b.** Estructuras químicas de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*: di-RL (a) y mono-RL (b). **c.** Estructura química de 3-(3-hidroxi)alcanoilo)alcanoatos (HAAs) [tomado de Filloux & Ramos, 2014].

Estos biosurfactantes fueron descubiertos en 1949 [Jarvis & Johnson, 1949], originalmente descubiertos en *P. aeruginosa*, y participan en múltiples procesos importantes para su supervivencia en los microambientes que coloniza. Aunque los RL fueron descubiertos en *P. aeruginosa*, existen reportes que estos biosurfactantes son producidos por otras especies de bacterias del género *Pseudomonas* (e.g. *Pseudomonas chlororaphis*) y en bacterias del género *Burkholderia*. En esta bacteria, los RL contribuyen de manera importante para el desplazamiento de *P. aeruginosa*. También ayudan a la asimilación de nutrientes que no son solubles en agua, como los aceites, o incluso diversos componentes de petróleo o hidrocarburos. Debido a su propiedad de solubilizar grasas, los RL son considerados también como antimicrobianos de amplio espectro ya que afectan la composición de las membranas celulares de otras bacterias u hongos presentes en el mismo microambiente de *P. aeruginosa*, constituyendo así un mecanismo de defensa natural y eficaz de esta bacteria contra otras poblaciones microbianas. De manera interesante, *P. aeruginosa* es inmune contra la acción de los ramnolípidos que produce. Aunque no se conoce con certeza el mecanismo por el cual *P. aeruginosa* puede producir y tolerar una cantidad considerable de RL, se ha propuesto que la composición de la membrana citoplásmica de esta bacteria puede tener un papel importante en la tolerancia de ésta ante la acción surfactante de los RL. Sin embargo, se continúan realizando estudios para lograr sustentar esa hipótesis. Los primeros usos industriales de los ramnolípidos han sido inspirados en estas formas en las que *P. aeruginosa* utiliza estos biosurfactantes en su beneficio. Asimismo, se ha propuesto que, a ciertas concentraciones, los RL pueden ser utilizados como nutrientes para la misma *P. aeruginosa* o para otros microorganismos. Debido a esta última característica, los RL son considerados altamente biodegradables, contrario a los surfactantes sintéticos usados ampliamente en muchos productos comerciales. Para la biosíntesis de RL, es esencial la expresión de tres genes: *rhIA*, *rhIB* y *rhIC* [Soberón-Chávez *et al.*, 2005]; éstos se encuentran regulados a nivel transcripcional por el sistema QS. Aunque la biosíntesis de RL es concertada junto con otros genes controlados también por una red de regulación muy compleja, los genes *rhIA*, *rhIB* y *rhIC* se encuentran directamente regulados positivamente por el regulador transcripcional RhIR al interactuar con el autoinductor butiril-homoserinlactona (C4-HSL), el cual induce la expresión de estos genes a partir de la fase exponencial tardía o estacionaria temprana del crecimiento. Dentro de este sistema QS, el regulador RhIR forma circuitos de regulación positiva al inducir su propia inducción sobre el gen *rhIR*, y también al inducir la expresión de los genes *rhIA* y *rhIB* (Figura 2).



**Figura 2.** Regulación de los genes *rhIA*, *rhIB* y *rhIC*, esenciales para la biosíntesis de RL en *P. aeruginosa*. Aunque la biosíntesis de estos genes forma parte de una red de regulación en la que participan otros sistemas QS (sistemas *las* y *PQS*), la biosíntesis de RL se encuentra directamente controlada por el regulador transcripcional RhIR.

Otro metabolito secundario producido por *P. aeruginosa* es un biopolímero denominado polihidroxiclcanoato (PHA), el cual es constituido por subunidades de (*R*)-3 hidroxiácidos grasos [Timm & Steinbüchel, 1992]. Así como en los RL, las cadenas de acilo que componen al PHA tienen una longitud de diez átomos de carbono. Estudios previos han demostrado que la biosíntesis tanto de RL como de PHA se realiza de manera simultánea [Choi *et al.*, 2011] y que también existe una estrecha relación a nivel metabólico en la biosíntesis de estos dos metabolitos (Figura 3).

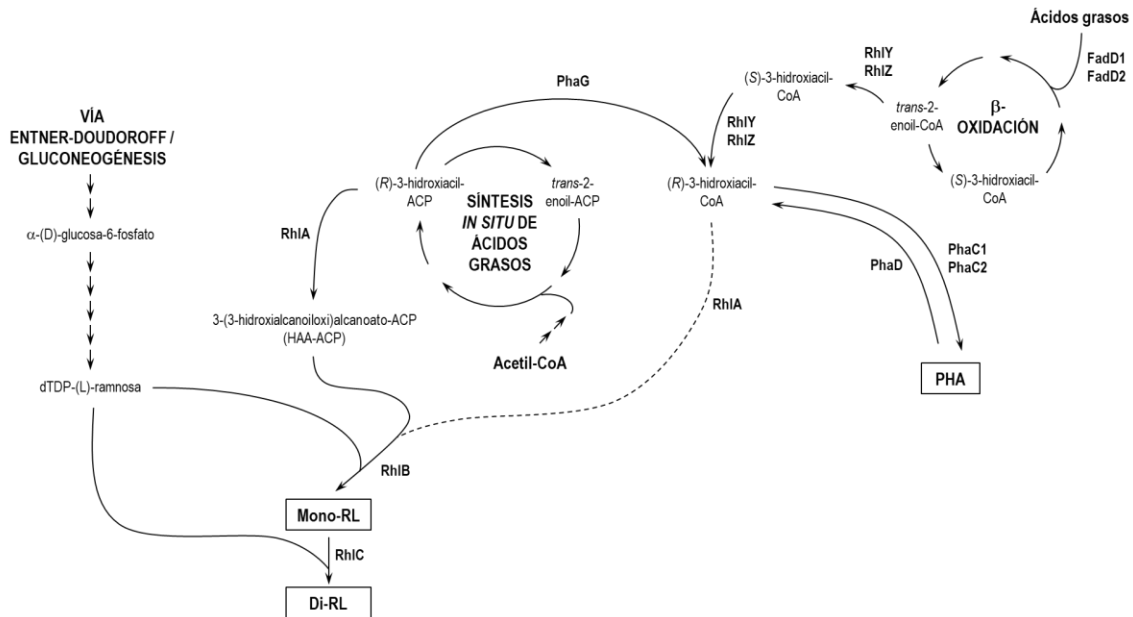


Figura 3. Vía de biosíntesis de RL y PHA en *P. aeruginosa*. La línea punteada indica una actividad enzimática sugerida, pero no demostrada.

La actividad surfactante de los RL les permite ser utilizados como componente activo principal en productos que facilitan la interacción entre dos sustancias con solubilidad diferente. La aplicación de estos surfactantes abarca muchos campos de la industria (Figura 4), como la cosmética, biorremediación, alimenticia, agrícola, e incluso, nanotecnología [Chong & Li, 2017].

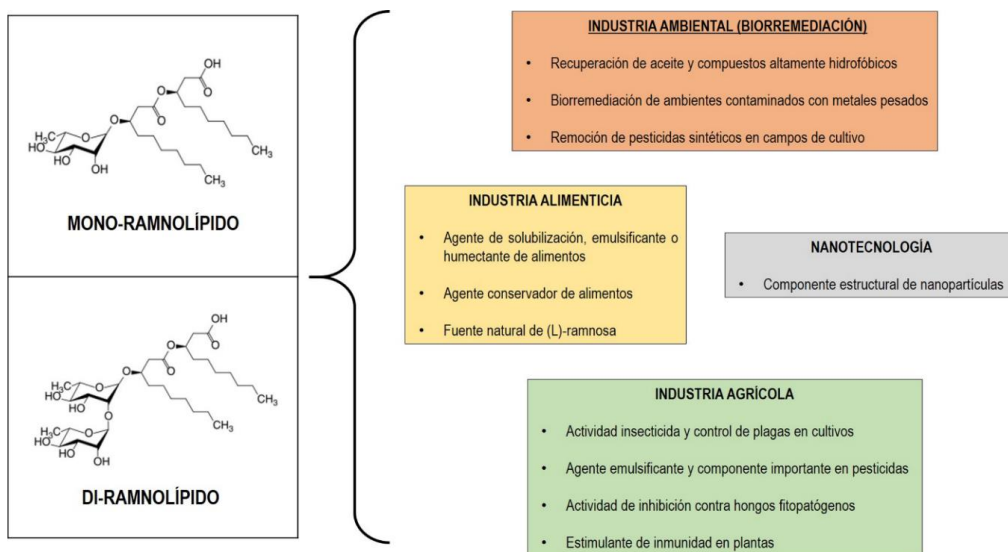


Figura 4. Algunos ejemplos de las diversas aplicaciones de los RL en la industria.

Como muchos productos actuales, los surfactantes más ampliamente utilizados en la industria son sintéticos. Aunque tienen casi 70 años de su descubrimiento, los avances en el conocimiento de la bacteria *P. aeruginosa* y la forma en que ésta produce los RL, han permitido que éstos últimos sean considerados como alternativa biotecnológica desde hace dos décadas aproximadamente. Sin embargo, las posibilidades de su uso se han incrementado considerablemente, siendo la industria de la biorremediación el primer rubro en el que han sido utilizados de manera exitosa. La recuperación de aceites y el tratamiento de ambientes contaminados con petróleo (o derivados) y metales pesados (principalmente plomo, cadmio y mercurio) son algunos de los más importantes usos en los que se han empleado los RL. De manera general, se ha propuesto que estos biosurfactantes participan en la desorción de metales pesados del suelo o de aguas contaminadas mediante la formación de complejos al modificar la tensión superficial del agua. Esto altera la solubilidad del agua de manera significativa, ocasionando que los metales pesados puedan ser removidos de la solución acuosa e interaccionen con los RL presentes [Elouzi *et al.*, 2012]. Asimismo, han comenzado a ser utilizados con éxito en la remoción de pesticidas de alta toxicidad dentro de campos de cultivo. Debido a que los RL también poseen actividad antimicrobiana, éstos se han aplicado como inhibidores contra hongos fitopatógenos o plagas de insectos que afectan gravemente a cultivos de importancia agrícola. De hecho, en el mes de marzo de 2004, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) determinó que los RL podrían ser utilizados como agentes fungicidas y biopesticidas, en virtud de que estos biosurfactantes presentan nulo riesgo toxicológico y mutagénico. Se ha demostrado también que su actividad antimicrobiana puede ser utilizada con éxito en la industria alimenticia como conservador y como agente emulsificante de alimentos. En otros rubros, incluso se ha propuesto que los RL pueden ser utilizados como componentes de nanopartículas que requieren la formación de “membranas artificiales” para transporte.

Hasta el momento, los RL son obtenidos exclusivamente mediante el uso de microorganismos en procesos de fermentación. Si bien estos biosurfactantes fueron descubiertos por primera vez en *P. aeruginosa*, diversos grupos de investigación han producido con éxito estos biosurfactantes en otros microorganismos como *Escherichia coli* y otras bacterias del género *Pseudomonas*; sin embargo, es un hecho que *P. aeruginosa* sigue siendo el mejor productor de RL totales reportado hasta el momento, obteniendo el mayor título de RL en una cepa *P. aeruginosa* PAO1. Aunque, a pesar del título considerable de RL que puede producir, esta cepa está considerada como altamente virulenta [Gellatly & Hancock, 2013]. Así pues, es necesario contar con bacterias no patógenas que puedan producir altos niveles de RL para lograr que estos biosurfactantes amplíen su mercado.

Debido a que aún es relativamente costoso producir estos biosurfactantes, algunos grupos de investigación se han dedicado a modificar genéticamente bacterias para incrementar la producción de RL, y otros grupos se han enfocado en optimizar el proceso de producción en la industria y así disminuir el costo de producción y venta de RL en el mercado. Con los avances que se han logrado en la optimización del proceso de obtención y purificación de estos biosurfactantes, es posible hacer una perspectiva de uso para reemplazar paulatinamente los surfactantes sintéticos ampliamente utilizados en el mercado (por ejemplo, los detergentes) con productos comerciales hechos a base de RL de origen microbiano y biodegradables.

### **I.3. Factores de virulencia de *P. aeruginosa***

La bacteria *P. aeruginosa* está considerada como un microorganismo patógeno oportunista, el cual es aislado en numerosas muestras clínicas. En muchas ocasiones, esta bacteria es agente etiológico de numerosas infecciones nosocomiales

que pueden llegar a ser mortales incluso con el tratamiento y antibióticos adecuados. Esta bacteria produce una gran variedad de metabolitos, muchos de ellos considerados como factores de virulencia. Muchos grupos de investigación se han enfocado en tres tipos de determinantes de virulencia: metabolitos regulados por QS, toxinas del sistema de secreción tipo III (T3SS) y la producción de lipopolisacárido (LPS) antígeno-O. Este último es un lipopolisacárido variable que recubre la membrana externa de muchas bacterias, incluida *P. aeruginosa*, y protege de la lisis mediada por complemento. [Hauser, 2011]. Además de estos factores de virulencia, es relevante mencionar que la bacteria *P. aeruginosa* es un microorganismo resistente natural a una gran variedad de antibióticos, debido a la gran cantidad de transportadores que tiene para expulsar a éstos y a la presencia de elementos genéticos móviles con genes de resistencia para modificación y/o degradación de antibióticos.

La red de regulación QS se compone por los sistemas *las*, *rhl* y PQS. Éstos controlan de manera coordinada la biosíntesis de muchos metabolitos en respuesta a la densidad poblacional presente en el microhábitat de colonización. Algunos de los principales factores de virulencia que son producidos mediante QS son elastasa, lectina, ácido cianhídrico, piocianina y ramnolípidos. La elastasa (conocida también como LasB) es una metaloproteasa que hidroliza la elastina presente en las uniones del tejido epitelial respiratorio. La piocianina es un compuesto poliaromático de color azul considerado como un agente poderoso de óxido-reducción [Kipnis *et al.*, 2006]. La lectina (denominada LecA) es una adhesina que participa en el reconocimiento y adhesión a células epiteliales o endoteliales mediante la identificación de ligandos constituidos por galactosa, facilitando así la adherencia bacteriana [Kirkeby *et al.*, 2006].

El sistema de secreción tipo III (T3SS) es un mecanismo mediante el cual la bacteria *P. aeruginosa* introduce un conjunto de toxinas directamente al citoplasma de células eucariontes. Este sistema está compuesto por más de 40 proteínas que participan en la producción y secreción de cuatro toxinas: ExoS, ExoT, ExoY y ExoU. Las toxinas ExoS y ExoT son activadores de GTPasa y ADP-ribosiltransferasa; participan en la disrupción del citoesqueleto de actina en células eucariontes, así como en la inhibición de biosíntesis de DNA, tráfico vesicular y endocitosis, finalmente provocando muerte celular. La toxina ExoU es una potente fosfolipasa que compromete en poco tiempo (1 – 2 horas) la integridad de la membrana citoplásmica eucarionte. Finalmente, la toxina ExoY es una adenilil ciclasa que promueve el incremento de cAMP intracelular, provocando la disrupción del citoesqueleto de actina y el incremento de la permeabilidad endotelial. En dos cepas tipo conocidas de *P. aeruginosa* se ha detectado que la cepa tipo PAO1 produce las toxinas ExoS, ExoT y ExoY; mientras que la cepa tipo PA14 produce ExoT, ExoU y ExoY [Hauser, 2009].

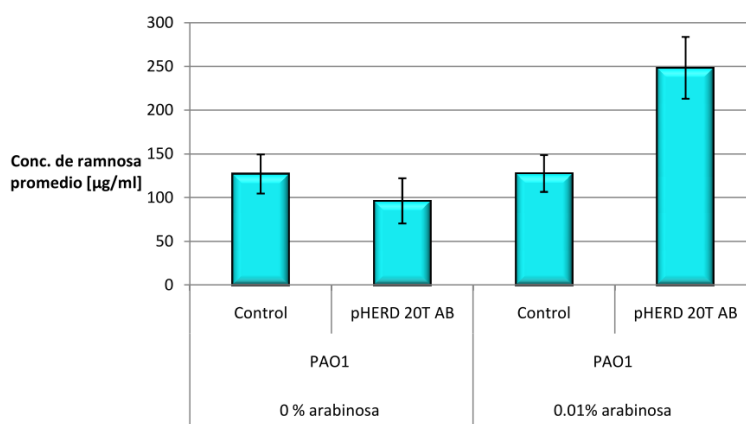
## II. ANTECEDENTES

Con la finalidad de incrementar el título de ramnolípidos (RL) en cepas de *Pseudomonas* spp., se han realizado estudios y modificaciones en la vía metabólica de biosíntesis. Hay que considerar también que el empleo de diferentes condiciones de cultivo y fuentes de carbono ocasiona una gran variabilidad de los títulos reportados en estos diferentes estudios. Un estudio realizado por Solaiman *et al.* (2013) planteó la utilización de una cepa de *Pseudomonas chlororaphis* para la sobreproducción de RL inactivando el gen *phaG* y así disminuir la producción de PHA. Sin embargo, no se observó un incremento significativo en la producción de RL, obteniendo para esta cepa un título de ramnolípidos de 0.87 g L<sup>-1</sup>, mientras que en la cepa parental de *P. chlororaphis* se obtuvo 0.70 g L<sup>-1</sup>.

Así como se ha estudiado el efecto de la eliminación del gen *phaG* sobre la producción de RL, también se han publicado algunos trabajos sobre el posible efecto de los genes *phaC1* y *phaC2* en la producción de RL. En un estudio de Pham *et al.*

(2014), fue evaluada la producción de RL en una cepa de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta phaC1-Z-C2$ , la cual tiene una delección cromosomal de los genes *phaC1*, *phaZ* y *phaC2*, sin embargo observaron que el título de ramnolípidos en ésta ( $58.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) disminuyó ligeramente con respecto a una cepa PAO1 ( $77.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en las mismas condiciones de cultivo. En un estudio de producción heteróloga de ramnolípidos en *Pseudomonas putida*, Wittgens *et al.* (2011) observaron que al inactivar solamente el gen *phaC1* en una cepa de *P. putida*, y junto con la expresión heteróloga de los genes *rhlA* y *rhlB* de *P. aeruginosa*, se obtiene un incremento de siete veces el título de RL ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ) comparado con la misma cepa expresando los genes *rhlA* y *rhlB* pero sin la inactivación de *phaC1* ( $0.35 \text{ g L}^{-1}$ ).

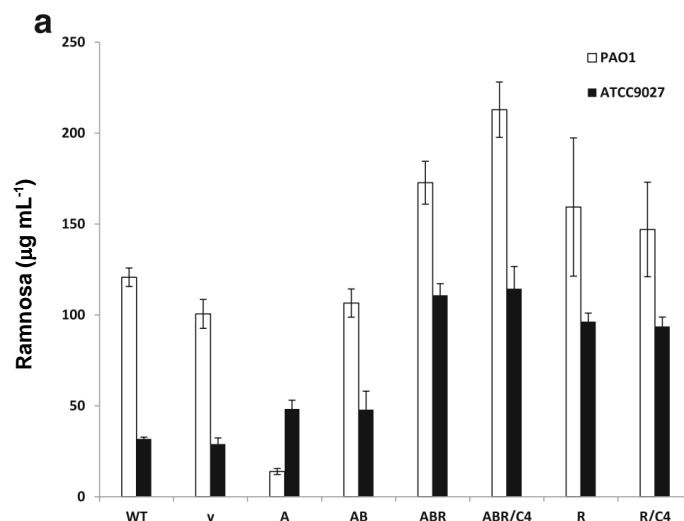
Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios en los que se expresan los genes *rhlA* y *rhlB* en *trans* mediante un vector transformado en *P. aeruginosa* [Tejeda-Díaz V, 2012; Hernández-Garrido D, 2012]. En estos estudios, se utilizó el vector de expresión pHERD20T para expresar, en primer lugar, el gen *rhlA*, y posteriormente tanto *rhlA* como *rhlB*; En estos experimentos, los genes *rhlA* y *rhlAB* fueron clonados bajo el promotor P<sub>BAD</sub>, induciendo la expresión de éstos con la adición de arabinosa. El mayor título de ramnolípidos fue obtenido con la expresión de ambos genes, denominando a este plásmido pHERD20T-*rhlAB*, obteniendo un incremento de, aproximadamente, 100% de ramnolípidos con respecto a la cepa parental (Figura 5).



**Figura 5.** Producción de ramnolípidos en cepa de *P. aeruginosa* PAO1 con expresión en trans del operón *rhlAB* de *P. aeruginosa* en vector de expresión pHERD20T-*rhlAB*.

Recientemente fue evaluada la producción de ramnolípidos en cepas de *P. aeruginosa* ATCC9027 y PAO1 [Grosso-Becerra *et al.*, 2016] en la cual se expresaron los genes *rhlA*, *rhlAB* y *rhlAB-R*; en este último caso también fue adicionado el autoinductor C4-HSL. Tanto en la cepa ATCC9027 como en la cepa PAO1 el mayor título de ramnolípidos fue obtenido con la expresión de los genes *rhlAB-R*, con  $110 \mu\text{g mL}^{-1}$  para la cepa ATCC9027 y  $212 \mu\text{g mL}^{-1}$  para la cepa PAO1 con C4-HSL. En estos casos, los genes *rhlAB-R* fueron clonados con sus promotores nativos cromosomales (Figura 6).





**Figura 6.** Producción de RL en cepas PAO1 y ATCC9027. La unidad transcripcional de los genes *rhlAB* y *rhlAB-R*, así como los genes *rhlA* y *rhlR*, fueron sobreexpresados en el vector pUCP24 con sus promotores nativos cromosomales. **v.** Cepas con pUCP24. **A.** Cepas con construcción pUCP24/*rhlA*. **AB.** Cepas con construcción pUCP24/*rhlAB*. **ABR.** Cepas con construcción pUCP24/*rhlAB-R*. **ABR/C4.** Cepas con construcción pUCP24/*rhlAB-R*, adicionada con autoinductor 10 mM C4-HSL. **R.** Cepas con construcción pUCP24/*rhlR*. **R/C4.** Cepas con construcción pUCP24/*R*, adicionada con autoinductor 10 mM C4-HSL.

La producción de RL también se ha explorado en modelos biológicos ajenos a bacterias del género *Pseudomonas*. Utilizando cepas de *E. coli* [Cabrera-Valladares *et al.*, 2006] o *Burkholderia kururiensis* [Tavares *et al.*, 2013], se han producido con éxito RL, obteniendo títulos de 0.12 g L<sup>-1</sup> y 7.4 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Al realizar una comparación entre las cepas bacterianas productoras de RL reportadas hasta el momento, la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 es la máxima productora de RL – 36.7 g L<sup>-1</sup>, con aceite de girasol al 2.5% como fuente de carbono [Müller *et al.*, 2011].

### III. JUSTIFICACIÓN

Los ramnolípidos (RL) son biosurfactantes de importancia biotecnológica sintetizados por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con múltiples aplicaciones potenciales en la industria. La biosíntesis de éstos se encuentra regulada mediante el sistema sensor de quórum (QS), por lo que está relacionada también con la síntesis de factores de virulencia. Debido a esto, es de gran relevancia obtener cepas de *P. aeruginosa* carentes de sus principales factores de virulencia para facilitar su manipulación en la industria biotecnológica.

Por otro lado, la presencia de un intermediario común en la vía de biosíntesis tanto de polihidroxialcanoatos (PHA) como de RL plantea una problemática importante para la optimización del proceso de producción de éstos últimos. De tal manera que resultaría interesante explorar algunas estrategias de ingeniería de vías metabólicas que permitan abatir la producción de PHA y dirigir el flujo metabólico hacia la producción de RL.

### IV. HIPÓTESIS

La inactivación de los genes que codifican para los principales factores de virulencia producidos por el sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* permitirá obtener cepas con virulencia atenuada para manipulación y aplicación biotecnológica. Asimismo, la inactivación de genes involucrados en la biosíntesis de PHA junto con la expresión en *trans* de los operones *rhlAB* o *rhlAB-R* permitirá la construcción de cepas sobreproductoras de ramnolípidos.

## V. OBJETIVOS

### V.1. Objetivo general

Obtener cepas de *P. aeruginosa* PA14 carentes de sus principales factores de virulencia con una producción aumentada de ramnolípidos (RL)

### V.2. Objetivos particulares

- Abatir la competencia metabólica sobre la proteína RhlA mediante la generación de una mutante *phaG*<sup>-</sup>
- Bloquear la producción de PHA mediante la generación de una mutante *phaCI*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup>
- Dirigir el flujo metabólico a la producción de RL con la sobreexpresión en *trans* de los operones *rhlAB* o *rhlAB-R*
- Bloquear la secreción de toxinas asociadas al sistema de secreción tipo III (T3SS)
- Verificar la atenuación de la virulencia en modelo biológico *in vitro* e *in vivo*

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan a continuación en la Tabla 1, destacando algunas de sus características relevantes. Las cepas fueron cultivadas a 37 °C en condiciones aerobias, a una velocidad de agitación constante de 250 rpm. Para manipulación de DNA y pre-cultivos, las cepas fueron cultivadas en medio LB. Para la recombinación sitio-específica mediada por la recombinasa *FLP*, las cepas fueron cultivadas a 42 °C. Para la eliminación de plásmidos con el gen *sacB*, las cepas fueron cultivadas en medio LB sin NaCl (LB-NaCl) con sacarosa al 10%. Cuando fue necesaria la selección con antibiótico, para *E. coli* fue utilizado apramicina (50 µg/mL), carbenicilina (100 µg/mL) y gentamicina (30 µg/mL). En el caso de *P. aeruginosa*, los antibióticos empleados fueron carbenicilina (200 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL) y apramicina (100 µg/mL). Para la producción de RL y PHA, las cepas fueron cultivadas en medio PPGAS [Zhang & Miller, 1992] utilizando glucosa como principal fuente de carbono a una concentración de 2 g/L. Para las construcciones derivadas del vector pHERD20T, se utilizó 0.2% de arabinosa como inductor de la expresión génica.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas/Plásmidos	Características relevantes	Referencia
<b>Cepas</b>		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 [r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>]</i> <i>supE44 thi-1 gyrA relA1</i>	Invitrogen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Protótrofa	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PA14	Protótrofa	Liberati <i>et al.</i> , 2006
ATCC9027	Protótrofa	American Type Culture Collection
PA14 <i>phaCI</i> <sup>-</sup>	<i>ΔphaCI::MAR2xT7</i>	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA14 <i>phaCI</i> <sup>-</sup> <i>phaC2</i> <sup>-</sup>	<i>phaCI</i> <sup>-</sup> (proteína PhaC1 no funcional, mutaciones P426A y A551T) <i>ΔphaC2::MAR2xT7</i>	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA14 <i>phaG</i> <sup>-</sup> <i>phaCI</i> <sup>-</sup> <i>phaC2</i> <sup>-</sup>	<i>ΔphaG::FRT-aac(3)IV-FRT phaCI</i> <sup>-</sup> <i>ΔphaC2::MAR2xT7</i>	Este trabajo
PA14 <i>rhlA</i> <sup>-</sup>	<i>ΔrhlA::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	Este trabajo
PA14 <i>phaG</i> <sup>-</sup>	<i>ΔphaG::FRT-aac(3)IV-FRT</i>	Este trabajo

PA14 <i>rhlA</i> <sup>-</sup> <i>phaG</i>	$\Delta rhlA::FRT \Delta phaG::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
PA14 <i>rhlY</i> <i>rhlZ</i>	$\Delta rhlYZ::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
PA14 <i>rhlY</i> <i>rhlZ</i> <i>phaG</i>	$\Delta rhlYZ::FRT \Delta phaG::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
PA14 11990 <sup>-</sup>	$\Delta PA14\_11990::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
PA14 <i>fadD1</i> <sup>-</sup> <i>fadD2</i> <sup>-</sup>	$\Delta fadD1D2::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
PA14 <i>pscD</i> <sup>-</sup>	$\Delta pscD::MAR2xT7$	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA14 <i>phaG</i> <i>phaC1</i> <sup>-</sup> <i>phaC2</i> <sup>-</sup> <i>pscC</i>	$\Delta phaG::FRT phaC1\Delta phaC2::MAR2xT7 \Delta pscC::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
PA14 <i>phaG</i> <i>phaC1</i> <sup>-</sup> <i>phaC2</i> <sup>-</sup> <i>pscC</i> <i>rhlC</i> <sup>-</sup>	$\Delta phaG::FRT phaC1\Delta phaC2::MAR2xT7 \Delta pscC::FRT \Delta rhlC::FRT-aac(3)IV-FRT$	Este trabajo
GUG1	PA14 $\Delta phaG::FRT phaC1\Delta phaC2::MAR2xT7 \Delta pscC::FRT-aac(3)IV-FRT$ + pUCP20- <i>rhlABR</i>	Este trabajo
GUG2	PA14 $\Delta phaG::FRT phaC1\Delta phaC2::MAR2xT7 \Delta pscC::FRT \Delta rhlC::FRT-aac(3)IV-FRT$ + pUCP20- <i>rhlABR</i>	Este trabajo
<b>Plásmidos</b>		
pEX18Ap	Vector para reemplazo de genes. <i>bla</i> (Cb <sup>R</sup> ) <i>oriT</i> <i>sacB</i>	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pFLP2	<i>sacB</i> <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ), represor $\lambda$ <i>cl</i> <sub>857</sub> , recombinasa <i>FLP</i>	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pIJ773	<i>FRT-aac(3)IV-FRT</i> (Apr <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> ) <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> Cb <sup>R</sup> ) <i>oriT</i> <sup>+</sup>	Gust <i>et al.</i> , 2003
pUCP18-RedS	<i>sacB</i> <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> Cb <sup>R</sup> ) $\lambda$ Red ( <i>gam</i> <i>bet</i> <i>exo</i> )	Lesic & Rahme, 2008
pUCP20	<i>ori</i> <sub>pUC18</sub> <i>ori</i> <sub>pRO1614</sub> <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> Cb <sup>R</sup> )	West <i>et al.</i> , 1994
pUCP24	<i>ori</i> <sub>pUC18</sub> <i>ori</i> <sub>pRO1614</sub> <i>aacC1</i> (Gm <sup>R</sup> )	West <i>et al.</i> , 1994
pHERD20T	<i>ori</i> <sub>pBR322</sub> <i>ori</i> <sub>pRO1600</sub> <i>oriT</i> P <sub>BAD</sub> <i>araC</i> <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> Cb <sup>R</sup> )	Qiu <i>et al.</i> , 2008
pUCP20- <i>phaC1</i> <sub>m</sub>	Vector pUCP20 con unidad transcripcional del gen <i>phaC1</i> proveniente de la mutante PA14 <i>phaC1</i> <sup>-</sup> <i>phaC2</i> <sup>-</sup>	Este trabajo
pUCP20- <i>phaC1</i> <sub>wt</sub>	Vector pUCP20 con unidad transcripcional del gen <i>phaC1</i> proveniente de la cepa PA14	Este trabajo
pUCP24- <i>rhlAB</i>	Vector pUCP24 con unidades transcripcionales de genes (operón) <i>rhlAB</i>	Grosso-Becerra <i>et al.</i> , 2016
pUCP24- <i>rhlABR</i>	Vector pUCP24 con unidades transcripcionales de genes (operón) <i>rhlAB-R</i>	Grosso-Becerra <i>et al.</i> , 2016
pUCP20- <i>rhlAB</i>	Vector pUCP20 con unidades transcripcionales de genes (operón) <i>rhlAB</i>	Este trabajo
pUCP20- <i>rhlABR</i>	Vector pUCP20 con unidades transcripcionales de genes (operón) <i>rhlAB-R</i>	Este trabajo
pHERD20T- <i>rhlAB</i>	Vector pHERD20T con operón <i>rhlAB</i> , incluyendo solamente genes estructurales y sitios de unión a ribosoma de ambos genes	Hernández-Garrido D, 2012
pHERD20T- <i>rhlA</i>	Vector pHERD20T con gen estructural <i>rhlA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Tejeda-Díaz V, 2012
pHERD20T- <i>phaG</i>	Vector pHERD20T con gen estructural <i>phaG</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este trabajo
pHERD20T-PA14_11990	Vector pHERD20T con gen estructural PA14_11990 de <i>P. aeruginosa</i>	Este trabajo
pUCP20- <i>fadD1</i>	Vector pUCP20 con unidad transcripcional de gen <i>fadD1</i>	Este trabajo
pUCP20- <i>fadD2</i>	Vector pUCP20 con unidad transcripcional de gen <i>fadD2</i>	Este trabajo

## VI.2. Manipulación de DNA

El procedimiento de manipulación de material genético y electroporación fue realizado conforme a lo reportado por Sambrook *et al.* (1989) y Filloux & Ramos (2014). La extracción de DNA cromosómico fue realizada con el DNeasy® Blood & Tissue Kit, mientras que para la obtención de DNA plasmídico fue empleado el QIAprep® Spin Miniprep Kit; ambos kits desarrollados por la compañía Qiagen© realizando las extracciones de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR y bandas de agarosa fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la compañía Promega© siguiendo las instrucciones del fabricante.

## VI.3. Delección de genes cromosomales en *P. aeruginosa*

Para generar las mutaciones cromosomales, fueron utilizadas las metodologías de sistema de recombinación lambda Red reportada por Lesic & Rahme (2008) y el reemplazo de alelos por recombinación homóloga descrito por Hoang *et al.* (1998).

En nuestros experimentos fue empleado el gen *aac(3)IV*, obtenido del plásmido pIJ773 [Gust *et al.*, 2003], el cual está flanqueado por sitios *FRT* y confiere resistencia a apramicina y gentamicina.

#### **VI.4. Extracción, purificación y cuantificación de RL y PHA**

A partir de sobrenadantes de cultivos en medio PPGAS, los RL fueron obtenidos mediante extracción orgánica con éter etílico, seguido de una cuantificación mediante ensayo de orcinol [Chandrasekaran & Bemiller, 1980]. Las concentraciones de RL fueron determinadas como Grosso-Becerra *et al.* (2016), comparando los datos obtenidos con una curva estándar de concentración conocida de (L)-ramnosa de 0 a 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , expresándolas en  $\mu\text{g}_{\text{ramnosa}}$  por mililitro de cultivo. Los PHA fueron extraídos mediante digestión química con hipoclorito de sodio [Berger *et al.*, 1989]. La cuantificación de este polímero se realizó mediante una adaptación del método de hidrólisis de  $\beta$ -hidroxiácidos con ácido sulfúrico [Slepecky & Law, 1960], seguido por una determinación espectrofotométrica de las fracciones de ácidos grasos a 235 nm. La conversión de absorbancia hacia concentración de PHA, expresada en  $\mu\text{g/mL}$ , fue determinada experimentalmente utilizando una curva estándar con PHA de masa conocida disuelta en 1 mL de ácido sulfúrico. Cada experimento fue realizado por triplicado, mostrando los errores estándar obtenidos.

#### **VI.5. Detección por cromatografía en capa fina (TLC) y estimación semicuantitativa de mono- y di-RL**

A partir de los sobrenadantes de los cultivos en medio PPGAS, los RL fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1). La cromatografía fue realizada en una placa de sílica gel, utilizando una fase móvil de cloroformo-metanol-ácido acético (65:15:2). Después del corrimiento, la placa fue revelada con una solución de  $\alpha$ -naftol [Matsuyama *et al.*, 1987]. Para estimar la proporción entre mono- y di-RL para las cepas evaluadas, las placas de TLC obtenidas fueron digitalizadas y analizadas con el programa ImageJ.

#### **VI.6. Detección y análisis de toxinas ExoU y ExoT**

A partir de un cultivo crecido toda la noche, las cepas fueron reinoculadas para crecimiento en medio LB-MC suplementado con 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM EGTA para favorecer la inducción y expresión de los genes involucrados en el T3SS. Estos cultivos fueron incubados en agitación constante de 225 rpm a 37 °C, hasta alcanzar la fase crecimiento exponencial (aproximadamente en una  $\text{D.O.}_{600} = 1.0$ ), y en este punto fueron obtenidas las proteínas del sobrenadante de los cultivos. Éstas fueron separadas por una electroforesis con SDS en gel de 15% de poliacrilamida y posteriormente fue realizada una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-ExoU y anti-ExoS/anti-ExoT, y anticuerpos GAR (*goat anti-rabbit IgG*) acoplados a una peroxidasa de rábano como anticuerpos secundarios. La detección por Western blot se realizó mediante quimioluminiscencia con el kit Immobilon Western Chemilumine HRP Substrate (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **VI.7. Ensayos de citotoxicidad en células HeLa (ATCC® CCL-2™)**

Cultivos en monocapa de células HeLa (ATCC® CCL-2™) con una confluencia de 110 000 células por pozo fueron inoculados con cultivos de *P. aeruginosa* en fase de crecimiento exponencial (2 h de crecimiento a 37 °C en medio LB a partir

de una reinoculación de cultivo de toda la noche) a una multiplicidad de infección (MOI) de 20 y 50. La infección fue realizada en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), incubando a 37 °C en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> por 2 h y sin agitación. Posterior a la incubación, la infección fue detenida mediante la adición de PBS y las células viables fueron cuantificadas mediante tinción selectiva con 0.4% de azul tripano [Shapiro, 1988]. Los experimentos fueron realizados por triplicado, mostrando los errores estándar obtenidos.

#### **VI.8. Ensayos de infección en modelo de polilla de cera (*Galleria mellonella*)**

De manera similar a los ensayos de citotoxicidad, cada individuo de *G. mellonella* fue inoculado con 10 µL de una dilución de cultivos de *P. aeruginosa* en fase de crecimiento exponencial, siguiendo el procedimiento descrito por Filloux & Ramos (2014). La suspensión bacteriana fue realizada con 10 mM MgSO<sub>4</sub> como vehículo y diluyente. Posterior a la inoculación, los individuos permanecieron a 37 °C, realizando el seguimiento y conteo de sobrevivientes durante 24, 48 y 72 h posteriores a la infección. Se utilizaron como controles negativos la cepa ATCC9027 (cepa de *P. aeruginosa* avirulenta) y la cepa PA14 *pscD*<sup>-</sup> (cepa de *P. aeruginosa* con el sistema de secreción tipo III inactivo).

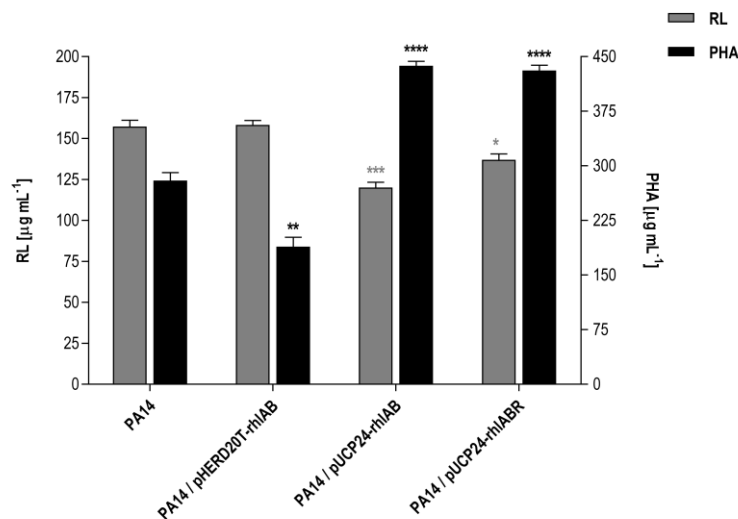
#### **VI.9. Ensayos de infección en modelo de ratón BALBc/AnNHsd**

Se realizaron experimentos con 5 ratones (en algunos casos se realizaron más de un experimento con algunas cepas por lo que se cuenta con resultados de un mayor número de ratones en estos casos) hembras BALBc/AnNHsd (Harlan IN, EUA) de 6 a 8 semanas de edad por cada dosis probada de una cepa. La inoculación de bacterias se realizó por vía intraperitoneal, utilizando 100 µL de agua estéril como vehículo y diluyente. Como control negativo se utilizó la cepa ATCC9027. Los ratones en grupos de 5 individuos fueron mantenidos durante el experimento en cajas con acceso libre de agua y alimento. Se realizó el monitoreo cada 24 horas durante 72 horas. El protocolo de estos experimentos fue aprobado por la Comité Para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **VII. RESULTADOS**

#### **VII.1. Efecto de la sobreexpresión de los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlR* sobre la producción de RL y PHA en la cepa de PA14**

Bajo nuestras condiciones de cultivo, la cepa *P. aeruginosa* PA14 produce un título de RL aproximado de 160 µg mL<sup>-1</sup>. La sobreexpresión en *trans* de los genes que participan en la biosíntesis de este biosurfactante (*rhlA* y *rhlB*) además del regulador positivo transcripcional *rhlR*, constituye una estrategia demostrada en otros trabajos que permite la dirección del flujo metabólico hacia la biosíntesis de RL. La cepa PA14 fue transformada con las construcciones pHERD20T-*rhlAB*, pUCP24-*rhlAB* y pUCP24-*rhlABR* para evaluar la producción de RL y PHA (Figura 7).

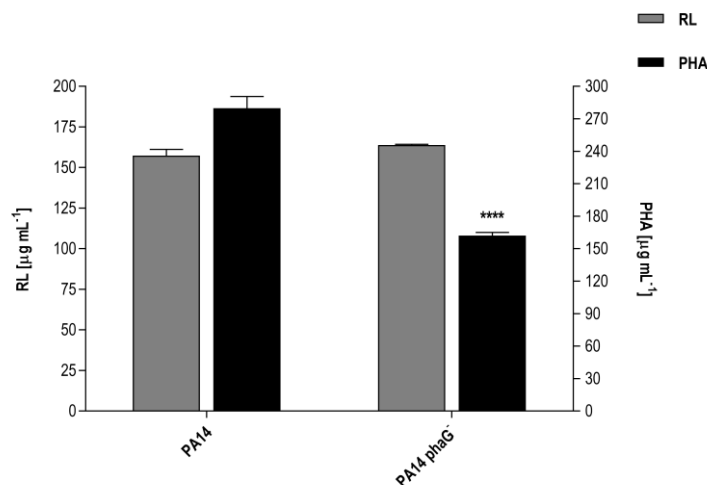


**Figura 7.** Efecto de la sobreexpresión de los operones *rhlAB* y *rhlAB-R* sobre la producción de RL y PHA en la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

Comparado con la cepa parental PA14, no hay un incremento en la producción de RL. Además, existe un incremento discreto en la producción de PHA en las construcciones pUCP24-*rhlAB* y pUCP24-*rhlABR*. De tal manera que la sobreexpresión de *rhlA*, *rhlB* y *rhlR* por sí misma no logra incrementar la producción de RL, y sí podría aumentar la producción de PHA. Debido a que, aparentemente, en la cepa PA14 se favorece más la producción de PHA, será necesario bloquear la vía de biosíntesis de éste para lograr dirigir el flujo de carbono hacia la biosíntesis de RL.

## VII.2. Generación y caracterización de cepa PA14 *phaG*<sup>-</sup>

De acuerdo a la vía metabólica para producción de PHA y RL en *P. aeruginosa*, la mutación del gen *phaG* podría disminuir de manera significativa la producción de PHA en la cepa PA14. Después de obtener esta mutante, fueron cuantificados los RL y PHA (Figura 8).



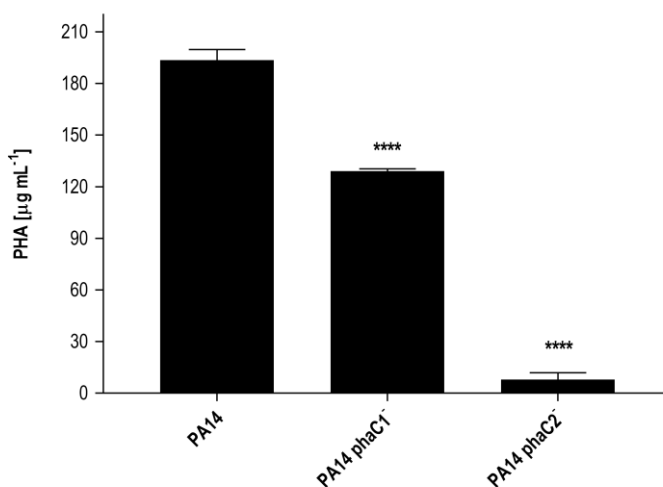
**Figura 8.** Efecto de la mutación del gen *phaG* sobre la producción de RL y PHA en la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

Si bien con la mutación del gen *phaG* la producción de PHA disminuyó de 275  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no se logró abatir completamente la producción. Este resultado sugiere que existe otra enzima que participa en la biosíntesis de PHA en ausencia de la transacilasa PhaG. De tal manera que, para lograr bloquear por completo la vía de biosíntesis de PHA, es necesario obtener una triple mutante *phaG phaC1 phaC2*, en la cual las PHA sintasas PhaC1/PhaC2 se encuentren inactivas.

### VII.3. Generación de cepa PA14 *phaG phaC1 phaC2*

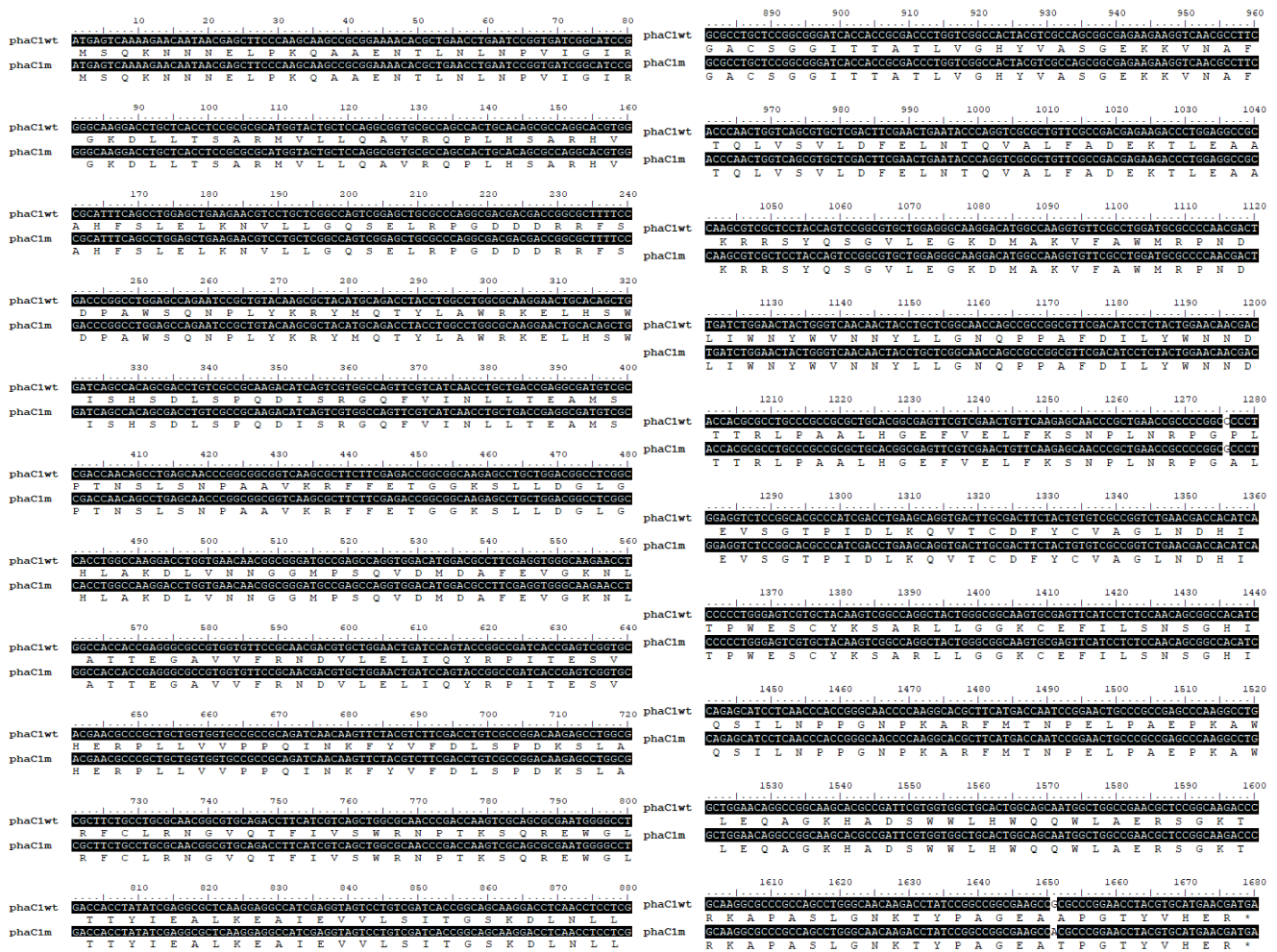
#### VII.3.1. Caracterización de cepa PA14 *phaC2*

En estudios previos en nuestro laboratorio se ha encontrado que, al cuantificar PHA en cepas mutantes PA14 *phaC1* y PA14 *phaC2*, ésta última no produce cantidades significativas de PHA (Figura 9). Este resultado derivó en dos hipótesis que pueden explicar este fenómeno: 1) la expresión del gen *phaC2* tiene un efecto sobre la expresión del gen *phaC1* en el genoma de *P. aeruginosa*, o 2) el producto de expresión del gen *phaC1* en esta cepa no es funcional.



**Figura 9.** Efecto de la mutación de los genes *phaC1* y *phaC2* sobre la producción de PHA en la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

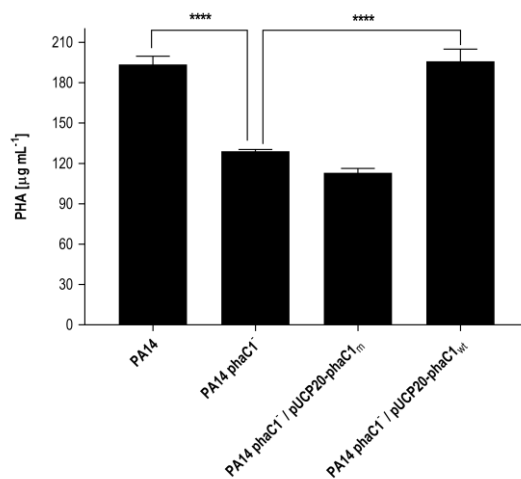
Para confirmar la funcionalidad del gen *phaC1*, se realizó la secuenciación de éste. Además, se realizó un alineamiento de esta secuencia con respecto al gen *phaC1*<sub>wt</sub> de la cepa PA14 para detectar las posibles diferencias entre estas secuencias. La secuenciación del gen *phaC1* se realizó considerando también la región 5'-UTR para detectar posibles cambios en el promotor de este gen (Figura 10).



**Figura 10.** Alineamiento de secuencia de nucleótidos de las secuencias *phaC1<sub>wt</sub>* (proveniente de la cepa PA14<sub>wt</sub>) y *phaC1<sub>m</sub>* (proveniente de la cepa PA14 *phaC2*), así como su traducción a proteínas. Los nucleótidos sombreados en color negro corresponden a 100% de identidad.

Dentro de las unidades transcripcionales secuenciadas de los genes *phaC1<sub>wt</sub>* y *phaC1<sub>m</sub>*, se encontraron dos mutaciones puntuales C → G y G → A. Como consecuencia de éstas, la proteína PhaC1<sub>m</sub> tiene dos aminoácidos modificados, comparados con la proteína PhaC1<sub>wt</sub>: P426A y A551T. De éstos, la mutación en el aminoácido prolina puede ser un factor determinante en la pérdida de la función de la proteína PhaC1<sub>m</sub>, debido a que interviene directamente en el plegamiento de la misma. Esto podría explicar que la cepa PA14 *phaC2* es, de hecho, cepa PA14 *phaC1 phaC2*. La delección del gen *phaC1* disminuye la producción de PHA aproximadamente un 60% comparada con su cepa parental PA14. Para comprobar que la proteína PhaC1<sub>m</sub> (la cual proviene de la cepa PA14 *phaC2*) no es funcional, se expresará en *trans* el gen *phaC1<sub>m</sub>* en una cepa PA14 *phaC1*. Si la funcionalidad de la proteína PhaC1<sub>m</sub> está comprometida, la concentración de PHA no se afectará.



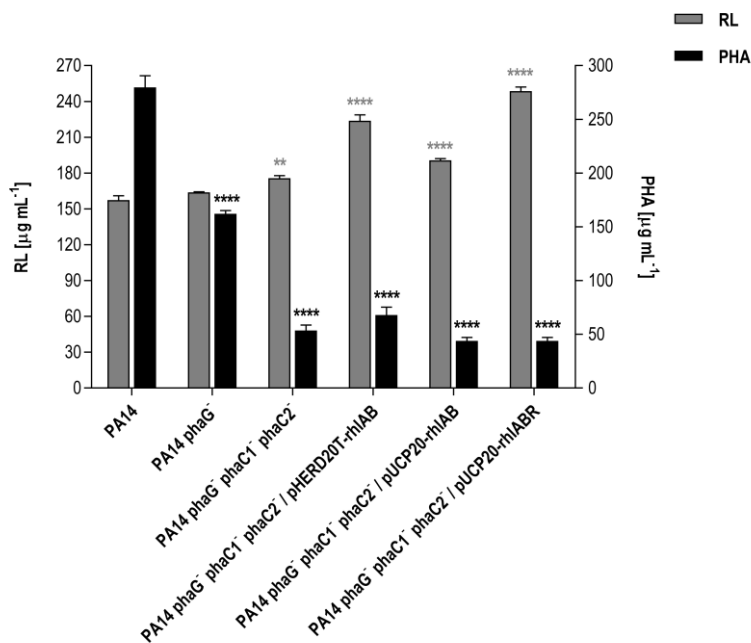


**Figura 2.** Efecto de la complementación con los genes *phaC1<sub>wt</sub>* y *phaC1<sub>m</sub>* sobre la producción de PHA en una cepa PA14 *phaC1<sup>-</sup>*. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), comparando los pares de cepas que están conectados con líneas. Los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

El título de PHA de la mutante PA14 *phaC1<sup>-</sup>* (120 µg mL<sup>-1</sup>) es muy similar a la misma mutante complementada con el gen *phaC1<sub>m</sub>*, contrario a la mutante complementada con *phaC1<sub>wt</sub>* en la que el título de PHA (190 µg mL<sup>-1</sup>) es muy similar a la cepa parental PA14. Por lo tanto, el producto del gen *phaC1<sub>m</sub>* no es funcional; de tal manera que la mutante PA14 *phaC2<sup>-</sup>* en realidad es PA14 *phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>*. Sobre esta cepa se realizó la mutación del gen *phaG* para bloquear completamente la vía de biosíntesis de PHA.

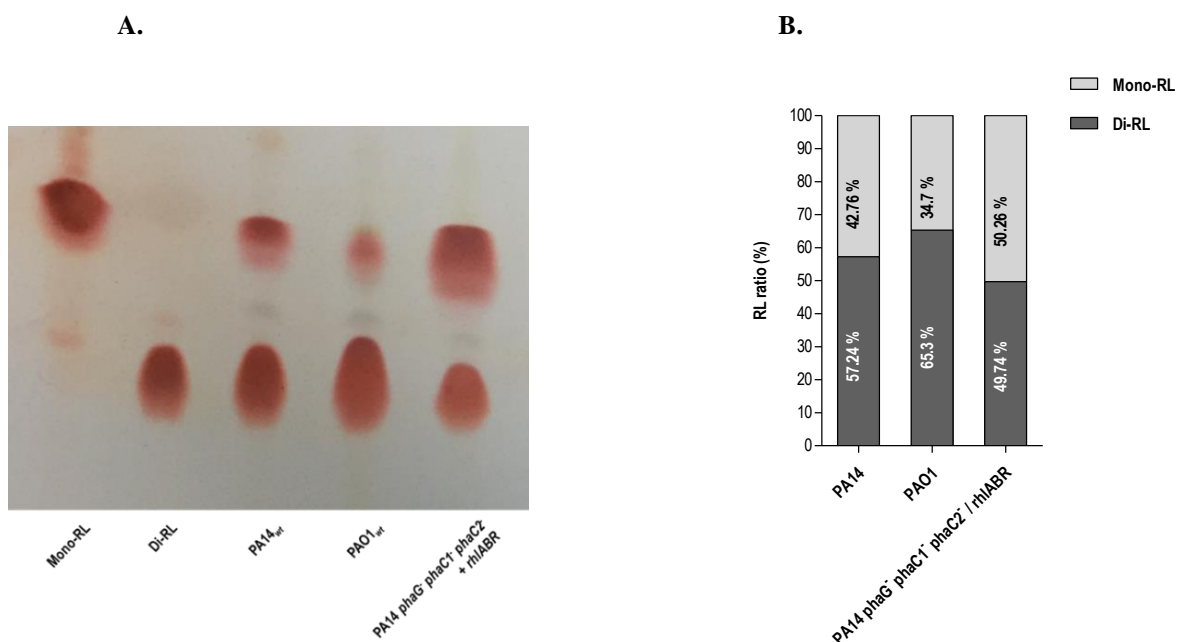
#### VII.4. Efecto de la sobreexpresión en *trans* de los operones *rhlAB* y *rhlAB-R* en la cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>*

La cepa PA14 *phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup> phaG<sup>-</sup>* tiene la vía de biosíntesis de PHA bloqueada. Sobre este fondo genético se realizará la sobreexpresión en *trans* de los operones *rhlAB* y *rhlAB-R*.



**Figura 3.** Producción de RL y PHA en cepas derivadas de PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* sobreexpresando los operones *rhlAB* y *rhlAB-R*. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

La mutación de los genes *phaG*, *phaC1* y *phaC2* resultó en la disminución significativa de la producción de PHA. Sin embargo, el bloqueo de la biosíntesis de éste no generó un incremento significativo en la producción de RL. El incremento en RL solamente se observa cuando se sobreexpresan en *trans* los operones *rhlAB* y *rhlAB-R*, y el máximo título obtenido representa un incremento del 60% con respecto a la cepa parental PA14. Con las construcciones pHERD20T-*rhlAB* y pUCP20-*rhlAB-R* se obtuvieron los mayores títulos de RL. Mientras que la expresión del plásmido pHERD20T-*rhlAB* requiere de la adición de arabinosa como inductor, el activador transcripcional RhIR induce la expresión del operón *rhlAB* en la construcción pUCP20-*rhlABR* en un circuito regulatorio de inducción [Croda-García *et al.*, 2011]. De tal manera que éste último fue elegido como el plásmido de sobreproducción. Para determinar los posibles cambios en la proporción de mono-RL y di-RL, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) con los RL sintetizados presentes en la cepa sobreproductora PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* / pUCP20-*rhlABR* (Figura 13).

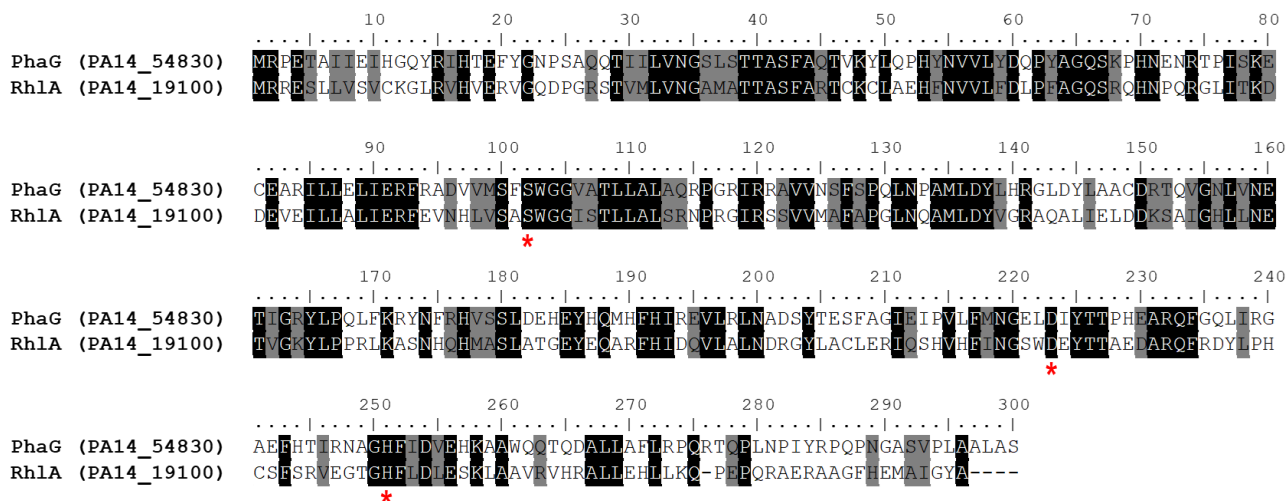


**Figura 4.** A. TLC de muestras de RL obtenidos de la cepa sobreproductora PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* / pUCP20-*rhlABR*. B. Estimación semicuantitativa, realizada mediante el software ImageJ, de la proporción de mono- y di-RL en las cepas PA14, PAO1 y PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* / pUCP20-*rhlABR*.

Previos estudios han demostrado que la proporción de RL en la cepa PAO1 corresponde a 1:3 para mono-RL:di-RL; mientras que la cepa PA14 se ha reportado que tiene una relación 1:2. De manera general, la TLC y la estimación semicuantitativa muestran una proporción muy cercana a las reportadas previamente para las cepas PAO1 y PA14. En la cepa sobreproductora PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* / pUCP20-*rhlABR* se incrementó ligeramente la producción de mono-RL con respecto a la cepa PA14, por lo que la proporción entre mono- y di-RL fue modificada a 1:1. Debido a que no se incrementó la producción de di-RL, el incremento de ramnosa (*i.e.* ramnolípidos totales) corresponde a un aumento real de ramnolípidos totales en la cepa sobreproductora.

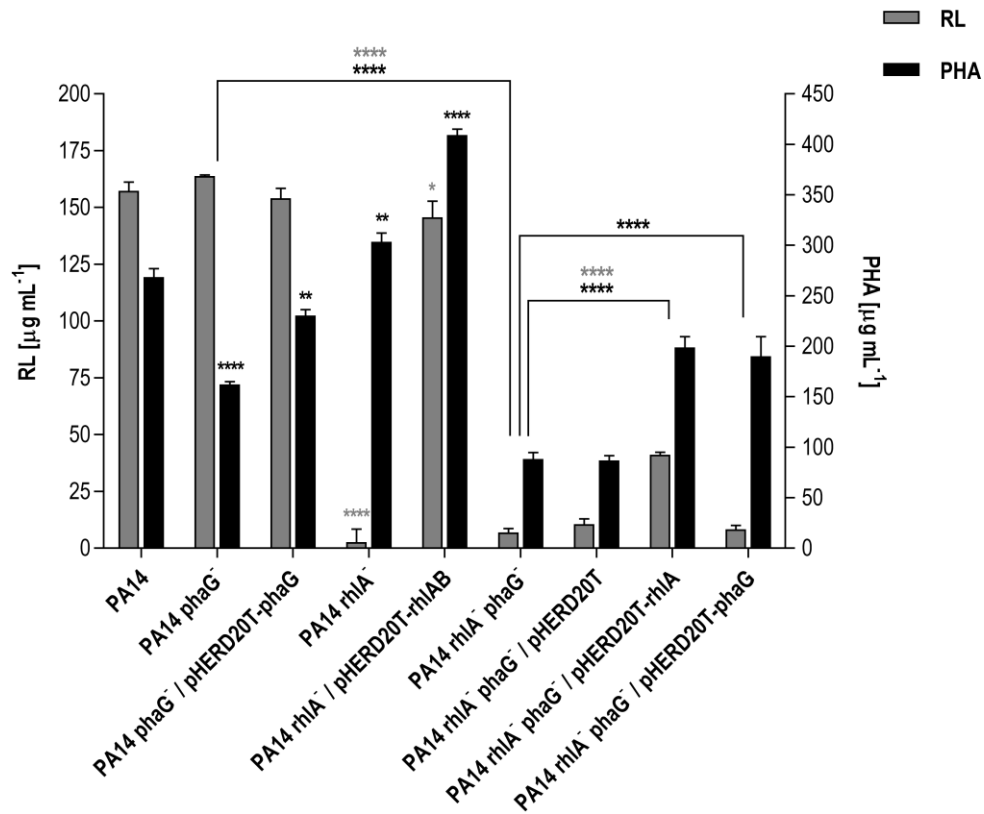
## VII.5. Función de la proteína Rh1A en la biosíntesis de PHA

Como se observó en la Figura 7, la mutación en el gen *phaG* no abate por completo la producción de PHA. Esto podría indicar que existe otra enzima que produce el intermediario (*R*)-3-hidroxiacil-CoA, el cual es polimerizado por las PHA sintasas PhaC1/PhaC2 y produce PHA. En la cepa PA14, la secuencia de aminoácidos de la transacilasa PhaG tiene un 44% de identidad con respecto a la enzima Rh1A (Figura 13); ésta última tiene un papel fundamental en la biosíntesis de RL al producir un dímero de ácidos grasos denominado 3-hidroxiacil-CoA (HAA), el cual es un precursor directo para la producción de RL.



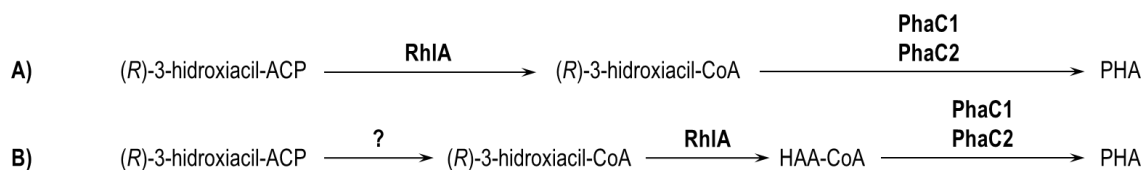
**Figura 5.** Alineamiento de proteínas Rh1A (PA14\_19100) y PhaG (PA14\_54830). Las letras sombreadas con color negro indican identidad, mientras que las sombreadas con color gris indican similitud. Los aminoácidos señalados en rojo son la triada catalítica identificada para Rh1A.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Rh1A y PhaG muestra la gran similitud que hay entre ambas. Recientemente, Wittgens *et al.* (2016) demostraron que los aminoácidos catalíticos de la proteína Rh1A son Ser102, Asp223 e His 251. Así como Rh1A y PhaG son muy similares en su secuencia, también comparten esta triada catalítica. Asimismo, previamente se ha demostrado, mediante ensayos de actividad enzimática, que las enzimas PhaG y Rh1A utilizan el mismo sustrato: (*R*)-3-hidroxiacil-ACP [Rehm *et al.*, 1998; Zhu & Rock, 2008]. Estas evidencias sugieren que, en ausencia de la transacilasa PhaG, la producción de PHA posiblemente se lleve a cabo mediante la participación de la enzima Rh1A. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una complementación funcional de una mutante PA14 *rh1A*<sup>-</sup> *phaG*<sup>-</sup> con una construcción pHERD20T-*rh1A* y se evaluó la producción de PHA en esta cepa.



**Figura 6.** La proteína RhlA genera intermediarios para la biosíntesis de PHA. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ). Las cepas PA14 *phaG*<sup>-</sup>, PA14 *phaG* / pHERD20T-*phaG*, PA14 *rhlA*<sup>-</sup> y PA14 *rhlA* / pHERD20T-*rhlA* fueron comparadas tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Adicionalmente, también fueron comparadas los pares de cepas que están conectados con líneas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

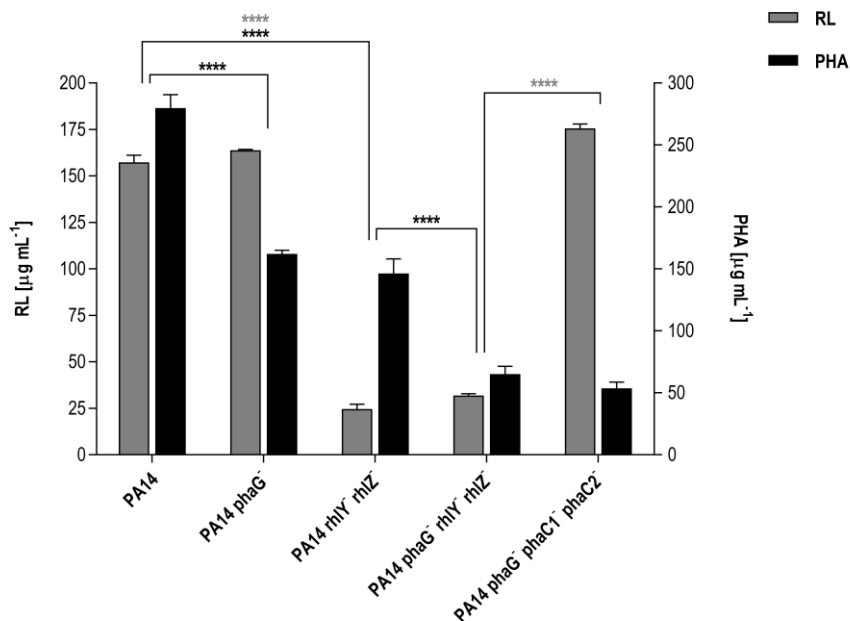
La ausencia de la transacilasa PhaG y de la enzima RhlA (cepa PA14 *rhlA*<sup>-</sup> *phaG*<sup>-</sup>) disminuye considerablemente la producción de PHA, observando que aún se produce una cantidad mínima. Al complementar la cepa PA14 *rhlA*<sup>-</sup> *phaG*<sup>-</sup> con la construcción pHERD20T-*rhlA* se observa que la producción de PHA se incrementa; asimismo, de manera similar, la producción de PHA se incrementa al complementar con el plásmido pHERD20T-*phaG*. Los resultados obtenidos muestran que la enzima RhlA genera intermediarios para la biosíntesis de PHA. Para explicar esta actividad de RhlA, existen dos reacciones hipotéticas por las cuales es posible producir un intermediario para las PHA sintasas:



Los estudios *in vitro* de Zhu & Rock (2008) demuestran que la enzima RhlA utiliza como sustrato el  $(R)$ -3-hidroxiacil-ACP para producir el dímero de HAA. Por otro lado, las PHA sintasas PhaC1/PhaC2 polimerizan PHA a partir de ácidos grasos activados con CoA, como el  $(R)$ -3-hidroxiacil-CoA [Eggink *et al.*, 1992; Langenbach *et al.*, 1997]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que RhlA produce intermediarios (muy posiblemente, HAA-CoA), que pueden ser utilizados como precursores de la biosíntesis de RL y PHA.

## VII.6. La enoil-CoA hidratasa RhlY y la enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ generan el principal precursor de ácidos grasos para la biosíntesis de RL, a partir de la vía de síntesis *in situ* de ácidos grasos

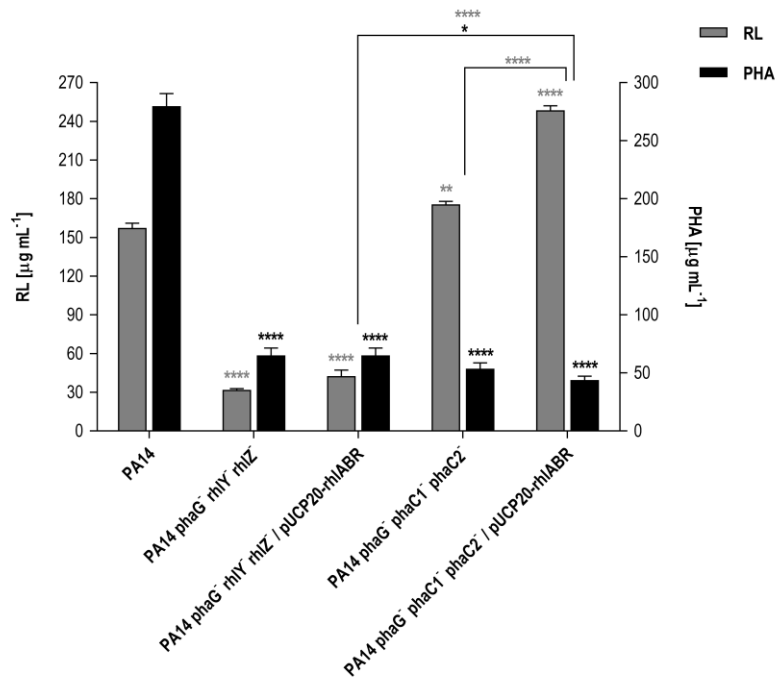
Se ha propuesto que las enzimas enoil-CoA hidratasa RhlY y enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ producen precursores para la biosíntesis de RL a partir de intermediarios de la vía de  $\beta$ -oxidación [Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014]. En nuestras condiciones de cultivo con glucosa como principal fuente de carbono, la vía de síntesis *in situ* de ácidos grasos se encuentra, en teoría, más activa que la  $\beta$ -oxidación. Sin embargo, en nuestras condiciones de cultivo, es probable que las enzimas RhlYZ también puedan proveer del intermediario (*R*)-3-hidroxiacil-CoA, explicando así la diferencia de PHA entre la cepa PA14 *rhlA*<sup>-</sup> *phaG*<sup>-</sup> y las cepa PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup>. Para investigar la posible función de estas dos enzimas en una condición de cultivo con glucosa como principal fuente de carbono, fue evaluada la producción de RL y PHA en cepas mutantes PA14 *rhlY*<sup>-</sup> *rhlZ*<sup>-</sup> y PA14 *phaG*<sup>-</sup> *rhlY*<sup>-</sup> *rhlZ*<sup>-</sup>. La generación de estas mutantes abatiría la entrada de ácidos grasos con CoA hacia la producción de RL y PHA (Figura 16).



**Figura 7.** La enoil-CoA hidratasa RhlY y enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ generan precursores para la biosíntesis de RL y PHA en un medio de cultivo con glucosa como principal fuente de carbono. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), comparando los pares de cepas que están conectados con líneas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

La mutación sobre los genes *rhlY* y *rhlZ* provoca una disminución tanto en la producción de RL como de PHA. En el caso de los PHA, la mutación generó una disminución cerca del nivel de la cepa PA14 *phaG*<sup>-</sup>; además, el título de RL disminuyó de manera más acentuada (cerca del 80% de la cepa PA14<sub>wt</sub>). Esto indica que tanto RhlY como RhlZ generan precursores para la biosíntesis de RL y PHA, incluso usando glucosa como principal fuente de carbono. Al generar la triple mutante PA14 *phaG*<sup>-</sup> *rhlY*<sup>-</sup> *rhlZ*<sup>-</sup>, la producción de PHA fue abatida y el título de RL no cambió significativamente. Esto indica que el (*R*)-3-hidroxiacil-CoA – el cual es producto de la transacilasa PhaG – no es un intermediario para la biosíntesis de RL y, por lo tanto, la actividad de PhaG no es relevante en la biosíntesis de éste último. Sobre la cepa triple mutante PA14 *phaG*<sup>-</sup> *rhlY*<sup>-</sup> *rhlZ*<sup>-</sup> (la cual también carece de PHA como la triple mutante PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup>) se sobreexpresó el plásmido de

sobreproducción de RL para evaluar si es posible restituir el título de RL o, incluso, evaluar algún efecto de sobreproducción (Figura 17).



**Figura 8.** La sobreexpresión del operón *rhlAB-R* no modifica la producción de RL o PHA en una cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> rhlY<sup>-</sup> rhlZ<sup>-</sup>*. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Adicionalmente, las cepas conectadas con líneas también fueron analizadas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

A diferencia de la cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>*, la cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> rhlY<sup>-</sup> rhlZ<sup>-</sup>* no incrementa el título de RL aunque sobre ésta sea sobreexpresado el operón *rhlAB-R*. Es decir que los precursores generados por las enzimas RhlY y RhlZ constituyen la principal fracción de ácidos grasos para la biosíntesis de RL, de tal manera que la actividad de estas dos enzimas es muy importante para obtener el máximo título de RL posible en *P. aeruginosa*.

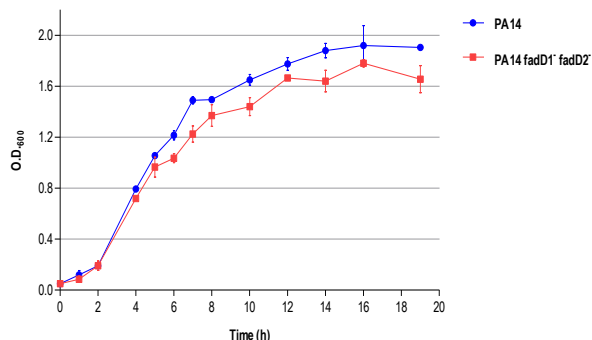
### VII.7. La interrupción del flujo de carbono por la vía de $\beta$ -oxidación no modifica el título de RL

Previamente se ha propuesto que los intermediarios para la biosíntesis de RL provienen tanto de la vía de síntesis *in situ* de ácidos grasos como del ciclo de  $\beta$ -oxidación, incluso si la fuente de carbono empleada para el crecimiento son carbohidratos [Kang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014]. Las enzimas RhlY y RhlZ contribuyen con intermediarios importantes para la biosíntesis de RL en nuestras condiciones de cultivo y producción. Se ha propuesto que estas enzimas tienen una participación en el metabolismo de  $\beta$ -oxidación, aún cuando se utilicen carbohidratos como fuente de carbono. Los estudios anteriores que se han realizado al respecto no han sido concluyentes para determinar el papel real de la  $\beta$ -oxidación sobre la biosíntesis de RL.

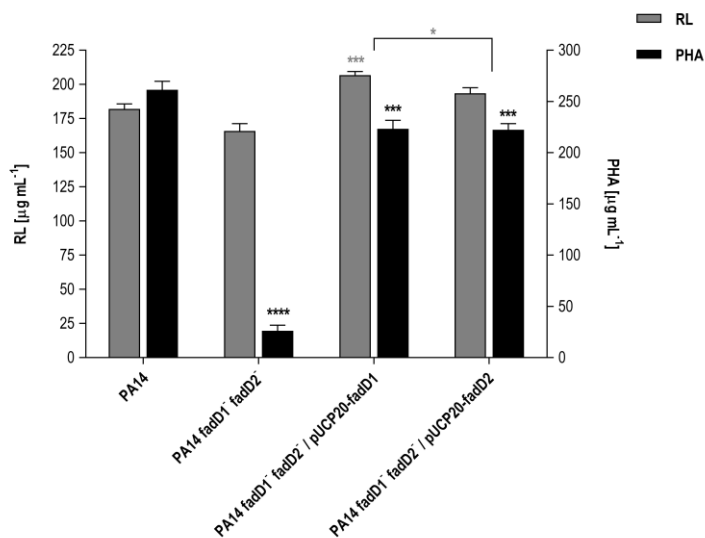
Para verificar si existe una participación de intermediarios de  $\beta$ -oxidación sobre la producción de RL, se realizó una mutación sobre los genes *fadD1* y *fadD2*, los cuales codifican para las acil-CoA sintetasas que incorporan ácidos grasos dentro

del ciclo de  $\beta$ -oxidación. Sobre esta mutante doble se realizará la medición de RL y PHA para verificar si existe un efecto en la producción (Figura 18).

**A.**



**B.**



**Figura 9. A.** Curva de crecimiento de mutante PA14 *fadD1*<sup>-</sup> *fadD2*<sup>-</sup>. **B.** Producción de RL y PHA en mutante PA14 *fadD1*<sup>-</sup> *fadD2*<sup>-</sup>. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PA14. Adicionalmente, las cepas conectadas con líneas también fueron analizadas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

La biomasa máxima de la mutante PA14 *fadD1*<sup>-</sup> *fadD2*<sup>-</sup> crecida en medio PPGAS tiene una ligera variación con respecto a la cepa PA14<sub>wt</sub>; sin embargo, el título de RL obtenido para la mutante es muy similar al de la cepa parental. La mutación de los dos genes *fadD* impide que los ácidos grasos sean incorporados al ciclo de  $\beta$ -oxidación, de tal manera que se reduce el flujo de carbono sobre la  $\beta$ -oxidación. Debido a que el título de RL no se afecta en la mutante PA14 *fadD1*<sup>-</sup> *fadD2*<sup>-</sup> podemos concluir que los precursores para la biosíntesis de RL no son obtenidos del ciclo de  $\beta$ -oxidación, sino que provienen de la vía de síntesis *in situ* de ácidos grasos.

Se ha demostrado que en condiciones de cultivo con glucosa como única fuente de carbono, la actividad de la vía de  $\beta$ -oxidación se centra en el catabolismo de lípidos de membrana citoplásmica [Pech-Canul *et al.*, 2011]. Nosotros proponemos que el abatimiento de la producción de PHA es producto del catabolismo truncado de los lípidos de membrana, provocado por la ausencia de las acil-CoA sintetasas FadD1 y FadD2. Recientemente, Abbes *et al.* (2018) reportaron el perfil de lípidos de membrana de la cepa *P. aeruginosa* PA14. Por lo tanto, alguno de estos ácidos grasos provenientes de la membrana citoplásmica sería esencial para comenzar la polimerización del PHA. Con los resultados obtenidos, proponemos una nueva vía metabólica para la biosíntesis de RL y PHA en *P. aeruginosa* (Figura 19).

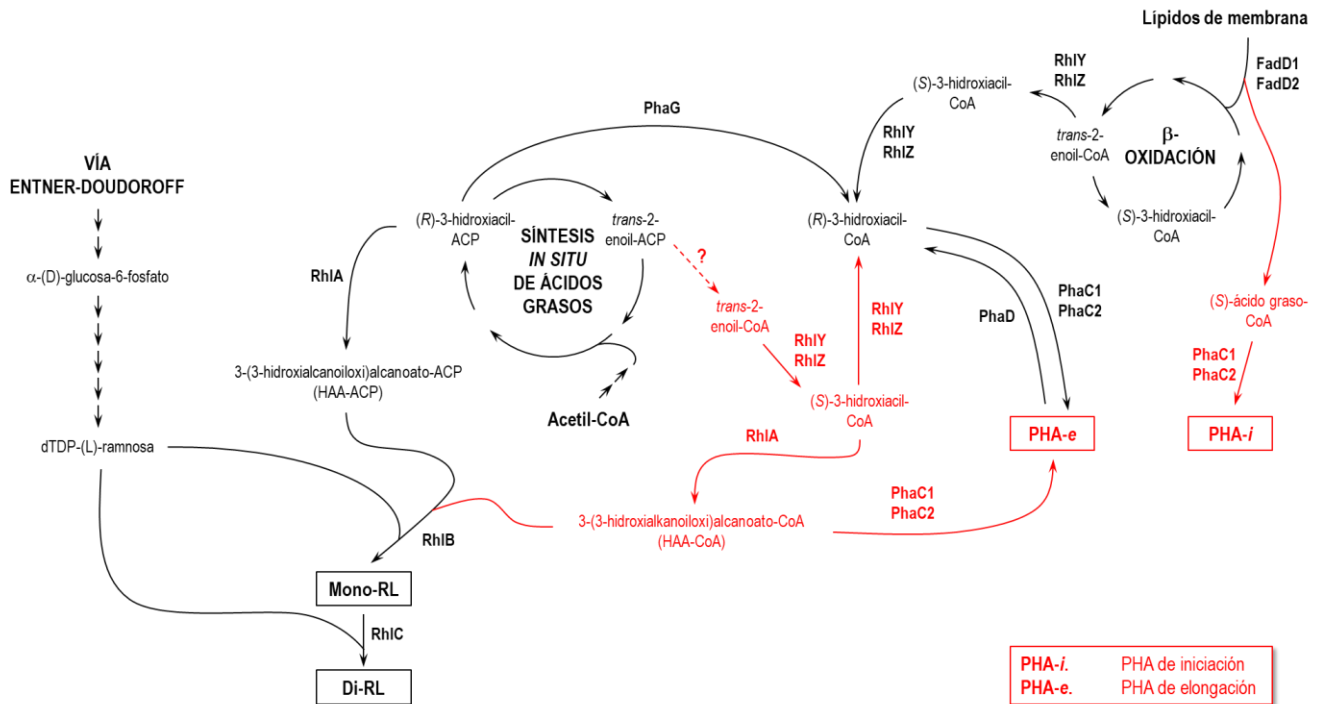


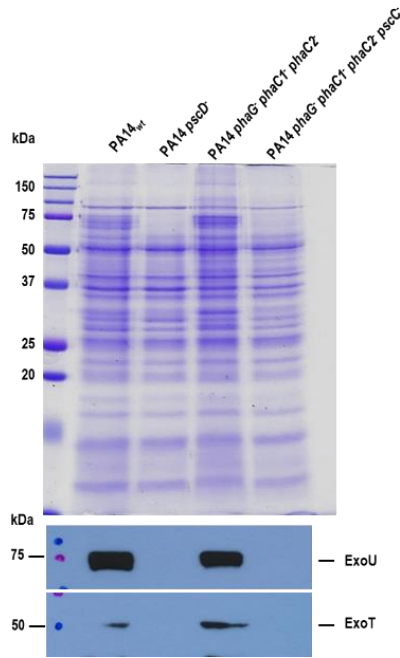
Figura 10. Vía metabólica propuesta de biosíntesis de RL y PHA en *P. aeruginosa*.

## VII.8. Atenuación de virulencia en cepas de *P. aeruginosa* sobreproductoras de RL

### VII.8.1. Generación de mutación $\Delta pscC::aac(3)IV$ sobre la cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* para el bloqueo de la secreción de toxinas por el sistema de secreción tipo III (T3SS)

De acuerdo a previos resultados generados en nuestro laboratorio, la mutación o inactivación de importantes factores de virulencia asociados a expresión por *quórum sensing* (e.g. elastasa LasB) no contribuye a atenuar la virulencia de cepas de *P. aeruginosa*, incluyendo a las dos cepas tipo PAO1 y PA14. Sin embargo, otros grupos de investigación han señalado que, en estas dos cepas tipo, existe una expresión diferenciada de factores de virulencia entre ellas (Chambonnier *et al.*, 2016), de tal manera que los principales factores de virulencia de la cepa PAO1<sub>wt</sub> no son los mismos que para la cepa PA14<sub>wt</sub>. En el caso particular de ésta última, un regulador denominado LadS se encuentra trunco y no es funcional. Éste último participa en la regulación y expresión de diversos factores de virulencia. Mikkelsen *et al.* (2011) determinaron que la presencia del regulador LadS no funcional promueve la sobreexpresión y expresión de toxinas secretadas por el sistema de secreción tipo III (T3SS) en la cepa PA14<sub>wt</sub>. De tal manera que, para atenuar la virulencia de la cepa sobreproductora de RL derivada de la PA14, nos enfocamos en bloquear la secreción de las toxinas del T3SS. La secreción de éstas depende de la formación de un complejo proteico transmembranal, denominado inyectisoma, el cual es esencial para secretar las toxinas que, para el caso de la cepa PA14, se denominan ExoT, ExoU y ExoY (Hauser, 2009). Dos de los componentes importantes para la formación del inyectisoma se encuentran codificados en los genes *pscC* y *pscD*; de tal manera que elegimos al gen *pscC* como blanco de mutación para bloquear el ensamblaje del inyectisoma y, en consecuencia, la secreción de las toxinas. Después de obtener la mutante, fue verificado la ausencia de los efectores (toxinas) ExoU y ExoT en sobrenadantes de cultivos mediante Western Blot (Figura 20).



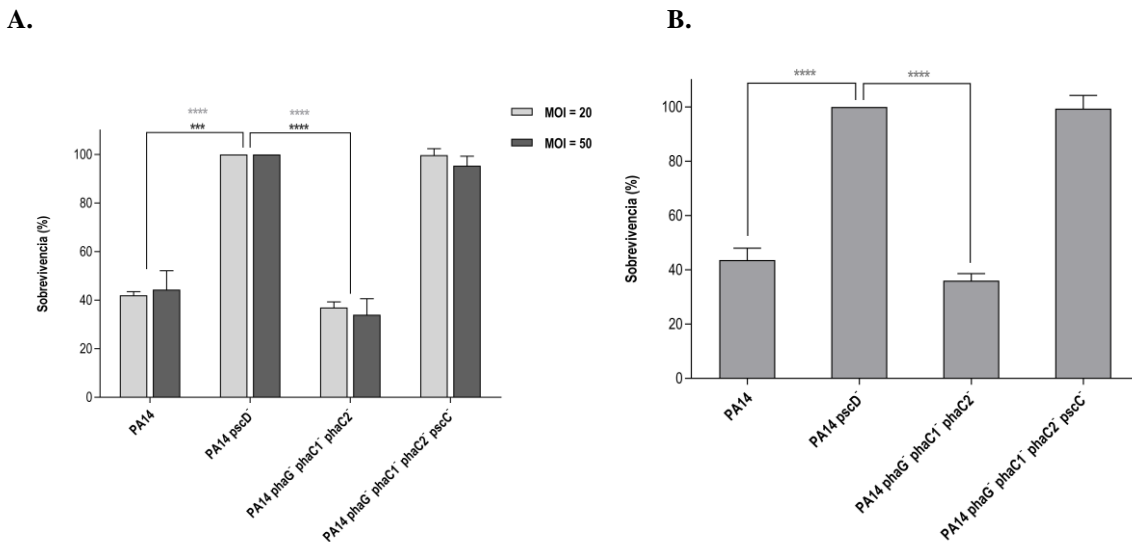


**Figura 20.** En la parte superior se observa el gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie con las proteínas totales presentes en el sobrenadante. En la parte inferior, correspondiente al Western blot, se realizó la detección de las toxinas ExoU y ExoT. Se utilizó la cepa PA14 *pscD* como control negativo de la secreción de toxinas.

La ausencia de las toxinas ExoU y ExoT demuestra que la incorporación de la mutación en el gen *pscC* a la cepa PA14 *phaG phaC1 phaC2* genera un bloqueo de la secreción de las toxinas del T3SS, de tal manera que esta cepa será probada para verificar la atenuación de la virulencia.

### VII.8.2. Evaluación de la citotoxicidad sobre las células HeLa (ATCC® CCL-2™)

Para evaluar la disminución de la virulencia en la cepa PA14 *phaG phaC1 phaC2 pscC*, se realizaron ensayos de infección sobre células HeLa (ATCC® CCL-2™) para estimar la tasa de sobrevivencia de éstas posterior a una infección. Las multiplicidades de infección (MOI) utilizadas fueron 20 y 50 (Figura 21).

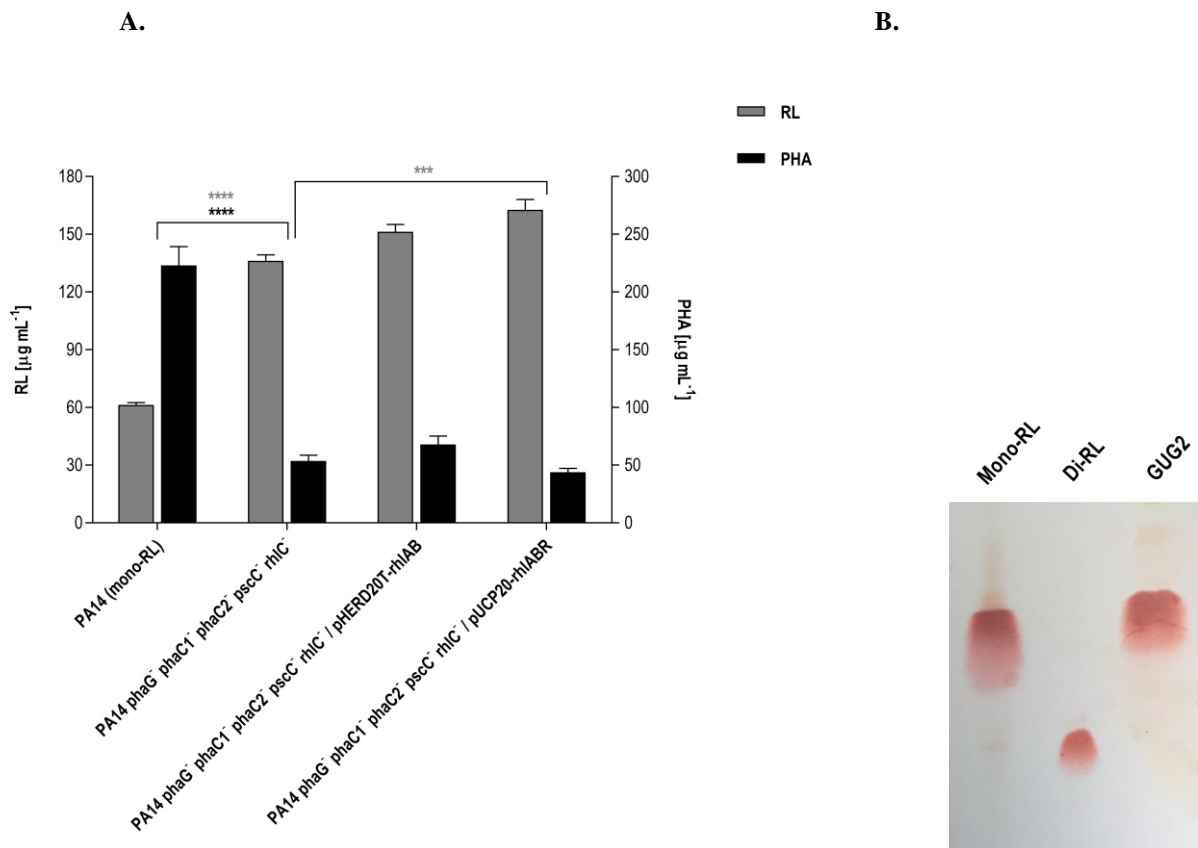


**Figura 11. A.** Efecto citotóxico de cepas derivadas de PA14 en infección de células HeLa (ATCC® CCL-2™) a una MOI=20 y MOI=50. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa control PA14 *pscD*. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la MOI = 20, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en la MOI = 50. **B.** Efecto citotóxico y sobrevivencia global a ambas MOI. Se utilizó la cepa PA14 *pscD* como control negativo de citotoxicidad. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa control PA14 *pscD*. Los asteriscos grises representan diferencia significativa.

En ambas MOI utilizadas, la cepa PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> *pscC* generó un 100% de sobrevivencia en el cultivo de células HeLa, comparado con las cepas PA14<sub>wt</sub> y PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> que, en 2 h de infección, sobrevivieron aproximadamente el 40% de las células. La mutación del gen *pscC* generó un abatimiento completo de la citotoxicidad que probablemente contribuya significativamente a una atenuación global de virulencia de la cepa.

### VII.8.3. Generación de cepa sobreproductora de mono-RL derivada de la cepa PA14 con una virulencia atenuada

Como se demostró anteriormente, la cepa sobreproductora PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> / pUCP20-*rhlABR* produce tanto mono-RL como di-RL. Con el completo abatimiento de la citotoxicidad observado en la cepa PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> *pscC*, decidimos adicionar una mutación en el gen *rhlC* para establecer un fondo genético de sobreproducción que sinteticamente exclusivamente mono-RL. Así que se obtuvo la mutante PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> *pscC* *rhlC* y fue evaluada con las construcciones pHERD20T-*rhlAB* y pUCP20-*rhlABR* con las que previamente obtuvimos los máximos títulos de RL (Figura 21).



**Figura 12. A.** Producción de RL y PHA en cepas sobreproductoras de mono-RL, derivadas de la cepa PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), analizando las cepas conectadas con líneas. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA. **B.** TLC de RL de la cepa GUG2, sobreproductora de mono-RL (PA14 *phaG*<sup>-</sup> *phaC1*<sup>-</sup> *phaC2*<sup>-</sup> *pscC* *rhlC* / pUCP20-*rhlABR*).

Mediante manipulación genética de la cepa PA14, se obtuvieron dos cepas sobreproductoras de RL: la cepa GUG1 (sobreproductora de mono- y di-RL, en proporción molar 1:1) y la cepa GUG2 (sobreproductora de mono-RL). Las cepas sobreproductoras de RL con virulencia atenuada generadas tienen las siguientes características genotípicas:

<b>GUG1</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14  $\Delta phaG::FRT phaC1^- \Delta phaC2::MAR2xT7 \Delta pscC::FRT-aac(3)IV-FRT$ + pUCP20- <i>rhlABR</i>
<b>GUG2</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14  $\Delta phaG::FRT phaC1^- \Delta phaC2::MAR2xT7 \Delta pscC::FRT \Delta rhlC::FRT-aac(3)IV-FRT$ + pUCP20- <i>rhlABR</i>

#### VII.8.4. Efecto de atenuación de virulencia en modelo de polilla de cera (*Galleria mellonella*)

Con el abatimiento del efecto citotóxico mostrado anteriormente, evaluamos la virulencia de las cepas sobreproductoras obtenidas (GUG1 y GUG2) por infección de *G. mellonella* para verificar la atenuación en un modelo biológico más complejo. Asimismo, este ensayo nos permite comprobar si la sobreexpresión de RL contribuye, en este modelo, al incremento de virulencia.

**Tabla 2.** Conteo de sobrevivientes en la infección de *G. mellonella*. Se utilizó la cepa ATCC9027 como un control positivo de sobrevivencia.

Cepa	Dosis (dilución)	No. de individuos	No. de sobrevivientes		
			24 h	48 h	72 h
ATCC9027	10 <sup>-4</sup>	5	5	5	5
PA14	10 <sup>-4</sup>	5	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	5	0	0	0
	10 <sup>-6</sup>	5	2	2	2
PA14 <i>pscD</i> <sup>-</sup>	10 <sup>-4</sup>	5	1	0	0
	10 <sup>-5</sup>	5	5	1	1
	10 <sup>-6</sup>	5	5	2	2
PA14 <i>phaG phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup></i>	10 <sup>-4</sup>	5	0	0	0
	10 <sup>-5</sup>	5	3	2	1
	10 <sup>-6</sup>	5	3	3	3
PA14 <i>phaG phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup> pscC<sup>-</sup></i>	10 <sup>-4</sup>	5	5	5	5
	10 <sup>-5</sup>	5	5	5	5
	10 <sup>-6</sup>	5	5	5	5
GUG1	10 <sup>-4</sup>	5	5	4	3
	10 <sup>-5</sup>	5	5	5	5
	10 <sup>-6</sup>	5	5	5	5
GUG2	10 <sup>-4</sup>	5	5	4	4
	10 <sup>-5</sup>	5	5	4	4
	10 <sup>-6</sup>	5	5	5	5
MgSO <sub>4</sub>	-	5	5	5	5

La sobrevivencia de las polillas para las cepas sobreproductoras GUG1 y GUG2 se encuentra muy cercana a la cepa control utilizada ATCC9027, la cual ha sido demostrada en otros estudios [Grosso-Becerra *et al.*, 2016] que no es virulenta en modelo de infección en ratón; por lo que el bloqueo de secreción de toxinas en la cepa PA14 contribuye de manera muy importante para la atenuación de virulencia de ésta.

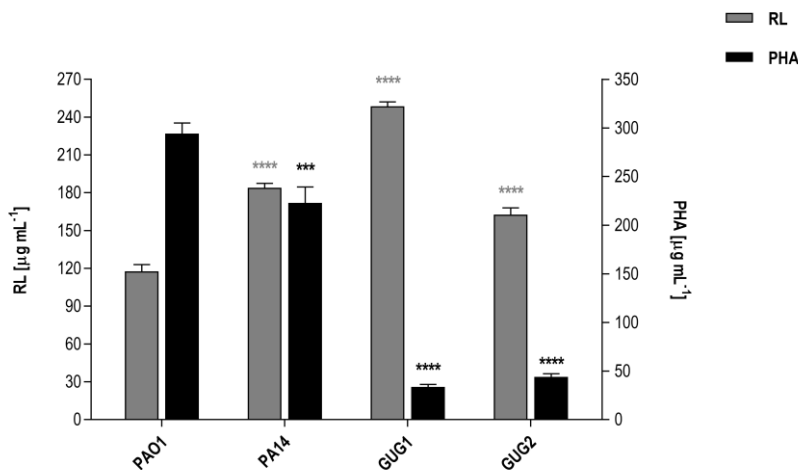
### VII.8.5. Efecto de atenuación de virulencia en modelo de ratón BALBc/AnNHsd

Con los resultados obtenidos en el modelo de *G. mellonella*, se probaron las cepas sobreproductoras GUG1 y GUG2 en modelo de ratón para verificar si se observaba el mismo comportamiento de atenuación.

**Tabla 3.** Conteo de sobrevivientes en la infección de ratón BALBc/AnNHsd. Se utilizó la cepa ATCC9027 como un control positivo de sobrevivencia.

Cepa	Dosis (UFC)	No. de individuos	No. de sobrevivientes			
			24 h	48 h	72 h	120 h
ATCC9027	1 x 10 <sup>8</sup>	5	5	5	5	5
	1 x 10 <sup>7</sup>	10	10	10	10	10
PA14	1 x 10 <sup>7</sup>	10	0	0	0	0
	1 x 10 <sup>6</sup>	10	5	4	3	3
GUG1	1 x 10 <sup>8</sup>	5	5	5	5	5
	1 x 10 <sup>7</sup>	10	10	10	10	10
	1 x 10 <sup>6</sup>	10	10	10	10	10
GUG2	1 x 10 <sup>8</sup>	5	5	5	5	5
	1 x 10 <sup>7</sup>	10	10	10	10	10
	1 x 10 <sup>6</sup>	10	10	10	10	10
H <sub>2</sub> O	-	5	5	5	5	5

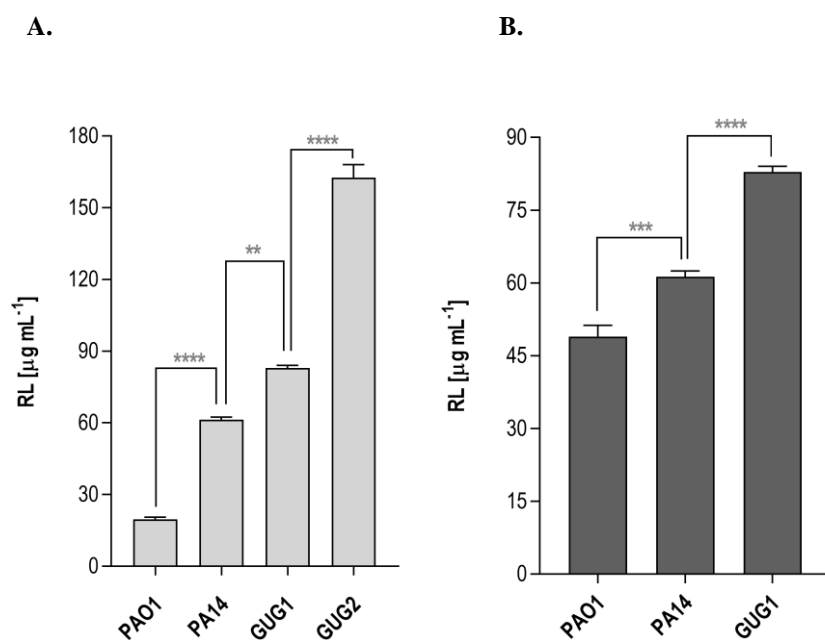
Los ensayos de infección sugieren que las cepas sobreproductoras GUG1 y GUG2 están lo suficientemente atenuadas debido a que, tanto en *G. mellonella* como en ratón, se encontró una sobrevivencia del 100% de individuos inoculados, similar a la cepa no virulenta ATCC9027. De tal manera que se obtuvieron dos cepas sobreproductoras de ramnolípidos (cepas GUG1 y GUG2) con virulencia atenuada. Hasta el momento, la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1 es la mayor productora de RL; colocamos a nuestras cepas obtenidas (derivadas de la cepa PA14) dentro del contexto de nuestras condiciones de cultivo y producción, comparándolas con la cepa PAO1 (Figura 23).



**Figura 13.** Cepas sobreproductoras GUG1 y GUG2, con virulencia atenuada, comparadas con la producción de las cepas de referencia PAO1 y PA14. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PAO1. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL, mientras que los asteriscos negros representan diferencia en PHA.

Las cepas GUG1 y GUG2, derivadas de la cepa PA14, tienen un incremento significativo de RL totales con respecto a la cepa PAO1, la cual es la mejor cepa productora de RL reportada al momento. Sin embargo, las cepas GUG1 y GUG2 tienen la

ventaja de que son cepas no virulentas. Considerando la proporción estimada de mono- y di-RL para las cepas PAO1, PA14 y GUG1, se realizó un cálculo del título de mono- y di-RL para cada cepa. De esta manera, se podrá apreciar con mayor precisión el incremento de cada variedad de ramnolípido que producen las cepas generadas (Figura 24).



**Figura 24.** A. Producción de mono-RL (A) y di-RL (B) en cepas sobreproductoras con virulencia atenuada. Se realizó una prueba estadística ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), tomando como referencia los valores de la cepa PAO1. Los asteriscos grises representan diferencia significativa en la cuantificación de RL.

Para la cepa GUG1, se obtuvo un título de mono-RL de  $82.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y  $82.88 \mu\text{g mL}^{-1}$  de di-RL. La cepa GUG2, sobreproductora exclusiva de mono-RL, tiene un título de  $162.62 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Al comparar estos títulos con los que se obtuvieron para la cepa tipo productora PAO1 ( $19.60 \mu\text{g mL}^{-1}$  para mono-RL y  $48.99 \mu\text{g mL}^{-1}$  para di-RL), las cepas GUG1 y GUG2 presentan un incremento del 323% y 730% en mono-RL, respectivamente. Y en cuanto al incremento en di-RL, el título de la cepa GUG1 sobrepasó al de la cepa PAO1 en un 69%. En virtud que nuestras cepas GUG1 y GUG2 tienen una mayor producción de ramnolípidos, comparadas con las cepas tipo PAO1 y PA14, podemos ofrecerlas como alternativas de cepas sobreproductoras que, a diferencia de otras cepas de *P. aeruginosa*, no son virulentas y pueden ser aplicadas en un bioproceso de producción de ramnolípidos a mayor escala.

## VIII. CONCLUSIONES

- En un fondo genético *P. aeruginosa* PA14<sub>wt</sub>, la sobreexpresión de los operones *rhlAB* y *rhlAB-R* no incrementa significativamente el título de RL.
- La ausencia de la vía de biosíntesis de PHA (*phaG<sup>-</sup> phaC1<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>*) en la cepa PA14, por sí misma, no incrementa significativamente la producción de RL.

- El máximo título de RL fue obtenido en la cepa PA14 *phaG<sup>-</sup> phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup>* con la sobreexpresión del operón *rhlABR*, obteniendo con éste un título de 248.63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que representa un incremento del 60% con respecto a la cepa parental PA14.
- En la cepa sobreproductora PA14 *phaG<sup>-</sup> phaCI<sup>-</sup> phaC2<sup>-</sup> / pUCP20-rhlABR*, se produjo un aumento en la producción de mono-RL con respecto a la cepa PA14<sub>wt</sub>, del 43% al 50%, obteniendo una relación molar 1:1 entre mono- y di-RL en la cepa sobreproductora.
- La proteína RhlA genera intermediarios – posiblemente HAA-CoA – para la biosíntesis de PHA.
- Las enzimas RhlY (enoil-CoA hidratasa) y RhlZ (enoil-CoA hidratasa/isomerasa) generan el principal precursor – posiblemente (*S*)-3-hidroxiacil-CoA – y la fracción principal de ácidos grasos para la biosíntesis de RL, a partir de la vía de síntesis *in situ* de ácidos grasos.
- Contrario a lo propuesto anteriormente, el compuesto (*R*)-3-hidroxiacil-CoA no es un sustrato para la biosíntesis de RL.
- En condiciones de cultivo con glucosa como fuente de carbono principal, el carbono catabolizado por la vía de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos no participa de manera directa en la biosíntesis de RL.
- Los lípidos de membrana, catabolizados por la vía de  $\beta$ -oxidación, constituyen la cadena de carbono inicial necesaria para la biosíntesis de PHA.
- Se obtuvieron dos cepas sobreproductoras de ramnolípidos (cepas GUG1 y GUG2) con virulencia atenuada, debido a la mutación del gen *pscC* y la inactivación de toxinas secretadas por el T3SS de *P. aeruginosa*. La cepa GUG1 produce un título de RL totales de 248.63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la cepa GUG2 produjo un título de 162.64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta última, siendo productora exclusiva de mono-RL.

## IX. PERSPECTIVAS

- Identificar la enzima que realiza la reacción de transacilación de *trans*-2-enoil-ACP a *trans*-2-enoil-CoA, dentro de la vía de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos.
- Explorar la sobreexpresión de las enzimas enoil-CoA hidratasa RhlY y enoil-CoA hidratasa/isomerasa RhlZ en un contexto de sobreproducción de ramnolípidos.
- Realizar el diseño y construcción de una cepa sobreproductora exclusiva de di-RL mediante la sobreexpresión del gen *rhlC* y el bloqueo de la expresión del operón *rhlAB* al final del cultivo de la cepa PA14 o PAO1.

- Utilizar las cepas sobreproductoras de RL, GUG1 y GUG2, en un proceso de producción (fermentación) a mayor escala.

## X. REFERENCIAS

1. Abbes I, Rihouey C, Hardouin J, Jouenne T, De E, Alexandre S (2018) Identification by mass spectrometry of glucosaminyl-phosphatidylglycerol, a phosphatidylglycerol derivative, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rapid Commun Mass Spectrom* doi: 10.1002/rcm.8277.
2. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E (2014) A stereospecific pathway diverts  $\beta$ -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem Biol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.010>.
3. Berger E, Ramsay BA, Ramsay JA, Chavarie C (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques* 3(4):227-232.
4. Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F, Soberón-Chávez G (2006) Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:187-194.
5. Chandrasekaran EV, Bemiller JN (1980) Constituent analysis of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr Chem* 8:89-96.
6. Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, Fadel F, Filloux A, Sivaneson M, De Bentzmann S, Bordi C (2016) The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 12(5): e1006032. doi:10.1371/journal.pgen.1006032.
7. Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho YH, Yoon SC (2011) Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Comparative  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *J Bacteriol* 151:30-42.
8. Chong H, Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb Cell Fact* 16(1):137.
9. Croda-García G, Grosso-Becerra V, González-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez G (2011) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*: role of the CRP-orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiology* 157:2545-2555.
10. Eggink G, De Ward P, Huijberts GNM (1992) The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxy-alkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* 103:159-164.
11. Elouzi AA, Akasha AA, Elgerbi AM, El-Baseir M, El Gammudi BA (2012) Removal of heavy metals contaminations by bio-surfactants (rhamnolipids). *J Chem Pharm Res* 4(9):4337-4341.
12. Filloux A, Ramos JL (2014) *Pseudomonas*. Methods and Protocols. Humana Press. London, United Kingdom & Granada, Spain.


13. Gellatly SL, Hancock REW (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67:159–173.
14. Grosso-Becerra MV, González-Valdez A, Granados-Martínez MJ, Morales E, Servín-González L, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinoza R, Ponce-Soto GY, Cocotl-Yañez M, Soberón-Chávez G (2016) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9995-10004.
15. Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater K (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4):1541-1546.
16. Gutierrez M, Choi MH, Tian B, Xu J, Rho JK, Kim MO, Cho YH, Yoon SC (2013) Simultaneous inhibition of rhamnolipid and polyhydroxyalkanoic acid synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by 2-bromoalkanoic acids: effect of inhibitor alkyl-chain-length. *PLoS ONE* 8(9): e73986. doi:10.1371/journal.pone.0073986.
17. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7(9):654-665.
18. Hauser AR (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: So many virulence factors, so little time. *Critical Care Medicine* 39(9):2193-2194.
19. Hernández-Garrido D (2012) Incremento de la producción de ramnolípidos en la cepa modelo de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
20. Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77-86.
21. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV, Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(24):14339-14344.
22. Jarvis FG, Johnson MJ (1949) A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* 71(12):4124-4126.
23. Kang Y, Zarzycki-Siek J, Walton CB, Norris MH, Hoang TT (2010) Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 5(10): e13557. doi:10.1371/journal.pone.0013557.
24. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et maladies infectieuses* 36:78-91.
25. Kirkeby S, Hansen AK, d'Apice A, Moe D (2006) The galactophilic lectin (PA-IL, gene *lecA*) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its binding requirements and the localization of lectin receptors in various tissues. *Microb Pathogenesis* 40:191-197.
26. Langenbach S, Rehm BHA, Steinbüchel A (1997) Functional expression of the PHA synthase gene *phaCI* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 150:303-309.



27. Lesic B, Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol* 9:20-28.
28. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wai T, Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(8):2833-2838.
29. Matsuyama T, Sogawa M, Yano I (1987) Direct colony thinlayer chromatography and rapid characterization of *Serratia marscescens* wetting agents. *Appl Environ Microbiol* 53:1186-1188.
30. Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS ONE* 6(12): e29113. doi:10.1371/journal.pone.0029113.
31. Müller MM, Hormann B, Kugel M, Syldatk C, Hausmann R (2011) Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:585-592.
32. Pech-Canul Á, Nogales J, Miranda-Molina A, Álvarez L, Geiger O, Soto MJ, López-Lara IM (2011) FadD is required for utilization of endogenous fatty acid released from membrane lipids. *J Bacteriol* 193(22):6295-6304.
33. Pham TH, Webb JS, Rehm BHA (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150:3405-3413.
34. Qiu D, Damron FH, Mima T, Schweizer HP, Yu HD (2008) P<sub>BAD</sub>-based shuttle vectors for functional analysis of toxic and highly regulated genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and other bacteria. *Appl Environ Microbiol* 74(23):7422-7426.
35. Rehm BHA, Krüger N, Steinbüchel A (1998) A new metabolic link between fatty acid *de novo* biosynthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis: the *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J Biol Chem* 273(37):24044-24051.
36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. Ed. *Cold Spring Harbor Lab Press*. Cold Spring Harbor, NY.
37. Shapiro HM (1988) Practical Flow Cytometry, 2nd ed., p. 129. John Wiley & Sons, New York.
38. Slepecky RA, Law JH (1960) A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analytical Chemistry* 32(12):1697-1699.
39. Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:718-725.
40. Solaiman DKY, Ashby RD, Crocker N, Lai BH, Zerkowski JA (2013) Rhamnolipid and poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis in 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transacylase (*phaG*)-knockouts of *Pseudomonas chlororaphis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(2): 159-166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.009>.

41. Tavares LFD, Silva PM, Junqueira M, Mariano DCO, Nogueira FCS, Domont GB, Freire DMG, Neves BC (2013) Characterization of rhamnolipids produced by the wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1909-1921.
42. Tejada-Díaz V (2012) Efecto de RhIA en la producción de ramnolípidos y polihidroxicanoatos en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México.
43. Timm A, Steinbüchel A (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem* 209:15-30.
44. West SEH, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janeck LJ (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148:81-86.
45. Williams P, Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12:182-191.
46. Wittgens A, Kovacic F, Müller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, Tiso T, Blank LM, Henkel M, Hausmann R, Syltatk C, Wilhelm S, Rosenau F (2016) Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(7):2865-2878.
47. Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Syltatk C, Rosenau F, Blank LM (2011) Growth independent rhamnolipid product from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* 10:80.
48. Zhang L, Veres-Schalnat TA, Somogyi A, Pemberton JE, Maier RM (2012) Fatty acid cosubstrates provide b-oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Appl Environ Microbiol* 78(24):8611-8622.
49. Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58:3276-3282.
50. Zhu K, Rock CO (2008) RhIA converts  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the  $\beta$ -hydroxyacyl- $\beta$ -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190(9):3147-3154.

# Overproduction of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 by redirection of the carbon flux from polyhydroxyalkanoate synthesis and overexpression of the *rhlAB-R* operon

Uriel Gutiérrez-Gómez · Martín P. Soto-Aceves · Luis Servín-González · Gloria Soberón-Chávez 

Received: 2 July 2018 / Accepted: 24 September 2018  
© Springer Nature B.V. 2018

## Abstract

**Objective** To construct *Pseudomonas aeruginosa* PA14 derivatives that overproduce rhamnolipids (RL) by blocking the synthesis of the carbon-storage polymer polyhydroxyalkanoates (PHA) and by overexpressing the *rhlAB-R* operon that encodes for enzymes of RL synthesis and the RhlR transcriptional regulator.

**Results** In contrast to previous results showing that overexpression of *rhlAB-R* genes in two *P. aeruginosa* strains (PAO1 and ATCC 9027) is sufficient to overproduce RL, we show that a PA14 derivative overexpressing the *rhlAB-R* operon did not increase the synthesis of these biosurfactants. In addition, PA14 mutants deficient in PHA production did not

overproduce RL either. However, if the *rhlAB-R* genes were expressed in a mutant that is completely impaired in PHA synthesis, a significant increase in RL production was observed (59%). These results show that RL production in PA14 is limited both by the availability of fatty acid precursors and by the levels of the RhlA and RhlB enzymes that are involved in the synthesis of mono-RL.

**Conclusions** The limitation of RL production by *P. aeruginosa* PA14 is multifactorial and diverse from the results obtained with other strains. Thus, the factors that limit RL production are particular to each *P. aeruginosa* strain, so strain-specific strategies should be developed to increase their production.

**Keywords** Rhamnolipids overproduction · Biosurfactants · Metabolic engineering · *Pseudomonas aeruginosa*

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2610-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

U. Gutiérrez-Gómez · L. Servín-González · G. Soberón-Chávez (✉)

Programa de Producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Bacterias y Hongos, Mexico, Mexico  
e-mail: gloria@biomedicas.unam.mx

U. Gutiérrez-Gómez · M. P. Soto-Aceves · L. Servín-González · G. Soberón-Chávez  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, D.F., Mexico

## Introduction

The biosurfactants rhamnolipids (RL) produced by *Pseudomonas aeruginosa* have a high biotechnological potential and have been approved by the US Environmental Protection Agency for use in food products, cosmetics and pharmaceuticals. However, their industrial application is limited by the low level of their production (Banat et al. 2010) and also

because *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen (Gellatly and Hancock 2013).

There have been different attempts to develop strains that overproduce RL, using modified *P. aeruginosa* strains (Grosso-Becerra et al. 2016) or heterologous hosts such as *Pseudomonas putida* KT2440 (Wittgens et al. 2011). The comparison of RL maximum yield and productivity between several strains of *P. aeruginosa*, including the type strain PAO1 and different heterologous hosts, showed that the best yield and productivity was obtained with PAO1 strain cultivated with sunflower oil as carbon source (Dobler et al. 2016).

In *P. aeruginosa* the production of RL is regulated at the level of transcription by a complex regulatory circuit called quorum-sensing (Williams and Cámara 2009). The *rhlAB* operon encodes the enzymes responsible for the synthesis of mono-RL (containing one molecule of rhamnose) whereas *rhlC* encodes the enzyme that synthesizes di-RL (RL with two rhamnose moieties) using mono-RL as substrate. Transcription of *rhlAB* and *rhlC* is activated by RhlR when coupled with the autoinducer butanoyl-homoserine lactone (Soberón-Chávez et al. 2005b). At 37 °C a positive RhlR-dependent regulatory loop is formed, leading to an increased expression of *rhlAB* and the formation of the *rhlAB-R* operon (Croda-García et al. 2011; Grosso-Becerra et al. 2014). It has been shown that the expression from a plasmid of the *rhlAB-R* operon increases RL production in *P. aeruginosa* strains PAO1 and ATCC 9027 (Grosso-Becerra et al. 2016).

The syntheses of RL and of polyhydroxyalkanoates (PHA) in *P. aeruginosa* are interconnected (Nitschke et al. 2011). It has been shown that RhlA, the first enzyme in the RL biosynthetic pathway, uses as substrates CoA-linked fatty acids derivatives (Abdel-Mawgoud et al. 2014) that are also intermediates of PHA synthesis. The synthesis of this polymer is catalyzed by the PhaC1 and PhaC2 synthases (Nitschke et al. 2011) using CoA-linked  $\beta$ -hydroxy fatty acids. When *P. aeruginosa* is cultured in media with either a sugar or glycerol as carbon source, the substrates of PhaC1 and PhaC2 synthases are provided by the PhaG transacylase, that converts ACP- $\beta$ -hydroxy fatty acids to CoA- $\beta$ -hydroxy fatty acids (Hoffmann et al. 2000). In addition, it has been reported that the intermediates synthesized by RhlA

can be used as substrate for PHA synthesis (Soberón-Chávez et al. 2005a).

The engineered *P. putida* KT2440 strain used for RL production contains a plasmid for expression of the *rhlAB* operon from an inducible promoter and a mutation in *phaC1* that reduces PHA synthesis; this strain produces similar levels of RL as the PAO1 wild type strain of *P. aeruginosa* (Wittgens et al. 2011).

The aim of this work is to construct *P. aeruginosa* PA14 derivatives with increased RL production. This strain is highly virulent (Lee et al. 2006) and produces high RL levels with a similar proportion of mono- and di-RL.

## Methods

The concentration of RL was estimated by the orcinol method (Chandrasekaran and Bemiller 1980). PHA was determined by hypochlorite digestion (Berger et al. 1989) and spectrophotometric quantification of fatty acids derivatives at 235 nm by a similar procedure to that reported for polyhydroxybutyrate (Slepecky and Law 1960). The conversion of absorbance at 235 nm to PHA weight (expressed as  $\mu\text{g/mL}$ ) was experimentally determined using a standard curve obtained with a known dry weight of purified PHA resuspended in 1 mL of sulfuric acid as described in Supplementary Fig. S1. Each experiment was done in triplicate and the standard deviation is shown.

Strains were routinely cultured in PPGAS medium (Zhang and Miller 1992) at 37 °C. Samples to measure RL and PHA production were obtained at 16 h of growth; this time point corresponds to the early stationary phase of strain PA14 growth curve (Supplementary Fig. S2), and it has been reported that, at this PA14 growth stage, the RL and PHA maximum yields occur (Gutierrez et al. 2013).

Apramycin and gentamycin were used at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ .

The proportion of mono- and di-RL was evaluated by analyzing the image (using the ImageJ software) obtained from a thin-layer chromatography done as previously described (Matsuyama et al. 1987).

The *phaC2::MAR2xT7* strain obtained from the PA14 collection of mutants (Liberati et al. 2006) as a transposon insertion in *phaC2* (ID 54085) is completely impaired in PHA production (Supplementary Fig. S3), so we hypothesized that it contained a

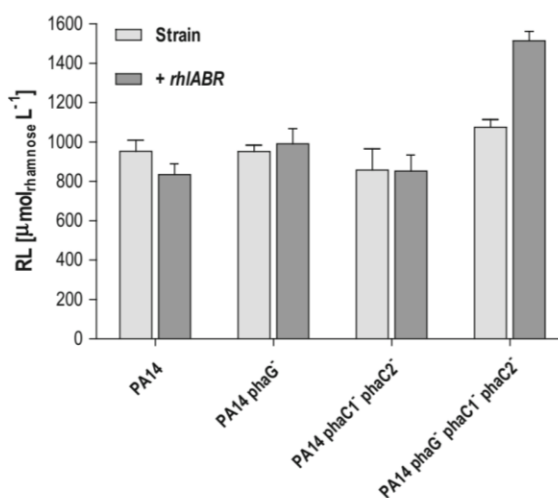
mutated *phaC1* gene besides the insertion in *phaC2*. The alignment of the nucleotide sequence of the *phaC1* gene and also of the derived amino acid in the PA14 wild type strain (*phaC1*wt) and the *phaC2::MAR2xT7* mutant (ID 54085) (*phaC1*m) showed that in the strain obtained from the PA14 mutant collection (ID 54085), the *phaC1* gene has two nucleotide changes: a C to G transversion in nucleotide position 1276 and a G to A transition in nucleotide position 1651, that result in P426A and A551T substitutions in the PhaC1 amino acid sequence.

To further confirm that the *phaC1* gene with two missense mutations (*phaC1*m) was not functional, we used the *phaC1::MAR2xT7* mutant (ID 32531, Liberati et al. 2006) as recipient in complementation tests. We showed that the expression *in trans* from plasmid pUCP20 (West et al. 1994) of the *phaC1*m gene does not complement the PHA deficient phenotype of the *phaC1::MAR2xT7* mutant, while the expression of *phaC1*wt fully complements PHA production (Supplementary Fig. S3). These results confirms that strain *phaC2::MAR2xT7* (ID 54085) is a *phaC1 phaC2* double mutant.

The *aac(3)IV* cassette which confers resistance to apramycin (Gust et al. 2003) was used to construct the *phaG* mutant. The PA14 derived  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV* mutant and the  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7* triple mutant used in this work were constructed as reported (Lesic and Rahme 2008). The oligonucleotides used to construct the  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV* mutant and the plasmids carrying the *phaC1*wt and *phaC1*m genes are shown in Supplementary Table S1.

## Results and discussion

To increase RL production in PA14 we introduced plasmid pJGM4-*rhlAB-R* that has been shown to increase production of these biosurfactants in the *P. aeruginosa* strains PAO1 and ATCC 9027 (Grosso-Becerra et al. 2016) but, contrary to our prediction, the production of RL was not increased (Fig. 1). One explanation for this result is that in the PA14 background there is a limitation of the RhlA substrates, which are the CoA-linked fatty acid derivatives produced by RhlY and RhlZ (Abdel-Mawgoud et al. 2014) or of the RhlB substrate TDP-L-rhamnose (Soberón-Chávez et al. 2005b).



**Fig. 1** Evaluation of the effect of mutations in the PA14 genes encoding for the enzymes that participate in the PHA biosynthetic pathway and of the overexpression of the *rhlAB-R* operon in RL production. Overexpression of the *rhlAB-R* operon was achieved by introduction of plasmid pJG4-*rhlAB-R* in these PA14 derivatives. The only strain that showed significant RL overproduction was the  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7* triple mutant carrying pJG4-*rhlAB-R*

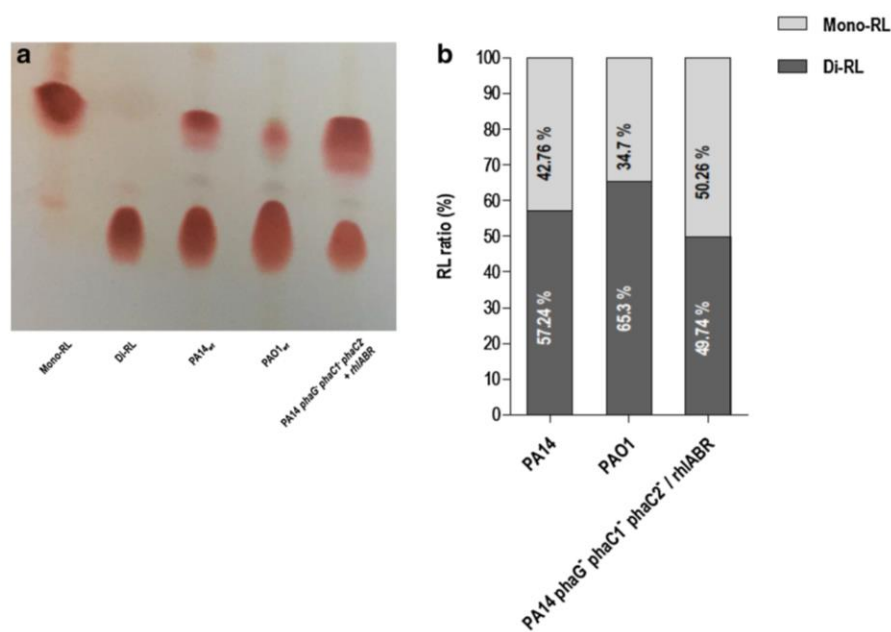
To increase the availability of the fatty acid precursor of RL we isolated the following PA14 mutants that are deficient in PHA production: a  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV* single mutant, a *phaC1 phaC2::MAR2xT7* double mutant, and  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7* triple mutant.

The  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV* single mutant showed around a 30% decrease in PHA production, whereas the *phaC1 phaC2::MAR2xT7* double mutant was completely impaired in PHA production (Supplementary Fig. S3). Contrary to our predictions, RL production was not increased in either of these mutants (Fig. 1).

These results suggest that the increase in the CoA-fatty acid RhlA substrates in the PHA-deficient mutants is not sufficient to increase the flux of the RL biosynthetic pathway that involves not only RhlA, but also RhlB and RhlC.

To determine whether PA14 RL production was limited both by the availability of the CoA-fatty acids precursors of RhlA and the activity of RhlA and RhlB enzymes, we introduced the pJGM4-*rhlAB-R* plasmid to the PA14 mutants deficient in PHA synthesis.

We found that the level of RL produced by PA14 derivatives is only increased in the  $\Delta$ *phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7* triple mutant carrying



**Fig. 2** Production of mono-RL and di-RL observed by thin-layer chromatography (TLC). **a** Chromatogram of culture supernatants of *P. aeruginosa* strains [PA14 wild-type (wt),

PAO1 wild-type (wt), and PA14  $\Delta phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7/pJG4-rhlAB-R$ ]; **b** TLC image analysis using the ImageJ software to determine the ratios of each RL type

plasmid pJGM4-*rhlAB-R* (Fig. 1). This increment in RL production represents a 59% higher level of total RL than the PA14 wild type strain. These results suggest that RL production by PA14 strain is limited not only by the availability of CoA-fatty acids precursors, but also by the RhlA and RhlB enzyme levels. It is also apparent that the factors that limit RL production might be particular for each *P. aeruginosa* isolate, and thus specific metabolic engineering strategies should be developed for each strain.

An unexpected finding was that the *phaC1 phaC2::MAR2xT7* double mutant carrying pJGM4-*rhlAB-R* did not show an increase in RL production, even though it is completely impaired in PHA synthesis (Supplementary Fig. S3). This result suggests that the CoA linked (*R*)- $\beta$ -hydroxy acids synthesized by PhaG cannot be used by RhlA as RL precursors.

The lack of correlation between null PHA production and increased synthesis of RL observed in this work, shows that the strategy for increasing RL production by partial blockage of the PHA biosynthetic pathway, such as the use of a *phaC1* mutant in the *P. putida* KT2440 background (Wittgens et al.

2011) should be evaluated for each strain and not taken for granted.

We measured RL production as the equivalent of rhamnose concentration by the orcinol method after hydrolysis of RL. Thus, if the PA14 RL hyper-producing derivative  $\Delta phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7/pJG4-rhlAB-R$  presented a lower mono-RL/di-RL ratio, we could overestimate the increment of RL. To determine whether the proportion of mono-RL/di-RL ratio was significant altered in this PA14 derivative we performed a thin-layer chromatography of culture supernatants of this strain compared to PA14 and PAO1 strains (Fig. 2). Strain PAO1 produces a 1:3 ratio of mono-RL:di-RL (Müller et al. 2011), while PA14 has been reported to present a higher 1:2 ratio (Abdel-Mawgoud et al. 2014). It is apparent that the RL hyper-producing strain does not have a lower mono-RL:di-RL ratio, but a slightly higher one, suggesting that RhlC activity is somewhat limiting in this condition. This result shows that the 59% increment in RL production by PA14  $\Delta phaG::aac(3)IV phaC1 phaC2::MAR2xT7/pJG4-rhlAB-R$  was not an overestimation.

The aim of this work was to show that it is feasible to increase RL production even in *P. aeruginosa*

strains that have a high basal level of production of this biosurfactant. The PA14 strain produces around a 55% higher concentration of RL than PAO1 strain in our culture conditions (PAO1 produces 548  $\mu\text{mol}$  of rhamnose in RL per litre of culture), and we were able to further increase their production by 59%. The effect on RL production of increasing the availability of the TDP-L-rhamnose substrate of RhlB and RhlC, and of the overexpression of RhlC remains to be determined.

**Acknowledgements** UGG and MPSA are doctoral student of Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), this study was performed in partial fulfillment of the requirements for UGG doctorate degree. UGG (CVU-422007) and MPSA (CVU-741217) received a fellowship from CONACYT. We acknowledge Abigail González-Valdez for technical assistance. This work was supported in part by grant IN200416 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, (Dirección General de Asuntos del Personal Académico -UNAM) and grant 252269 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

**Supporting information** Supplementary Fig. 1—shows the standard curve use to determine PHA weight from absorbance at 235 nm.

Supplementary Fig. 2—presents the PA14 strain growth curve in PPGAS medium.

Supplementary Fig. 3—shows the PHA production of PA14 derivatives carrying mutations in genes involved in the synthesis of this fatty acid polymer, and the experiments showing that the *phaC1* gene of the *phaC2::MAR2xT7* mutant (ID 54085) is not functional since it is unable to complement the *phaC1::MAR2xT7* mutant (ID 32531) for PHA synthesis.

Supplementary Table S1—shows the oligonucleotides used to construct the PA14  $\Delta\text{phaG}::\text{aac}(3)\text{IV}$  mutant and the pUCP20 derived plasmids expressing *phaC1*wt and *phaC1*m.

Supplementary Table S2—shows the results obtained from the analysis of the image of thin-layer chromatography presented in Fig. 2, using the ImageJ software.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E (2014) A stereospecific pathway diverts  $\beta$ -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipids biosurfactants. *Chem Biol* 21:1–9
- Banat I, Franzetti A, Bestetti G (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:427–444
- Berger E, Ramsay BA, Ramsay JA, Chavarie C (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol Tech* 3(4):227–232
- Chandrasekaran EV, Bemiller JN (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr Chem* 8:89–96
- Croda-García G, Grosso-Becerra V, González A et al (2011) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*: role of the Crp-ortholog Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiology* 157(9):2545–2555
- Dobler L, Vilella LF, Almeida RC, Neves BC (2016) Rhamnolipids in perspective: gene regulation pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *New Biotechnol* 33(1):123–133
- Gellatly SL, Hancock REW (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67:159–173
- Grosso-Becerra MV, Croda-García G, Merino E, Servín-González L et al (2014) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(43):15562–15567
- Grosso-Becerra MV, González-Valdez A, Granados-Martínez MJ et al (2016) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotech* 100(23):9995–10004
- Gust B, Challis GL, Fowler K et al (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4):1541–1546
- Gutierrez M, Choi MH, Tian B et al (2013) Simultaneous inhibition of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoic acid synthesis and biofilm formation by 2-bromoalkanoic acids: effect of inhibitor alkyl-chain length. *PLoS ONE* 8(9):e73986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073986>
- Hoffmann N, Steinbüchel A, Rehm B (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* *phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol Lett* 184(2):253–259
- Lee DG, Urbach JM, Wu G et al (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7:R90
- Lesic B, Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Biol Mol* 9:20–28
- Liberati NT, Urbach JM, Miyada S et al (2006) An ordered non-redundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(8):2833–2838
- Matsuyama T, Sogawa M, Yano I (1987) Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marscescens* wetting agents. *Appl Environ Microbiol* 53:1186–1188
- Müller MM, Hörmann B, Kugel M, Syldark C, Hausmann R (2011) Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the

- rhamnolipids overproducing strains DSM2874. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:585–592
- Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J (2011) Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochem* 46:621–630
- Slepecky RA, Law JH (1960) A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Anal Chem* 32:1697–1699
- Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramírez M, Sánchez R (2005a) The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is not only involved in rhamnolipid, but also in polyhydroxyalkanoate production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:675–677
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E (2005b) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:718–725
- West SEH, Schweizer HP, Dall C et al (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148:81–86
- Williams P, Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12:182–191
- Wittgens A, Tiso T, Arndt TT et al (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Fact* 10:80
- Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58:3276–3282





# Role of $\beta$ -oxidation and de novo fatty acid synthesis in the production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*

Uriel Gutiérrez-Gómez<sup>1</sup> · Luis Servín-González<sup>1</sup> · Gloria Soberón-Chávez<sup>1</sup>

Received: 29 January 2019 / Accepted: 2 February 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* are ubiquitous  $\gamma$ -proteobacteria capable of producing the biosurfactant rhamnolipids (RL) and the polymer polyhydroxyalkanoate (PHA). RL are glycolipids with high biotechnological potential, whereas PHA is used for the production of biodegradable plastics. It has been proposed that the  $\beta$ -oxidation pathway provides intermediates for RL biosynthesis, even when using a non-fatty acid carbon source for growth, while an intermediate of de novo fatty acid biosynthesis (FASII) pathway [(*R*)-3-hydroxyacyl-ACP] is used for PHA biosynthesis. The aim of this work is to study the inter-relationship of the RL and PHA biosynthetic pathways in a culture medium with a non-fatty acid carbon source, focusing on the role of FASII and  $\beta$ -oxidation in supplying the substrates for the first step in RL and PHA synthesis, carried out by the RhIA and PhaG enzymes, respectively. The PHA synthases (PhaC1 and PhaC2) are only able to use CoA-linked 3-hydroxy acids and the PhaG enzyme catalyzes the conversion of (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP to (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, the substrate of PhaC1 and PhaC2. RhIA in turn catalyzes the synthesis of the RL precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAA) by the dimerization of two 3-hydroxyalkanoic acid molecules (that have been shown to be also (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP). In this work, we show that RhIA can produce both RL and PHA precursors (presumably CoA-linked HAA), that the blockage of carbon flux through  $\beta$ -oxidation pathway does not decrease RL titer, and that the enoyl-CoA hydratase RhIY and enoyl-CoA hydratase/isomerase RhIZ produce the main fatty acid precursor of RL using as substrate also a FASII intermediate (presumably (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA).

**Keywords** Rhamnolipids · Polyhydroxyalkanoates · Fatty acid de novo biosynthesis ·  $\beta$ -Oxidation · *Pseudomonas aeruginosa*

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous bacterium that produces a large number of secondary products, several of which are produced during the late logarithmic phase of growth and regulated by the quorum-sensing (QS) response (Williams and Cámara 2009). Among these metabolites, *P. aeruginosa*

produces amphiphilic biosurfactants known as rhamnolipids (RL). These are glycolipids, which consist of a dimer of (*R*)-3-hydroxy fatty acids, known as 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAA), linked to rhamnose molecules. If HAA is linked to one rhamnose molecule, it is a mono-rhamnolipid (mono-RL), and if it is linked to two rhamnose molecules, it is a di-rhamnolipid (di-RL). The enzymes RhIA, RhIB, and RhIC are essential for the synthesis of the two types of RL. Purified RhIA catalyzes in vitro HAA biosynthesis from two molecules of (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP (Zhu and Rock 2008), which is an intermediate in the de novo (in situ) fatty acid biosynthesis (FASII) pathway, but has been shown to use CoA-linked fatty acids produced by RhIY and RhIZ in vivo (Abdel-Mawgoud et al. 2014). Subsequently, RhIB catalyzes the formation of mono-RL from HAA and dTDP-(L)-rhamnose. Finally, RhIC produces di-RL transferring one molecule of dTDP-(L)-rhamnose to mono-RL (Soberón-Chávez et al. 2005).

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09734-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gloria Soberón-Chávez  
gloria@biomedicas.unam.mx

<sup>1</sup> Programa de Producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Bacterias y Hongos. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, C. P. 04510 CDMX, Mexico

When *P. aeruginosa* is cultured in a medium with a non-fatty acid carbon source, the FASII pathway intermediate (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP is transacylated by PhaG to produce (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA (Rehm et al. 1998), which in turn is polymerized by the PhaC1 and PhaC2 synthases to produce PHA (Timm and Steinbüchel 1992). However, it has been proposed that under this culture condition, (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA can be also synthesized by the enoyl-CoA hydratase RhlY and the enoyl-CoA hydratase/isomerase RhlZ using  $\beta$ -oxidation pathway intermediates that are produced even in the absence of fatty acids as carbon source. In fact, the products or substrates of RhlY/RhlZ enzymatic activities are  $\beta$ -oxidation intermediates, and since these two enzymes have an important role in RL biosynthesis, it has been proposed that they provide RL precursors from  $\beta$ -oxidation intermediates (Abdel-Mawgoud et al. 2014). Therefore, apparently, the PHA precursor (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA is the only link between  $\beta$ -oxidation and RL biosynthesis pathways and this CoA-fatty acid has been proposed as a RL precursor too (Abdel-Mawgoud et al. 2014).

The aim of this work is to investigate RL and PHA biosynthesis and its relationship with  $\beta$ -oxidation and FASII pathways when *P. aeruginosa* PA14 is cultured with glucose as carbon source, and to determine whether (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA is the main substrate of RhlA for RL synthesis.

## Materials and methods

**Bacterial strains and growth conditions** The list of strains and plasmids used in this work is described in Supplementary Table S1. *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 wild-type strain (herein called PA14) is publicly available from BEI Resources (<https://www.beiresearch.org/Home.aspx>) with catalog number NR-50573. *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* strains were cultured at 37 °C with shaking at 250 rpm. For cloning and seed cultures purposes, strains were cultured in LB medium. For the induction of site-specific recombination mediated by *FLP*, strains were cultured at 42 °C. For the elimination of *sacB*-based plasmids, strains were cultured in LB without NaCl (LB-NaCl) with 10% sucrose. For RL and PHA production, *P. aeruginosa* strains were cultured in phosphate-limited protease peptone-glucose-ammonium salts (PPGAS) medium (Zhang and Miller 1992) using glucose as main carbon source. When it was necessary, carbenicillin (100  $\mu$ g/mL for *E. coli* and 200  $\mu$ g/mL for *P. aeruginosa*) and apramycin (50  $\mu$ g/mL for *E. coli* and 100  $\mu$ g/mL for *P. aeruginosa*) were added.

**Gene cloning and mutagenesis** DNA manipulations were performed as reported by Sambrook et al. (1989) and Filloux and Ramos (2014). Deletion of genes from the chromosome was performed using either the lambda Red recombination system

as reported by Lesic and Rahme (2008), or via homologous allelic replacement as described by Hoang et al. (1998). The oligonucleotides used for cloning and mutagenesis are shown in Supplementary information (Table S2).

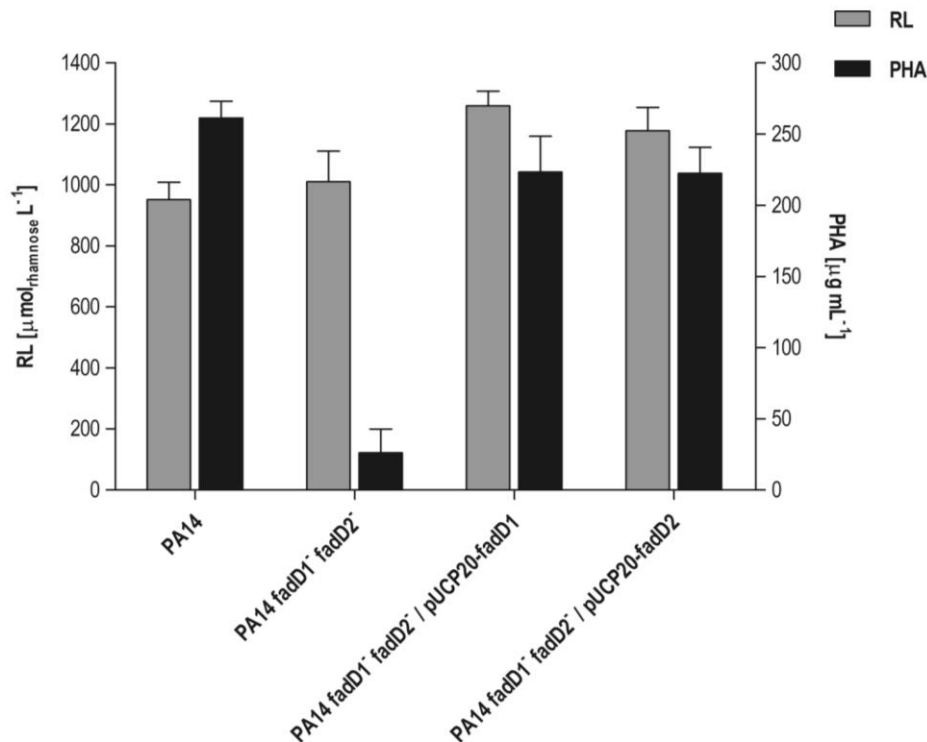
**RL and PHA quantification** RL were quantified using the orcinol assay (Chandrasekaran and Bemiller 1980). Concentration of RL was determined as reported by Grosso-Becerra et al. (2016). RL concentration is expressed as micromoles of rhamnose equivalents per liter of culture. PHA concentration was determined as previously described by Gutiérrez-Gómez et al. (2018). PHA concentration is expressed as micrograms per liter of culture. RL and PHA were quantified at 16 h of growth, according to Gutiérrez-Gómez et al. (2018). Each experiment was performed in triplicate and the standard deviation is shown.

## Results

**The interruption of carbon flux through the  $\beta$ -oxidation pathway does not affect RL production** In order to investigate the role of  $\beta$ -oxidation intermediates in RL biosynthesis when *P. aeruginosa* PA14 is grown in PPGAS medium, we obtained a *P. aeruginosa* PA14  $\Delta$ *fadD1-fadD2* strain, since the absence of both acyl-CoA synthetases blocks the carbon flux through the  $\beta$ -oxidation pathway. We observed that *fadD1-fadD2* chromosomal deletion did not affect RL production in PPGAS medium, compared with PA14 (Fig. 1). This result is consistent with the report of another *P. aeruginosa* *fadD* mutant (PAO1 *fadD1 fadD2*), where RL titer is not affected either (Kang et al. 2010). These results show that RL precursors are not provided from  $\beta$ -oxidation intermediates under growth conditions that use glucose and peptone as carbon source. Growth of the PA14 *fadD1 fadD2* mutant was similar to PA14 growth in PPGAS medium (Supplementary Fig. S1). These results show that the carbon used for the production of primary metabolites and RL biosynthesis is originated from glucose and peptone present in PPGAS medium, and suggest that the carbon flux through the  $\beta$ -oxidation pathway in this condition is very low, as has been shown for other bacteria (Pech-Canul et al. 2011).

Surprisingly, PHA production was abrogated in the PA14  $\Delta$ *fadD1-fadD2* strain and the complementation with either *fadD1* or *fadD2* restored PHA to wild-type levels (Fig. 1). It is known that FadD acyl-CoA synthetases have a central role in fatty acid catabolism, and it has been shown that in some bacteria *fadD* defective mutants show an increase in the release of membrane lipids (Pech-Canul et al. 2011). Based on these results, we propose that the lack of PHA production is due to a defective catabolism of membrane lipids as a consequence of the *fadD1* and *fadD2* chromosomal deletions, and that one of these membrane fatty acids, when linked to CoA

**Fig. 1** PHA production is abrogated in PA14 derivatives lacking the  $\beta$ -oxidation pathway. Results are the average of three independent determinations, and the standard deviation is shown. It can be seen that deletion of *fadD1* and *fadD2* does not affect RL titer, but production of PHA is severely affected. Expression of *fadD1* and *fadD2* is from their own promoters, which were included in the fragment cloned in the pUCP20 vector



by the activity of FadD1 or FadD2, is essential for the initiation of PHA polymerization by the PhaC1 and PhaC2 synthases. The broad spectrum of fatty acid substrates of FadD1 and FadD2 acyl-CoA synthetases (Kang et al. 2010) explains why either of these two enzymes is capable of restoring PHA production in the PA14  $\Delta$ *fadD1-fadD2* strain.

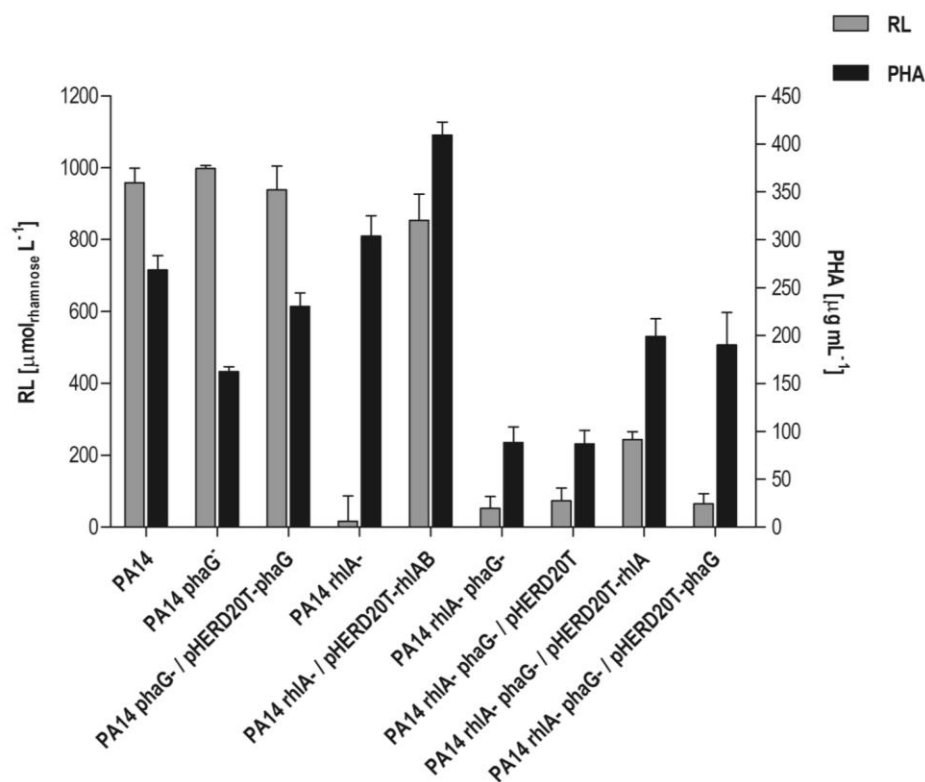
**RhIA produces intermediates for PHA biosynthesis** It has been shown that (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA (essential for PHA biosynthesis) is produced by the PhaG transacylase (Rehm et al. 1998). However, a *P. aeruginosa* PA14 *phaG* mutant still produces significant levels of PHA (Choi et al. 2011). Therefore, there should be another enzyme that supplies this PHA precursor besides PhaG. One candidate for this role in PHA production is RhIA, since it has been reported that *Pseudomonas putida* PhaG and *P. aeruginosa* RhIA have a high amino acid sequence identity (Rehm et al. 1998). We aligned the PhaG (PA14\_54830 locus) and RhIA (PA14\_19100 locus) amino acid sequences of *P. aeruginosa* PA14 and found they show 44.33% sequence identity (Supplementary Fig. S2), which is similar to the identity between the *P. putida* PhaG sequence and the *P. aeruginosa* RhIA sequence previously reported (Rehm et al. 1998). In addition, we found that the PhaG transacylase shares the catalytic triad of RhIA reported by Wittgens et al. (2017).

In order to determine whether RhIA participates in PHA biosynthesis, we constructed a PA14  $\Delta$ *rhlA*  $\Delta$ *phaG* strain and measured PHA production (Fig. 2). Like in previous studies, we found a lower PHA production in the PA14  $\Delta$ *phaG*

mutant compared with PA14 wild-type strain (this decreased production was fully complemented when *phaG* was expressed *in trans*, Fig. 2). Moreover, PA14  $\Delta$ *rhlA*  $\Delta$ *phaG* strain further decreased PHA production and, when this strain was complemented with *rhlA*, PHA production was restored to the PA14  $\Delta$ *phaG* strain level (Fig. 2). In addition, we found that PHA production presented a significant increment when the *rhlA* chromosomal deletion was complemented by a plasmid expressing either *rhlA* or the *rhlAB* operon (Fig. 2). Taken together, these results show that RhIA produces PHA precursors.

**RhIY and RhIZ generate the main fatty acid precursor for RL biosynthesis from FASII pathway** It has been established that PA14 enoyl-CoA hydratase RhIY and enoyl-CoA hydratase/isomerase RhIZ have an important role in RL biosynthesis, and that these enzymes provide RL precursors from  $\beta$ -oxidation intermediates (Abdel-Mawgoud et al. 2014). However, the results obtained here show that there is no change in RL production when carbon flux through  $\beta$ -oxidation is blocked (Fig. 1). In order to investigate the role of RhIY and RhIZ under a growth condition that uses glucose and peptone as carbon sources, we evaluated RL and PHA production in PA14  $\Delta$ *rhlY-rhlZ* and PA14  $\Delta$ *phaG*  $\Delta$ *rhlY-rhlZ* strains (Fig. 4a). Our results show that the deletion of *rhlY* and *rhlZ* decreased PHA production, leading to the levels produced by the PA14  $\Delta$ *phaG* strain, and PHA production was completely impaired in PA14  $\Delta$ *phaG*  $\Delta$ *rhlY-rhlZ* strain. Therefore, we conclude that RhIY and RhIZ provide

**Fig. 2** RhlA provides intermediates for PHA biosynthesis. Results are the average of three independent determinations, and the standard deviation is shown



precursors for PHA biosynthesis and constitute an alternative pathway to PhaG transacylase in their biosynthesis when *P. aeruginosa* is cultured in a medium with a non-fatty acid carbon source.

In the case of RL production, we found that in the PA14  $\Delta rhlY-rhlZ$  strain, their production was decreased by about 80% compared to PA14 (Fig. 3), as has been reported previously (Abdel-Mawgoud et al. 2014). Thus, we conclude that the product of the RhlY and RhlZ enzymes is an important precursor for PHA and RL biosynthesis, different from (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, since RL production by the *phaG* chromosomal deletion is not affected (Fig. 3). Furthermore, this conclusion is reinforced considering that in the PA14  $\Delta phaG \Delta rhlY-rhlZ$  strain RL production is not further affected compared to PA14  $\Delta rhlY-rhlZ$  strain (Fig. 3).

It has been recently reported (Gutiérrez-Gómez et al. 2018) that, in the PA14 background, RL overproduction can only be attained by using mutant derivatives that are completely impaired in PHA production (PA14 *phaG phaC1 phaC2* strain) and expressing the *rhlAB-R* operon from a plasmid. In order to investigate the role of RL precursors synthesized by RhlY and RhlZ, we overexpressed the *rhlAB-R* operon in the PA14  $\Delta phaG \Delta rhlY-rhlZ$  strain (which is also completely impaired in PHA production) (Fig. 4). We found that, despite *rhlAB-R* overexpression, there was no increased RL production in the PA14  $\Delta phaG \Delta rhlY-rhlZ$  strain. Based on these results, we reinforce the conclusion that RhlY and RhlZ provide the main

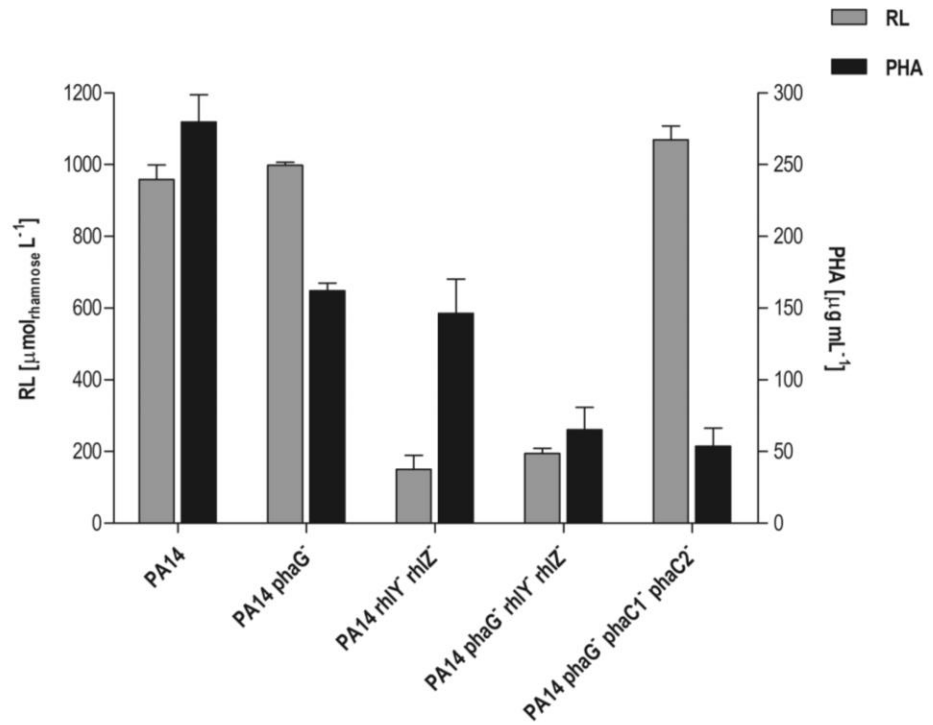
source of fatty acids moiety for RL biosynthesis and that (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, the product of PhaG, is not a RL precursor.

## Discussion

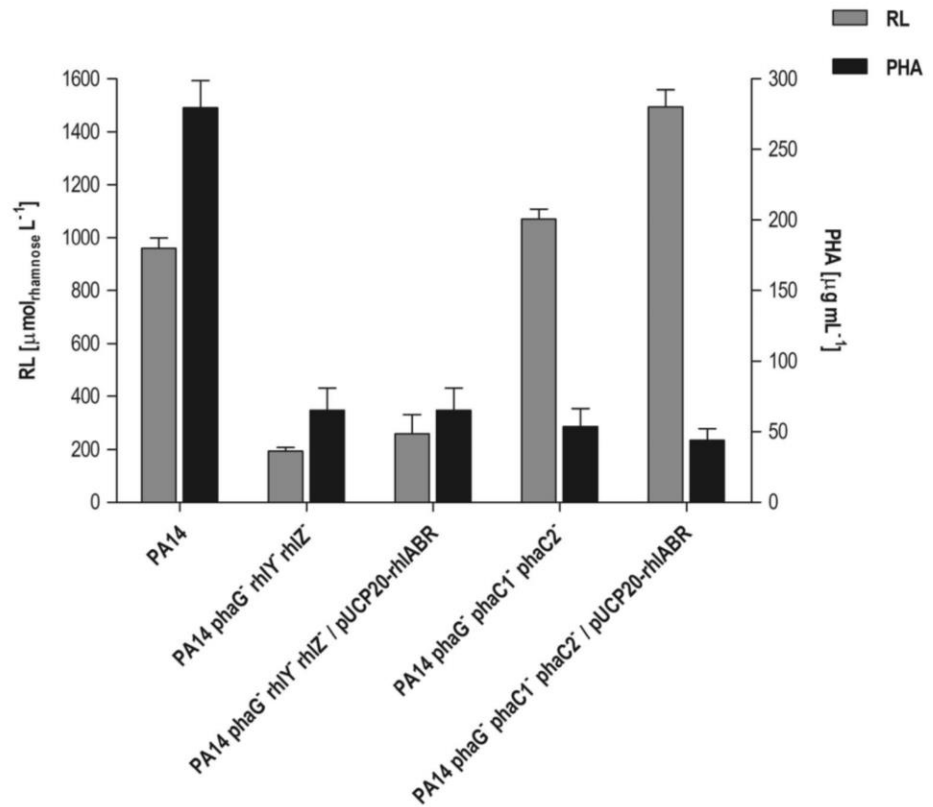
Previous studies have shown that *P. aeruginosa* is able to produce RL and PHA using either carbohydrates or fatty acids as carbon source (Abdel-Mawgoud et al. 2014; Chen et al. 2015; Vijay and Tarika 2018). In this work, we evaluate the contribution of the  $\beta$ -oxidation and FASII pathways for the synthesis of these compounds in a culture medium that contains glucose as the main carbon source (PPGAS medium) and we propose two new branches in the biosynthetic pathway that was previously described (Fig. 5). It is plausible that  $\beta$ -oxidation is active in *P. aeruginosa* PA14 under non-fatty acids growth conditions, since it has been reported that in some bacteria this metabolic pathway is present under this culture condition although at a low level, and that membrane fatty acids are the main carbon moiety catabolized under this scenario (Pech-Canul et al. 2011).

It was proposed that, even on non-fatty acid carbon sources,  $\beta$ -oxidation intermediates are used as RL precursors (Abdel-Mawgoud et al. 2014). The participation of the RhlY and RhlZ enzymes for RL synthesis was used as evidence for the expression of the  $\beta$ -oxidation pathway in this condition,

**Fig. 3** RhIY and RhIZ provide intermediates for PHA and RL biosynthesis under glucose growth conditions. Results are the average of three independent determinations and the standard deviation is shown



**Fig. 4** RhIY and RhIZ provide the main fatty acid moiety for RL biosynthesis. The *rhlAB-R* operon was expressed from its own promoter, which was included in the fragment cloned in the pUCP20 vector (Gutiérrez-Gómez et al. 2018)





substrate of PhaG), led us to hypothesize that RhlA could provide intermediates for PHA synthesis. This hypothesis was confirmed by the decreased PHA synthesis of the PA14  $\Delta phaG \Delta rhlA$  strain compared with the single *phaG* chromosomal deletion, and the complementation for PHA production of the PA14  $\Delta phaG \Delta rhlA$  strain with *rhlA* (Fig. 2). On the other hand, it has been demonstrated that PhaC1 and PhaC2 polymerize PHA from (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA precursors (Eggink et al. 1992; Langenbach et al. 1997). Therefore, we suggest that RhlA is involved in PHA production by its synthesis of HAA-CoA (a 3-hydroxyacyl-CoA dimer) (Fig. 5). It had been proposed that (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA—the PhaG product—is the link between RL and PHA biosynthesis (Abdel-Mawgoud et al. 2014). However, we conclude that (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA is not a RL precursor because *phaG* chromosomal deletion did not affect RL synthesis (Fig. 5).

The understanding of the metabolic pathway for the synthesis of RL and PHA is of great importance to establish metabolic engineering strategies to design *P. aeruginosa* derivatives that over produce RL.

**Funding** UGG is a doctoral student of Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and this article was performed in partial fulfillment of the requirements for UGG doctorate degree. UGG (CVU-422007) received a fellowship from CONACYT. This work was supported in part by grant IN201819 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, (Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM) and grant 252269 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical statement** This work was performed following the “Código Ético para el Personal Académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM” (Ethical Manual of the Biomedical Research Institute, UNAM).

## References

- Abbes I, Rihouey C, Hardouin J, Jouenne T, De E, Alexandre S (2018) Identification by mass spectrometry of glucosaminyl-phosphatidylglycerol, a phosphatidylglycerol derivative, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 32: 2113–2121. <https://doi.org/10.1002/rcm.8277>
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E (2014) A stereospecific pathway diverts  $\beta$ -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem Biol* 21(1):156–164
- Chandrasekaran EV, Bemiller JN (1980) Constituent analysis of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr Chem* 8:89–96
- Chen G-Q, Hajnal I, Wu H, Lv L, Ye J (2015) Engineering biosynthesis mechanisms for diversifying polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnol* 33(10):565–574
- Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho YH, Yoon SC (2011) Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *J Bacteriol* 151:30–42
- Eggink G, De Ward P, Huijberts GNM (1992) The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxy-alkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* 103:159–164
- Filloux A, Ramos J-L (eds) (2014) *Pseudomonas* methods and protocols. *Methods in molecular biology* 1149. Springer Protocols, Humana Press, New York
- Grosso-Becerra MV, González-Valdez A, Granados-Martínez MJ, Morales E, Servín-González L, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinosa R, Ponce-Soto GY, Cocotl-Yañez M, Soberón-Chávez G (2016) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9995–10004
- Gutiérrez-Gómez U, Soto-Aceves MP, Servín-González L, Soberón-Chávez G (2018) Overproduction of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 by redirection of the carbon flux from polyhydroxyalkanoate synthesis and overexpression of the *rhlAB-R* operon. *Biotechnol Lett* 40:1561–1566. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2610-8>
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77–86
- Kang Y, Zarzycki-Siek J, Walton CB, Norris MH, Hoang TT (2010) Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 5(10):e13557
- Langenbach S, Rehm BHA, Steinbüchel A (1997) Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 150:303–309
- Lesic B, Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol* 9:20–28
- Pech-Canul Á, Nogales J, Miranda-Molina A, Álvarez L, Geiger O, Soto MJ, López-Lara IM (2011) FadD is required for utilization of endogenous fatty acid released from membrane lipids. *J Bacteriol* 193(22):6295–6304
- Rehm BHA, Niels K, Steinbüchel A (1998) A new metabolic link between fatty acid *de novo* biosynthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis: the *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J Biol Chem* 273(37):24044–24051
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. edn. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:718–725
- Timm A, Steinbüchel A (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem* 209:15–30
- Vijay R, Tarika K (2018) Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using synthetic biology and metabolic engineering approaches. *Res J Biotech* 13(1):99–109
- Williams P, Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12: 182–191
- Wittgens A, Kovacic F, Müller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, Tiso T, Blank LM, Henkel M, Hausmann R, Sydlatk C,

- Wilhelm S, Rosenau F (2017) Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(7):2865–2878
- Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58:3276–3282
- Zhu K, Rock CO (2008) RhlA converts  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the  $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190(9):3147–3154

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.