



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Área terminal en Bioquímica y Biología molecular

**CARACTERIZACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA HIDROXILACIÓN DE
LÍPIDOS DE MEMBRANA**

TESIS

PRESENTA:

Maritza Lorena Vences Guzmán

Para obtener el Grado de

LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de tesis:

Dr. Christian Sohlenkamp

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Sinodales:

Dr. Ramón Antonio González García Conde, CIDC, UAEM

Dr. Armando Hernández Mendoza, CIDC, UAEM

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, Facultad de Medicina, UAEM

Dr. Raúl Peralta Rodríguez, CIDC, UAEM

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2022

Índice

1.- Agradecimientos y reconocimientos	1
2.- Abreviaturas	2
3.- Índice de tablas	3
4.- Índice de figuras.....	4
5.- Resumen	6
6.- Introducción	10
6.1.- Membranas bacterianas	10
6.2.- Lípidos de membrana de bacterias	13
6.2.1.- Biosíntesis del lípido de PE y 2-OH-PE	14
6.2.2.- Biosíntesis de lípidos de membrana sin fósforo en bacterias	15
6.2.2.1.- Lípidos de ornitina.....	16
6.2.2.1.1.- Estructura y biosíntesis de los lípidos de ornitina.....	16
6.2.2.1.2.- Biosíntesis de los lípidos de ornitina modificados	18
7.- Antecedentes.....	22
8.- Hipótesis	25
9.- Objetivo principal.....	25
10.- Objetivos particulares.....	26
11.- Metodología	27
11.1.- Estrategia 1.....	29
11.1.1.- Obtención de colonias transconjugantes de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	30
11.1.2.-Selección de las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> con el banco de cósmidos	30
11.1.3.- Identificación de posibles candidatas que contienen los genes implicados en la hidroxilación de OL y PE a partir de la extracción de lípidos marcados con acetato ¹⁴ C	31
11.1.3.1.- Marcaje de lípidos con [¹⁴ C] acetato	31
11.1.3.2.- Extracción de lípidos	32
11.1.3.3.- Cromatografía en capa fina (TLC).....	32
11.1.3.3.1.- Exposición en pantallas de fosfoimager, para la detección de lípidos	32
11.1.4.- Extracción los cósmidos identificados con el kit FosmidMAX™	33

11.1.5.- Identificación de los genes de OH-OLs y OH-PE	33
11.1.5.1.- Identificación de OH-OLs.....	33
11.1.5.2.- Identificación de OH-PE.....	33
11.1.6.- Obtención de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> (CaCl ₂)	34
11.1.7.- Transformación de <i>E. coli</i>	34
11.2- Estrategía 2.....	36
11.2.1.- Obtención de colonias mutantes de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 por medio de mutagénesis química	37
11.2.2.- Identificación de las colonias que muestren la ausencia de la hidroxilación de OL o de PE a partir de lípidos marcados con acetato [¹⁴ C].....	38
11.2.3.-Identificación los genes modificados de OH-OLs y OH-PE por mutagénesis química	39
12.- Resultados.....	41
13.- Discusión	57
14.-Conclusión.....	61
15.- Perspectivas	63
16.-Referencias bibliográficas.....	63
17.-Apéndice	67
17.1.-Medio de cultivo para todas las cepas utilizadas	68
17.2.- Fases móviles utilizadas, mostrándose solventes y proporción (v/v/v)	68
17.3.-Buffers y soluciones.....	68
17.3.1.-Electroforesis de ADN.....	68
17.3.2.-Buffer CP	68
17.4.-Genes mutados <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 tratada con MNNG 3mg/ml que podrían ser de interés.....	69
17.5 Anexos	72

1.- Agradecimientos y reconocimientos

A mi hija, Paulina Aitana Hernández Vences por mostrarme lo hermoso de la vida y motivarme a ser la mejor versión de mi misma.

A mis Padres, mis robles de vida, por sus consejos, apoyo y amor incondicional a lo largo de mi camino.

A mis hermanos:

Dr. Miguel A. Vences Guzmán que ha sido un pilar y ejemplo a seguir en mi formación académica, por su apoyo y amor incondicional.

Lic. Laura A. Vences Guzmán por brindarme su sinceridad, amor y apoyo incondicional en todo momento.

A mi abuela María Aranda por su amor y cariño que siempre me acompaña.

Al Dr. Christian Sohlenkamp por su comprensión, apoyo y calidad humana que me ha brindado a lo largo de mi formación académica y durante la realización de esta tesis.

A mis sinodales: Dr. Ramón Antonio González García Conde, Dr. Armando Hernández Mendoza, Fernando Roger Esquivel Guadarrama y el Dr. Raúl Peralta Rodríguez, por su paciencia, dedicación en la revisión y asesoramiento de este proyecto

2.- Abreviaturas

EGC: chronic granulomatous disease (enfermedad granulomatosa crónica)
CL: cardiolipin (cardiolipina)
DGTS: diacylglyceryl-*N, N, N*-trimethylhomoserine (diacilgliceriltrimetilhomoserina)
DMPE: dimethylphosphatidylethanolamine (dimetilfosfatidiletanolamina)
IM: inner membrane (membrana interna)
LL: lysine lipid (lípidido de lisina)
LOL: lyso-ornithine lipid (lisolípidido de ornitina)
LPS: lipopolysaccharide (lipopolisacárido)
MDO: membrane-derived oligosaccharides (oligosacáridos derivados de membrana)
MMPE: monomethylphosphatidylethanolamine (monometilfosfatidiletanolamina)
OL: ornithine lipid (lípidido de ornitina)
OM: outer membrane (membrana externa)
PC: phosphatidylcholine (fosfatidilcolina)
PCR: polymerase chain reaction (la reacción en cadena de la polimerasa)
PE: phosphatidylethanolamine (fosfatidiletanolamina)
PG: phosphatidylglycerol (fosfatidilglicerol)
TLC: thin layer chromatography (cromatografía en capa fina)
2-OH: a hydroxyl group at C2 of an esterified fatty acyl residue (un grupo hidroxilo en el C2 de un acilo esterificado)
2-OH-OL: OL hidroxilado en el C2 de un acilo esterificado
Lyso PE. 1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine
2-OH-PE: PE hidroxilada en el C2 de un acilo esterificado

3.- Índice de tablas

Tabla 1	Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.
Tabla 2	Lista de genes encontrados en cósmido seleccionado, por secuenciación masiva.
Tabla 3	Códigos de color para los mapas genómicos, donde cada gen muestra un color que se le relaciona con una vía metabólica célula.
Tabla 4	Número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 que se cuantificaron antes y después (0, 30 min, 1, 2, 3 y 4 horas) del tratamiento con MNNG (3 mg/ml).
Tabla 5	Porcentaje de supervivencia de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315, antes y después (0, 30 min, 1, 2, 3 y 4 horas) del tratamiento con MNNG (3 mg/ml).
Tabla 6	Mutaciones que comparten las cepas candidatas a tener el gen mutado involucrado en la hidroxilación de PE en <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315.
Tabla 7	Genes mutados únicamente presentes en la cepa S1 de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 tratada con MNNG 3mg/ml.
Tabla 8	Genes mutados únicamente presentes en la cepa S2 de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 tratada con MNNG 3mg/ml.
Tabla 9	Genes mutados únicamente presentes en la cepa S4 de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 tratada con MNNG 3mg/ml.

4.- Índice de figuras

Figura 1	Representación esquemática de la envoltura celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas.
Figura 2	Estructura del lípido-A-Kdo ₂ de <i>E. coli</i> y la reacción catalizada por LpxO en <i>S. typhimurium</i> propuesta por Gibbons <i>et al.</i> , (2008).
Figura 3	Estructuras de algunos fosfolípidos presentes en bacterias.
Figura 4	Biosíntesis de fosfatidiletanolamina en bacterias.
Figura 5	La biosíntesis de los lípidos de ornitina (OLs) en bacterias.
Figura 6	Biosíntesis de los OLs en bacterias.
Figura 7	Perfil lipídico de membrana de cepas de <i>B. cenocepacia</i> J2315 de tipo silvestre.
Figura 8	Perfil lipídico de membrana de cepas de <i>Bordetella bronchiseptica</i> de tipo silvestre.
Figura 9	Diagrama de flujo donde se esquematiza de manera general la metodología a seguir de la estrategia 1.
Figura 10	Diagrama de flujo donde se muestra el esquema general de metodología a seguir de la estrategia 2.
Figura 11	Perfiles lipídicos de membrana de cepas transconjugantes de <i>Bordetella bronchiseptica</i> con cósmido pLAFR3 con el genoma de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 y cepa silvestre.
Figura 12	Mapa genético del gen <i>BCAL0870</i> y <i>BCAL0884</i> putativo
Figura 13	Dominios conservados del gen <i>BCAL0870</i> .
Figura 14	Dominio conservado de <i>BCAL0884</i> .
Figura 15	Mapa genético del gen <i>BCAL2208</i> putativo.

Figura 16	Dominios conservados de <i>BCAL2208</i>
Figura 17	Curva de muerte de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 por tratamiento con MNNG. Representación gráfica de la curva de muerte <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315, antes y después (0, 30 min, 1, 2, 3 y 4 h) del tratamiento con MNNG (3 mg/ml); A partir de 30 min la cepa no mostró UFC/ml.
Figura 18	Perfiles lipídicos de membrana de cepa silvestre y mutantes de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2325.
Figura 19	Dominio conservado de <i>BCAL3475</i> .
Figura 20	Mapa genético del gen <i>BCAL3475</i> putativo de <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315.

5.- Resumen

La bacteria *Burkholderia cenocepacia* J2315, es un bacilo Gram-negativo, no esporulante, aeróbico y no fermentador (BGNNF) reconocido como un patógeno oportunista para plantas y humanos; en este último, tiene una especial predilección por el pulmón en pacientes con Fibrosis Quística (FQ) y con la enfermedad granulomatosa crónica por lo que se ha convertido en un importante patógeno en pacientes hospitalizados inmunodeprimidos. Cabe mencionar que los antibióticos convencionales ya no son eficaces (Araque, *et al.*, 2008).

Una característica interesante de esta cepa son sus lípidos polares de membrana, entre ellos fosfatidiletanolamina (PE) y los lípidos de ornitina (OLs), así como los derivados hidroxilados de estos, principalmente; 2-OH-OLs (OLs hidroxilados en el C2 del acilo esterificado), NL1 (OLs hidroxilados en el C2 del acilo amidificado), NL2 (OLs hidroxilados en el C2 de ambos acilos) y 2-OH-PE (PE hidroxilada en el C2 del acilo esterificado a la posición *sn*-2). Es común encontrar el lípido PE en la mayoría de las membranas celulares, al contrario de los OLs que están limitados a eubacterias; la ruta biosintética formado por las aciltransferasas OlsB y OlsA para los OLs sin hidroxilaciones se ha reportado por primera vez en *S. meliloti* 1021. Recientemente se reportó la enzima bifuncional OlsF, que realiza las dos acilaciones de la ornitina para formar los OLs en *Serratia proteamaculans* (Vences-Guzmán, *et al.*, 2015). Se desconoce todavía en varios casos cuales son los genes involucrados en la síntesis de estos lípidos modificados y cuáles son sus funciones en *Burkholderia cenocepacia* J2315, pero se ha reportado un aumento de estos lípidos modificados en situaciones de estrés, lo que podría indicar que la cepa lo utilice como una estrategia de sobrevivencia. Por lo tanto, en este proyecto, queremos identificar los genes que codifican para las hidroxilasas responsables de la modificación de PE y OL en *B. cenocepacia*. Se realizó un tamizaje de expresión movilizand una librería genómica a una cepa de *Bordetella* y se identificó un cósmido, cuya presencia causa la acumulación de OL hidroxilado a la cepa de

Bordetella. Entre los genes que contenía el cósmido identificamos tres genes candidatos: *BCAL0884*, *BCAL0870*, *BCAL2208*. Estos genes se estudiarán en detalle para identificar el gen responsable de la hidroxilación de OL. Por otro lado, se mutagenizó la cepa silvestre *B. cenocepacia* con MNNG (*N*-metil-*N*9-nitro-*N*-nitrosoguanidina), y el banco de mutantes se analizó para encontrar mutantes que carecían de los lípidos modificados. De tres mutantes que fenotípicamente presentaban una disminución en la producción de lípido PE-OH, se extrajo el ADN total y las muestras se enviaron para secuenciar, de los genes mutados obtenidos se propone el gen *BCAL3475*, que pueda participar en la hidroxilación de PE; contribuyendo como generador de conocimiento en el área de la salud (González-Silva, *et al.*, 2011; Vences-Guzmán, *et al.*, 2015; Geiger, *et al.*, 2010).

5.- Summary

Burkholderia cenocepacia J2315 is a gram-negative, non-sporulating, aerobic and non-fermenting bacillus (BGNNF) recognized as an opportunistic pathogen for plants and humans. In the latter, it has a special predilection for the lung in patients with Cystic Fibrosis (CF) and with chronic granulomatous disease, which is why it has become an important human pathogen in immunosuppressed hospitalized patients. It should be mentioned that conventional antibiotics are no longer as effective against this bacterium (Araque, *et al.*, 2008).

An interesting characteristic of this strain is its polar membrane composition: phosphatidylethanolamine (PE) and ornithine lipids (OLs), as well as the hydroxylated derivatives of these, mainly 2-OH-OLs (OLs hydroxylated in the C2 of the esterified acyl group), NL1 (OLs hydroxylated in the C2 of the amidified acyl group), NL2 (OLs hydroxylated in the C2 of both acyl groups) and 2-OH-PE (PE hydroxylated in the C2 of the acyl esterified in position *sn*-2) can be found. The biosynthetic route for non-hydroxylated OLs involving the two acyltransferases OlsB and OlsA has been reported first in *S. meliloti* 1021. Recently, the bifunctional enzyme OlsF performing the two acylations of ornithine to form the OLs, was reported in *Serratia proteamaculans*. It is worth mentioning that the increase of these modified lipids has been reported in stress situations, so the strain probably uses it as a survival strategy. The genes involved in the formation of these modified lipids and their functions in *Burkholderia cenocepacia* J2315 are still not known. Therefore, in this project we set out to identify the hydroxylases responsible for the hydroxylation of PE and OL in *B. cenocepacia*. A genomic library of *B. cenocepacia* was mobilized to a *Bordetella* strain and a cosmid causing the accumulation of hydroxylated OL in the latter was identified. Within the DNA insert of this cosmid three candidate genes were identified: *BCAL0884*, *BCAL0870*, *BCAL2208*. These genes will be studied in detail to identify the gene responsible for the hydroxylation of OL. On the other hand, *B. cenocepacia* wildtype was mutagenized using MNNG (*N*-methyl-*N*9-nitro-*N*-nitrosoguanidine), and during a screen three mutants

phenotypically presenting a decrease in the production of PE-OH were identified and their genomes were sequenced, of the mutated genes obtained, the *BCAL3475* gene is proposed, which can participate in the hydroxylation of PE, thereby contributing to the generation of knowledge in this area of health (González-Silva, *et al.*, 2011; Vences-Guzmán, *et al.*, 2015; Geiger, *et al.*, 2010).

6.- Introducción

6.1.- Membranas bacterianas

La membrana celular lleva a cabo funciones celulares muy importantes, por una parte, tiene la función de separar el contenido interior de la célula del medio exterior, sirviendo como una barrera selectiva y de permeabilidad para la entrada o la salida de moléculas, evitando así, la pérdida pasiva de componentes del citoplasma y la entrada indiscriminada de constituyentes. Además, la membrana celular también participa en diversas funciones, por ejemplo; la movilidad, la biosíntesis de ATP, toxicidad, entre otras.

Las bacterias son microorganismos procariotas con un tamaño general de 0,5 y 5 μm de longitud. Una de las divisiones más usadas en microbiología surge a partir de la técnica de tinción de Gram por el bacteriólogo danés Christian Gram; donde se clasifican por; las Gram positivas y las Gram negativas, ambos grupos se diferencian en la estructura de su envoltura celular (Fig.1). Una característica de las Gram positivas es la presencia de una pared celular formada por varias capas de peptidoglicano y una membrana interna (MI), a diferencia de las Gram negativas que contienen una MI, una membrana externa (ME) y pequeña capa de péptidoglicano en la cara interna de la ME, dentro del espacio intermembranal conocido como espacio periplasmático (Madigan, *et al.*, 2006).

El espacio periplasmático de las bacterias Gram negativas, es un espacio de importancia osmótica y transporte de metabolitos ya que se acopla a motores moleculares por medio de subunidades proteicas y transportadores que presentan cambios conformacionales, los cuales permiten el movimiento de los sustratos, estos cambios conformacionales se asocian con la fuerza motriz de protones, de esta manera, la energía metabólica se acopla a mecanismos de transporte de oligosacáridos, enzimas hidrolíticas, proteínas, sustancias toxinas entre otros

sustratos, hacia la membrana externa (Fig.1) (Rock *et al.*, 2008; Murakami, *et al.*, 2020).

La MI está compuesta principalmente por fosfolípidos y proteínas, por otro lado, la ME es la primera barrera en las Gram negativas, en ella están embebidas las porinas, que actúan como canales para la entrada y salida de sustancias hidrofóbicas de bajo peso molecular. También se encuentra el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina (Madigan, *et al.*, 2006).

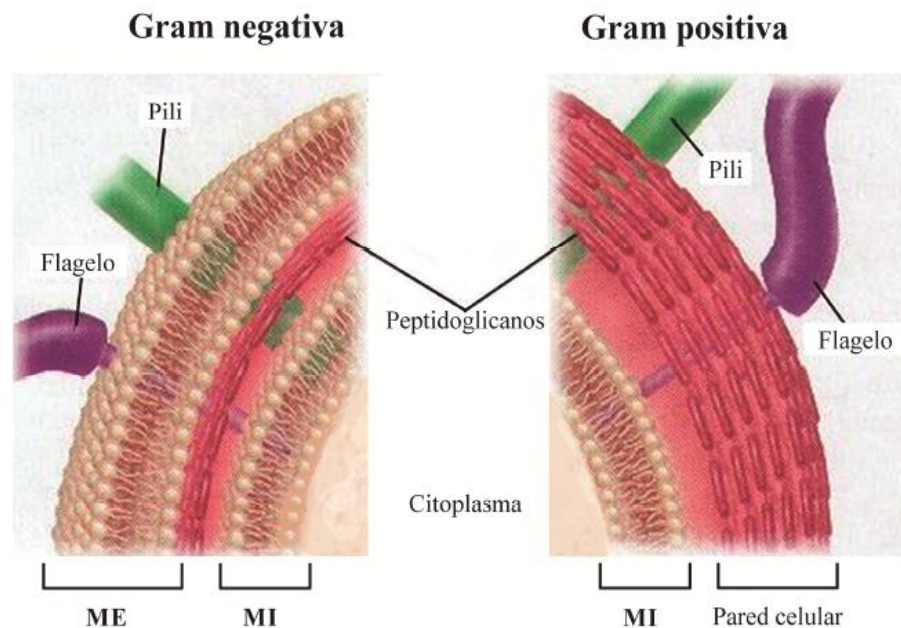


Figura 1. Representación esquemática de la envoltura celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las bacterias Gram negativas presentan las siguientes características: una membrana citoplasmática o membrana interna (MI) compuesta principalmente de lípidos polares como por ejemplo los fosfolípidos, una capa delgada de peptidoglicanos (más delgada que en las bacterias Gram positivas), y una membrana externa (ME) que contiene lipopolisacáridos (LPS). Entre la MI y la ME existe un espacio denominado espacio periplásmico. No obstante, las bacterias Gram positivas generalmente presentan las siguientes características: la MI, una capa gruesa de peptidoglicanos, y la presencia del ácido teicoico, el cual es una característica única de las bacterias Gram positivas. En el caso de que se presenten, los pili los flagelos se encuentran embebidos a las dos membranas. Figura tomada y modificada de The biology corner, s.f.

El LPS se compone de dos regiones principales: un núcleo o core compuesto de un heteropolisacárido y una región lipídica, conocida como lípido A (Gluconolípido), estas dos regiones están unidas por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (Kdo). El lípido A se constituye de la unión dos glucosaminas forforiladas, estas glucosaminas están esterificadas de ácidos grasos como, el ácido laúrico, ácido mirístico, ácido caproico, ácido palmítico y ácido esteárico (Fig. 2); siendo el lípido A el ancla a la membrana externa bacteriana

. Este lípido A se puede modificar en condiciones de estrés o durante la interacción con su hospedero eucariota, siendo estimulante del sistema inmune. Algunos LPS adicionalmente contienen el antígeno O, una región sacárida que se encuentra unido al núcleo del LPS (Mandrell, et al., 1993; Raetz, et. al., 2007).

En algunos géneros bacterianos como *Salmonella* y *Pseudomonas* se han descrito modificaciones en este lípido A, que podrían indicar una mayor estabilidad e impermeabilidad de la ME a algunos compuestos en condiciones específicas de crecimiento (Nikaido, et al., 2003; Gibbons, et al., 2008).

Una de estas modificaciones en *S. typhimurium* es la hidroxilación de un ácido graso en la posición 2 (2-OH) de un residuo esterificado al carbono en la posición 3 del ácido mirístico. Esta hidroxilación es catalizada por la dioxigenasa LpxO dependiente de Fe^{2+} , O^2 y α -cetoglutarato para producir el 2-OH A-Kdo2 (Fig. 2) (Gibbons et al., 2005; Gibbons et al., 2000; Gibbons et al., 2008). Una de las estrategias de neutrófilos humanos es con una o más enzimas desacilan parcialmente el lípido A de *S. typhimurium*, eliminando los ácidos grasos no hidroxilados (Hall, et al., 1983)

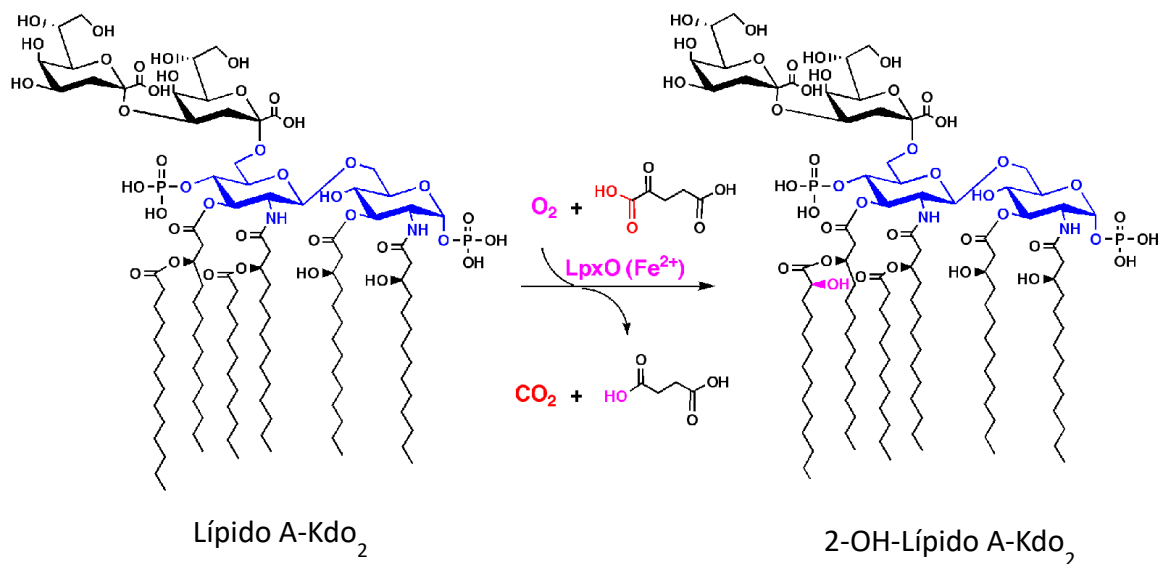


Figura 2. Estructura del lípido A-Kdo₂ de *E. coli* y la reacción catalizada por LpxO en *S. typhimurium* propuesta por Gibbons, *et al.*, 2008. El LpxO cataliza la 2-hidroxilación del residuo de miristato unido al C3 del acilo que está unido a la posición 3' del lípido A-Kdo₂ hexaacilado para producir el 2-OH- lípido A-Kdo₂. Modificado de Gibbons, *et al.*, 2008.

6.2.- Lípidos de membrana de bacterias

Los lípidos de membrana cumplen muchas funciones esenciales para la sobrevivencia de los organismos, por ejemplo, interviene en procesos energéticos, reguladores, de transporte, etc. Sin embargo, una de sus funciones principales es estructural; estos lípidos se clasifican como lípidos saponificables complejos y son de carácter anfifílico, se componen de un extremo hidrofílico siendo este su grupo cabeza y un extremo hidrofóbico que son cadenas hidrofóbicas largas de acilo o alquilo (Fig. 3) (Dowhan, *et al.*, 2008). Con el estudio del metabolismo de los lípidos bacterianos se ha podido comprender un poco más, las vías metabólicas básicas de lípidos, mecanismos enzimáticos y regulación transcripcional (Parsons, *et al.*, 2013). *Escherichia coli* uno de los principales modelos estudio, posee los

glicerofosfolípidos: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) (Fig. 3) (Rock, *et al.*, 2008).

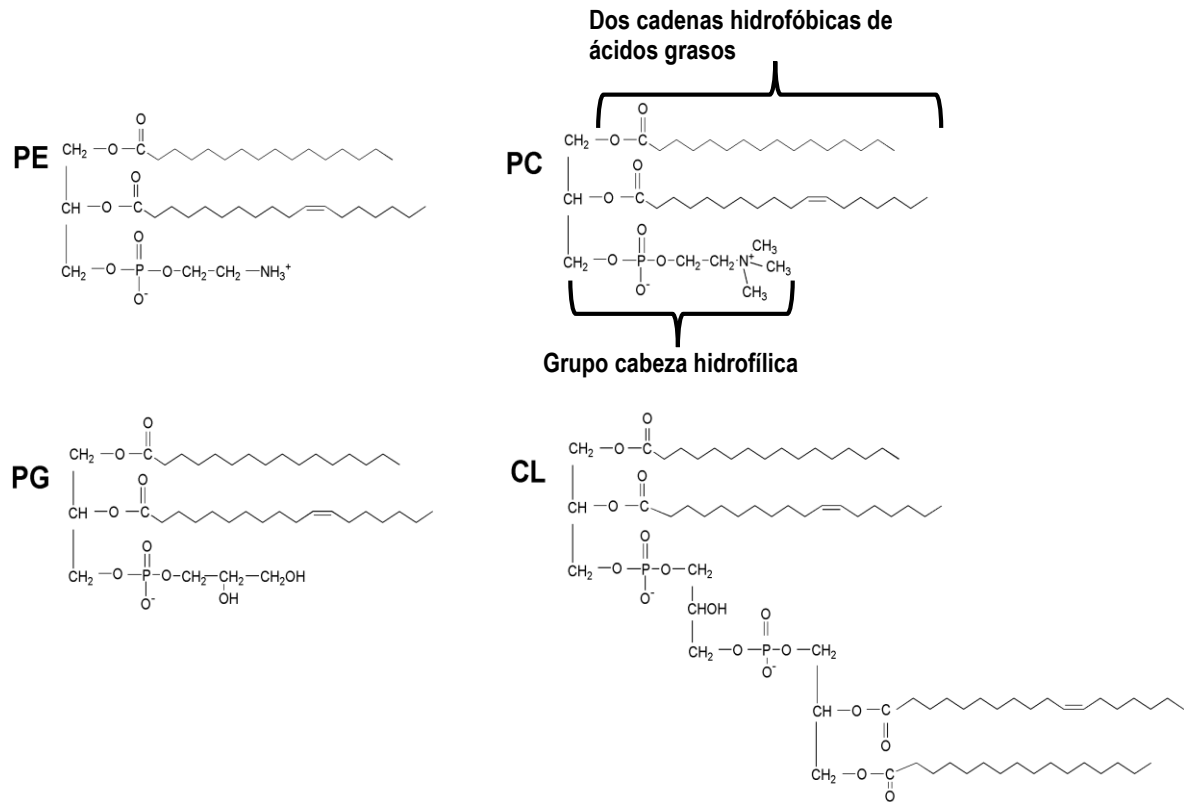


Figura 3. Estructuras de algunos fosfolípidos presentes en bacterias. Fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC). En el caso de la PC la parte hidrofóbica y la parte hidrofílica del fosfolípido está señalada. Tomada de Vences-Guzmán, *et al.*, 2014

6.2.1.- Biosíntesis del lípido de PE y 2-OH-PE

En algunas bacterias el lípido de fosfatidiletanolamina (PE) se encuentra en mayor proporción que el resto; por ejemplo, en *E. coli* compone el 80% de su MI. (Neidhardt, *et al.*, 1996). La síntesis de PE comienza a partir de CDP-DAG (Cytidine Diphosphate Diacylglycerol). En el paso inicial, la PS sintasa (PssA) condensa el CDP-DAG con el aminoácido L-serina, formando el lípido aniónico fosfatidilserina

(PS) y libera CMP. Después ocurre la descarboxilación de PS, catalizado por la PS descarboxilasa (Psd), obteniendo como productos el lípido de PE y CO₂ (Rock, *et al.*, 2008 y Sohlenkamp, *et al.*, 2015). Se han visto lípidos modificados de PE en algunos géneros bacterianos como *Ralstonia* y *Burkholderia*, se deduce que probablemente una enzima desconocida cataliza la formación de 2-OH-PE a partir de PE (González-Silva, *et al.*, 2011).

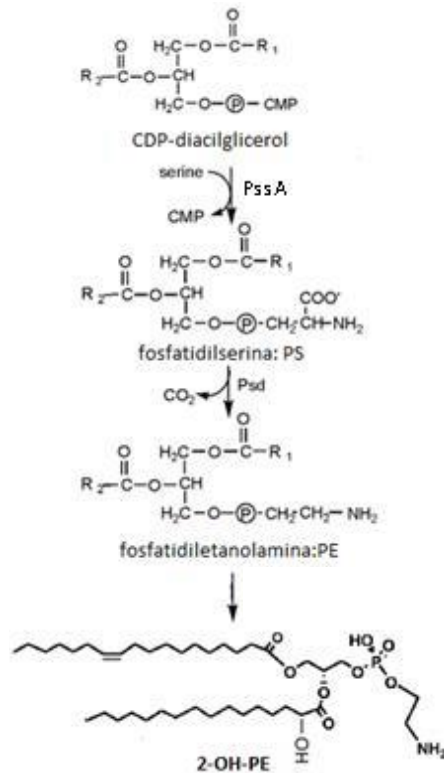


Figura 4- Biosíntesis de fosfatidiletanolamina en bacterias. El primer paso de la síntesis de fosfatidiletanolamina es la condensación de CDP-diacilglicerol con serina para formar fosfatidilserina catalizado por la sintasa de PS (PssA). En el segundo paso, la descarboxilación de PS es catalizada por PS descarboxilasa (Psd) para producir PE, la enzima responsable de 2-OH-PE es desconocida. Tomada y modificada de González-Silva, *et al.*, 2011.

6.2.2.- Biosíntesis de lípidos de membrana sin fósforo en bacterias

Algunas bacterias pueden formar lípidos libres de fósforo en respuesta a ambientes en limitación de fosfato. El grupo cabeza hidrofílico fosfatado de los

lípidos se reemplaza con otro grupo libre de fosforo o aminoácidos, como, por ejemplo: lisina, glicina, glutamina, serinaglicina y ornitina entre otros (Parsons, *et al.*, 2013). Más específicamente se ha observado el remplazo de los lípidos fosfatados de PE, PG o PC de sus membranas con lípidos de membrana libres de fósforo como: SL (sulfoquinovosildiacilglicerol), DGTS (diacilgliceriltrimetilhomoserina), SQD (sulfoquinovosil diacilglicerol, GL (lípidos de glicina) u OLs (lípidos de ornitina) (Sohlenkamp, *et al.*, 2015). Un ejemplo estudiado en 1999 por Geiger, *et al.*, en *Sinorhizobium meliloti* 1021 como modelo de estudio, que en condiciones estándar produce los lípidos de membrana; PG, CL, PE y PC; sin embargo, al crecer esta cepa con limitación de fosfato, algunos de sus fosfolípidos son reemplazados por lípidos que no contienen fosforo como; SL, DGTS y OLs (Geiger, *et al.*, 1999). La expresión de varias de las enzimas requeridas para la síntesis de DGTS está regulada por el regulador transcripcional PhoB y se induce en condiciones limitantes de fosfato (Ulrich, *et al.*, 2005), por ejemplo, la fosfolipasa C SMC00171 de *S. meliloti* que es responsable de la conversión de PC a DAG (precursor de DGTS) y fosfocolina (Zavaleta, *et al.*, 2010). Estos mecanismos se ven involucrados como estrategia para ocupar el limitado fosforo en otros procesos celulares.

6.2.2.1.- Lípidos de ornitina

6.2.2.1.1.- Estructura y biosíntesis de los lípidos de ornitina

Los lípidos de ornitina (OL), han sido uno de los lípidos libres de fosforo más estudiados, se han descrito en algunos géneros bacterianos, sin embargo, en arqueas y eucariontes no están presentes. En las bacterias Gram negativas estos lípidos se encuentran enriquecidos en la ME y se ha observado el aumento de estos lípidos cuando la bacteria en cuestión se crece en ambientes con baja concentración de fosfato, actuando como sustituto a fosfolípidos. También, se ha reportado su

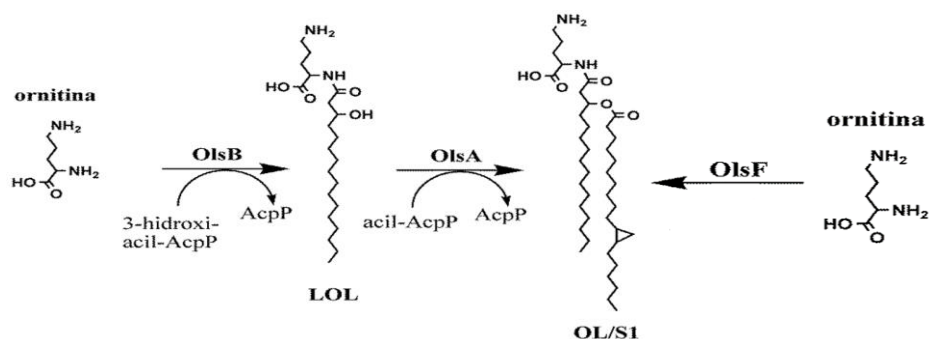
presencia en algunas Gram positivas, como *Streptomyces*, y *Mycobacterium* (López-Lara, *et al.*, 2003; Geiger *et al.*, 2010; Vences-Guzmán, *et al.*, 2012; Parsons, *et al.*, 2013; Kim, *et al.*, 2018).

En 2004 se describió por completo una de las vías para la biosíntesis de lípidos de ornitina en *Sinorhizobium meliloti*, en dos pasos;

1.- La *N*-aciltransferasa OlsB, que cataliza la transferencia de un grupo acilo 3-hidroxiado, desde una proteína acarreadora de acilos (ACP), al grupo α -amino de la ornitina, formando el lisolípido de ornitina (LOL).

2.- La *O*-aciltransferasa OlsA cataliza la transferencia de otro grupo acilo, desde una ACP, al grupo 3-hidroxi del LOL, formando el OL (Gao, *et al.*, 2004; Weissenmayer, *et al.*, 2002; Vences-Guzmán, *et al.*, 2014)

Sin embargo, años más tarde se descubrió a OlsF, una proteína bifuncional sintasa de *Serratia proteamaculans* que cataliza ambas reacciones de OlsB y OlsA en un paso para la biosíntesis de lípidos de ornitina (Vences-Guzmán *et al.*, 2015) (Fig. 5)



Weissenmayer, *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004;

Vences, *et al.*, 2015

Figura 5.- La biosíntesis de los lípidos de ornitina (OLs); Weissenmayer, *et al.*, 2002; Gao, *et al.*, 2004; Vences-Guzmán, *et al.*, 2015.

6.2.2.1.2.- Biosíntesis de los lípidos de ornitina modificados

Ya desde hace varias décadas se sabe que diferentes géneros bacterianos producen lípidos de ornitina que pueden presentar modificaciones, por ejemplo; *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Thiobacillus*, *Gluconobacter*, *Streptomyces* y *Ralstonia* (González-Silva, *et al.*, 2011), sin embargo, se desconocían los genes y enzimas involucrados. Esto ha cambiado un poco durante los últimos años cuando se identificaron varios genes/enzimas responsables para la modificación de OLs. Rojas-Jiménez, *et al.*, en 2005 y Vences-Guzmán, *et al.*, en 2011 describieron en detalle la biosíntesis de los OLs hidroxilados en *Rhizobium tropici* CIAT889; la cual forma cuatro clases moleculares de OLs S1, S2, P1 y P2 (Fig. 6). OlsC transforma las dos formas menos polares de los OLs (sustratos, S1 y S2) a las dos formas más polares (productos, P1 y P2). La conversión de S1 y S2 a P1 y P2, respectivamente, es por una hidroxilación en el C2 del acilo esterificado de los OLs.

OlsE hidroxila el S1 en el C-4 de la ornitina para convertirlo en los OLs S2 y también modifica a los OLs P1 para convertirlos en los OLs P2 (Fig. 6). También se reportó la hidroxilación de S1 a S2 de *A. tumefaciens* C58 (Vences-Guzmán, *et al.*, 2013).

OlsG del planctomiceto *Singulisphaera acidiphila* es una *N*-metiltransferase. Una caracterización *in vitro* muestra que OlsG es responsable de la triple *N*-metilación del grupo cabeza de los OL. La metilación depende de la presencia del detergente Triton X-100 y del metildonor *S*-adenosilmetionina. (Escobedo- Hinojosa, *et al.*, 2015).

En *Burkholderia cenocepacia* J2315 se identificaron dos ORFs homólogos a la enzima LpxO de *Salmonella* (BCAM1214 y BCAM2401 [OlsD]). LpxO (2-OH) es responsable para la hidroxilación de residuos de miristato esterificados del lípido A. El gen *olsD* de dicha bacteria codifica para la enzima que hidroxila al C2 del grupo acilo amidificado de los OLs estándar y de los 2-OH-OLs, produciendo a los OLs

NL1 y NL2 (González-Silva, *et al.*, 2011; Diercks, *et al.*, 2015). Sin embargo, ninguno de los dos ORFs formó los 2-OH-OL en *B. cenocepacia* J2315 a partir de los OLs estándar, lo que sugiere que la enzima responsable de sintetizar los 2-OH-OLs en esta bacteria no es un homólogo de OlsC/LpxO (González-Silva, *et al.*, 2011 y Vences-Guzmán, *et al.*, 2011).

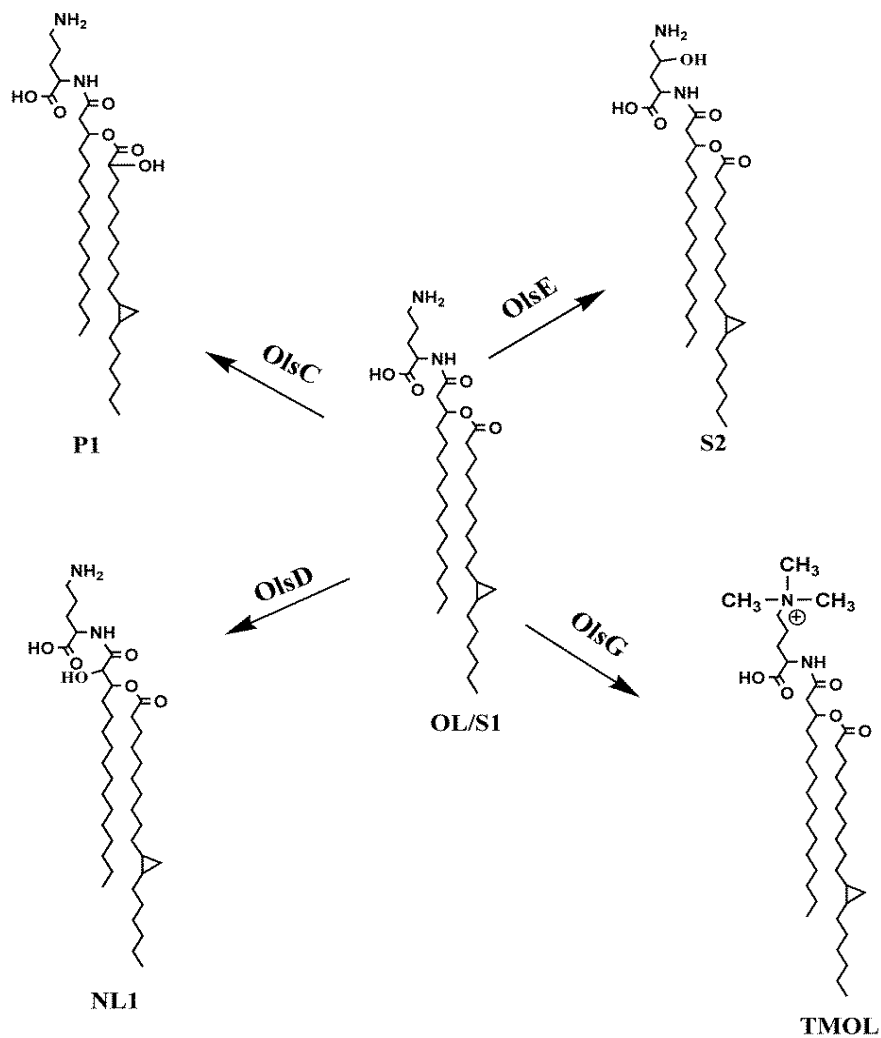


Figura 6. Biosíntesis de los lípidos OLs en bacterias. OlsC transforma las dos formas menos polares de los OLs para convertirlos en P1 y P2. OlsE hidroxila el S1 en el C-4 del residuo de ornitina para convertirlo en los OLs S2 (Vences-Guzmán, *et al.*, 2013). OlsG es responsable de la triple metilación del grupo cabeza de los OL (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2015). El gen *olsD* codifica para la enzima que hidroxila al C2 del acilo amidificado

de los OLS estándar y de los 2-OH-OLS, produciendo a los OLS NL1 y NL2 (González-Silva, *et al.*, 2011). Imagen elaborada por el Dr. Sohlenkamp Christian (Datos no publicados).

7.- Justificación

Burkholderia cenocepacia J2315 es un patógeno nosocomial del complejo *Burkholderia cepacia* (BCC) que infecta a individuos con fibrosis quística o con la enfermedad granulomatosa crónica, causa una alta tasa de mortalidad y es altamente transmisible, además, de que la respuesta inflamatoria es más robusta en las células del hospedador comparado con otras especies del BCC (Martina, *et al.*, 2013; Mahenthiralingam, *et al.*, 2005).

La variedad de factores de virulencia para las bacterias de este grupo es amplia, aunque no todos han demostrado tener un rol en la patogénesis de las enfermedades humanas o estar presentes en todas las especies. Pensamos que los lípidos de membrana hidroxilados, en especial PE hidroxilado y OLs hidroxilados pueden jugar un papel importante durante estas infecciones.

Cabe mencionar que, en ciertas condiciones de crecimiento, las modificaciones de los lípidos de membrana con hidroxilaciones pueden estar implicadas en la estabilidad de la membrana externa y la disminución de permeabilidad a ciertos compuestos (Nikaido, *et al.*, 2003; González-Silva, *et al.*, 2011). Las identificaciones de los genes implicados en las hidroxilaciones en el C2 de PE y OLs podrían ayudar a elucidar la función que conllevan, posteriormente se podrían realizar ensayos de patogenicidad y así, contribuir como base para la creación de nuevos antibióticos.

7.- Antecedentes

Importancia epidemiológica de *Burkholderia cenocepacia*

En los años 70 se obtuvo evidencia de que el género *Burkholderia* era el principal patógeno en la infección a individuos con fibrosis quística y con la enfermedad granulomatosa crónica; trayendo consigo una alta tasa de mortalidad y alta transmisibilidad. Para los años 90 demostró ser *B. cenocepacia* la especie de mayor prevalencia en el mundo en pacientes con FQ (Rojas-Rojas, *et al.*, 2018).

Se ha reportado que los lípidos de membrana pueden tener en algunas bacterias un papel importante en la patogenicidad y *Burkholderia cenocepacia* J2315 tiene la particularidad de producir CL, PG, PE y OLs, así como los derivados 2-hidroxilados de PE y OLs (2-OH-PE y 2-OH-OLs, respectivamente). Todavía no se conocen exactamente las funciones de estos lípidos modificados por lo que su estudio tiene gran relevancia en el campo de la salud (Martina, *et al.*, 2013; González-Silva, *et al.*, 2011).

Dioxigenasas homólogas a LpxO en *Burkholderia cenocepacia* J2325

En 2011 se postuló que homólogos a LpxO (putativas β -hidroxilasas) de *Salmonella Typhimurium* podrían ser responsables para la hidroxilación de OL en el ácido graso esterificado. Se identificaron los dos marcos de lectura de *B. cenocepacia* J2315: BCAM1214 y BCAM2401. Se encontró que BCAM1214 no está involucrada en la hidroxilación de OL ni de PE, sin embargo, BCAM2401 (OlsD) hidroxila el acilo amidificado de los OLs cuando las bacterias se crecen en condiciones ácidas. Sin embargo, ninguno de estos dos ORFs formó los 2-OH-OL en dicha bacteria a partir de los OLs estándar, lo que sugiere que la responsable de sintetizar los 2-OH-OLs en esta bacteria no es homóloga a LpxO (González-Silva, *et al.*, 2011).

Es por ello, que se proponemos diferentes estrategias de búsqueda de estos genes, que implican:

1. Realizar un tamizaje de expresión funcional: *Bordetella bronchiseptica*, es una beta-proteobacteria relativamente cercano a *B. cenocepacia*, pero no forma OLs hidroxilados. Se movilizará una librería genómica de *B. cenocepacia* a *Bordetella bronchiseptica* y se analizarán los transconjugantes buscando la presencia de OLs hidroxilados. Entre los genes que lleva el inserto de ADN se debe encontrar el gen que codifica para la hidroxilasa que se está buscando. Este enfoque es análogo al implementado por Vences-Guzmán, *et al.*, en 2011 con *Rhizobium tropici* CIAT899 para la identificación de OlsE.
2. Realizar una mutagénesis química del genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315. Se analizará la composición lipídica de los mutantes y se buscarán aquéllos que carecen de los lípidos hidroxilados. Este enfoque es similar al implementado por Rudder, *et al.*, en 1997 con *Rhizobium meliloti* 1021 para la obtención de mutantes deficientes en síntesis del fosfolípido PC.

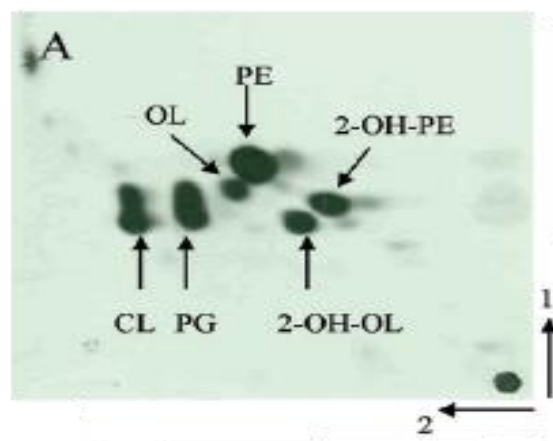


Figura 7. Perfil lipídico de membrana de cepas de *B. cenocepacia* J2315 de tipo silvestre. Contiene un plásmido vacío pJG16. Separación de lípidos marcados con [^{14}C] acetato por TLC bidimensional. Tomada y modificada de (González-Silva, *et al.*, 2011).

Papel de *Bordetella bronchiseptica*

En la búsqueda de cepas homólogas a *B. cenocepacia* para cepas receptoras para el tamizaje de expresión funcional, nos enfocamos en las β -proteobacterias, porque era importante que los promotores de *B. cenocepacia* fueran funcionales regulando la expresión. Basado en estudios de lípidos de membrana se consideraron como candidatos los siguientes géneros:

- *Ralstonia*; PG, PE, PE-2OH, lyso-PE, OL, LPG
- *Neisseria*; PG, CL, PE, lyso-PE
- *Bordetella*; PG, CL, PE, OL, lyso-PE

B. bronchiseptica es una de las nueve especies que componen el género *Bordetella*. Sin embargo, esta cepa se diferencia del resto por presentar menores requisitos nutricionales y una mayor velocidad de crecimiento en iguales condiciones de cultivo. Además, puede producir sin estrés por deficiencia de fosfato; lípidos de PE y OLs, pero no produce sus derivados hidroxilados (Fig. 8), ventajas por las que se toma como cepa blanco ideal para estudiar la función que desempeña la modificación 2-OH en PE y OLs en *B. cenocepacia* J2315. (Bottero, *et al.*, 2010; Sohlenkamp, *et al.*, 2015; Fingermann, *et al.*, 2011).

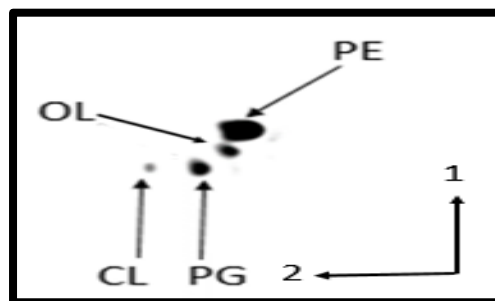


Figura 8. Perfil lipídico de membrana de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de tipo silvestre.

Separación de lípidos marcados con [^{14}C] acetato por TLC bidimensional.

8.- Hipótesis

Con base en las observaciones de la composición lipídica de la cepa patógena oportunista *Burkholderia cenocepacia* J2315, se propone que existe un gen que codifica para la enzima responsable de la modificación del lípido 2-OH-OL y así mismo otro para 2-OH-PE.

9.- Objetivo principal

Identificar y (si posible) caracterizar los genes involucrados en la hidroxilación de lípidos de ornitina y fosfatidiletanolamina en *Burkholderia cenocepacia* J2315.

10.- Objetivos particulares

Estrategia 1:

- 1.- Obtener colonias transconjugantes de *Bordetella*.
- 2.- Identificar los cósmidos que contienen los genes implicados en la hidroxilación de OL, PE o ambos.
- 3.- Mutagenizar los cósmidos, mandar a secuenciación masiva y caracterizar.

Estrategia 2:

- 1.- Realizar una mutagénesis química del genoma de la cepa silvestre.
- 2.- Identificar las colonias mutantes que presentan ausencia de lípidos hidroxilados de OL, PE o ambos.
- 3.- Mandar a secuenciar y caracterizar.

11.- Metodología

Tabla 1.- Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS Y PLASMIDOS	ESPECIFICACIONES	RESISTENCIA	REFERENCIA
Cepas			
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA1</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15.		(Hanahan, <i>et al.</i> , 1983).
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Cepa silvestre, no produce OLs ni PE hidroxilados.	Estreptomicina	(Kawai, <i>et al.</i> , 1982).
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	Cepa silvestre, que produce OH-OLs y OH-PE.		(González-Silva, <i>et al.</i> , 2011).
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> λ (DE3), cepa de expresión.	Cloramfenicol	(Studier, <i>et al.</i> , 1990).
<i>E. coli</i> BL21 con OlsF	Cepa que produce OLs, pET9a/OlsF, cepa de expresión	Spectinomicina	(Vences-Guzmán, <i>et al.</i> , 2015).
<i>E. coli</i> SY327 con pLAFR3	Cepa con librería de cósmidos del genoma de <i>Burkholderia</i> J2315	Tetraciclina	Este trabajo
<i>E. coli</i> Cel 40	Cepa con pRK2013	Kanamicina	(Ditta, <i>et al.</i> , 1985)
Cósmidos y plásmidos			

pLAFR3	Cósmido vacío de amplio rango hospedero.	Tetraciclina	Este trabajo
pET9a	Vector de expresión para <i>E. coli</i> .	Kanamicina	(Studier, <i>et al.</i> , 1991)
pDUET/OlsF	Vector de expresión con el gen <i>OlsF</i> clonado como <i>NdeI/BamHI</i> .	Espectinomicina	(Vences-Guzmán, <i>et al.</i> , 2015)
pRK2013	Plásmido de amplio rango de hospedero.	Kanamicina	(Ditta, <i>et al.</i> , 1985)

11.1.- Estrategia 1

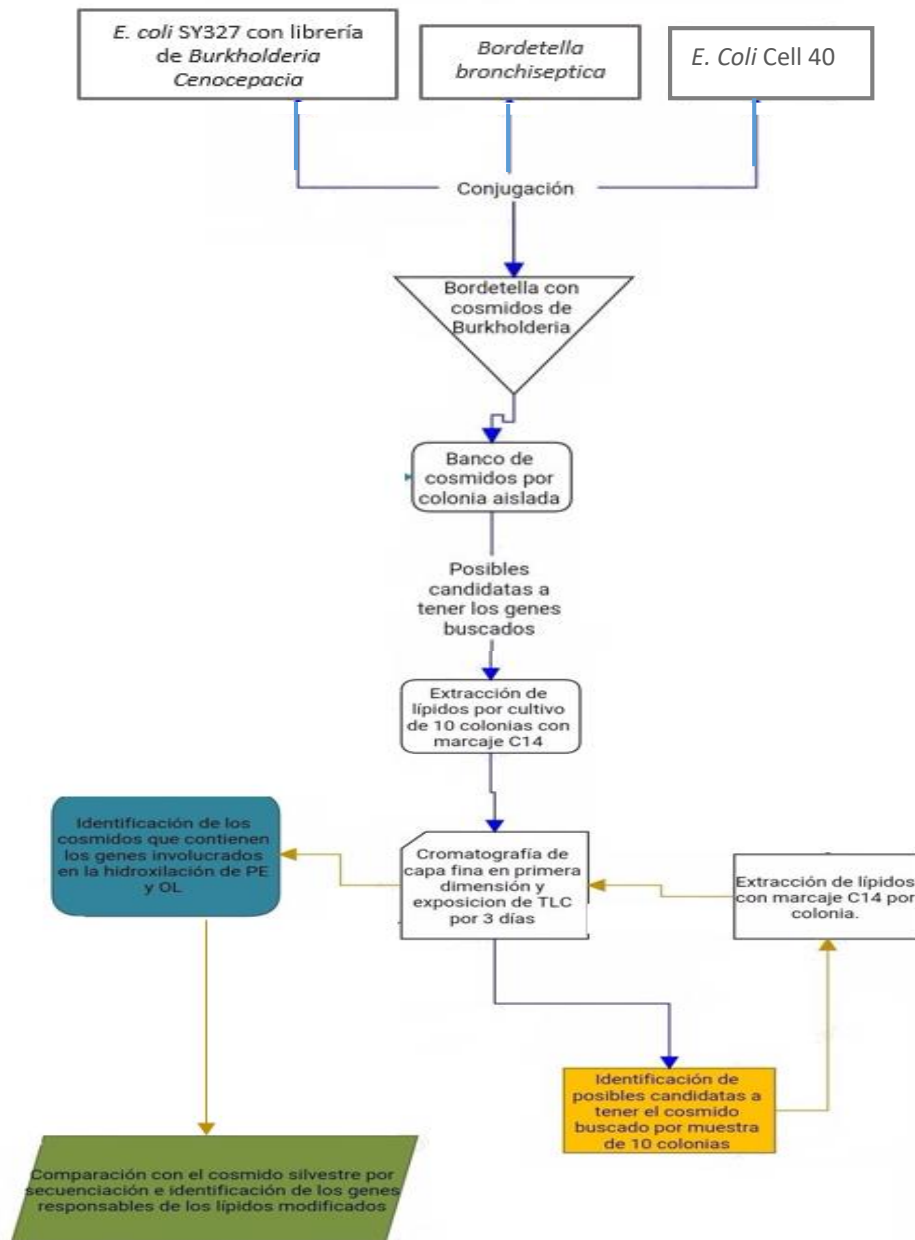


Figura 9. Diagrama de Flujo donde se esquematiza de manera general la metodología a seguir de la estrategia 1. Anotaciones: Flechas azul rey proceso 1; Flechas amarillas proceso 2; fin de procesos cuadro verde.

11.1.1.- Obtención de colonias transconjugantes de *Bordetella bronchiseptica*

Conjugación

La cepa receptora *B. bronchiseptica* se sembró en cajas de LB por 73 horas a 30°C, posteriormente se cultivaron las cepas requeridas en matraces de 125 ml con 30 ml de LB líquido con sus respectivos antibióticos (véase tabla 1) por 16 h, 300rpm a 30°C, hasta alcanzar su fase exponencial. También se crecieron la cepa donadora y la cepa movilizadora.

- Cepa receptora: *B. bronchiseptica* sin antibiótico.
- Cepa donadora: *E. coli* SY327 con pLAFR3, tetraciclina 10 µg/ml.
- Cepa movilizadora: *E. coli* Cel 40, kanamicina 50 µg/ml.

Los cultivos obtenidos se mezclaron en tubos de 2 ml; 1 ml de cultivo de la cepa receptora, 250 µl de cultivo de la cepa donadora y 250 µl de la cepa coadyuvante, se centrifugaron por 4 minutos a 4000 rpm. Se lavaron las células 3 veces con LB líquido sin antibiótico. Posteriormente las células se redisolviéron en 100 µl de LB líquido sin antibiótico y se distribuyeron por goteo en una placa de LB sin antibiótico. Las cajas se incubaron por 24 horas a 30 °C por triplicado.

11.1.2.-Selección de las cepas de *B. bronchiseptica* con el banco de cósmidos

Con las mezclas obtenidas y controles se prepararon diluciones de 10^0 - 10^{-8} y se distribuyeron en placas con los antibióticos estreptomycinina 8 µg/ml y tetraciclina 4 µg/ml para obtener colonias aisladas. Se picaron y se sembraron en cajas LB con los mismos antibióticos previamente marcadas con un replicador estéril de 6 por 8 pozos. Se resembraron las colonias aisladas con un replicador estéril en placas de microtitulación (12 por 8 pozos) con 100µl de LB con estreptomycinina 8 µg/ml y tetraciclina 4 µg/ml, se incubaron a 30°C por 24 h y se agregó 50 µl de glicerol al 75% y se almacenaron a -80°C.

11.1.3.- Identificación de posibles candidatas que contienen los genes implicados en la hidroxilación de OL y PE a partir de la extracción de lípidos marcados con acetato ¹⁴C

Para el “Marcaje de lípidos con [¹⁴C] acetato” (véase 11.1.3.1); en el pre-cultivo se adicionó TC 4 µg/ml, para el cultivo se recolectó 150 µl de diez cultivos de colonias de interés (1.5 ml total de cultivos) para que el análisis de la búsqueda fenotípica en TLC sea más económica y menos exhaustiva. La TLC (véase 11.1.3.3) se realiza en una dimensión utilizando la fase móvil A (para preparado de soluciones véase 17.2).

11.1.3.1.- Marcaje de lípidos con [¹⁴C] acetato

Pre- Cultivo:

Se realizaron cultivos líquidos con los antibióticos correspondientes (véase tabla 1) en tubos de vidrio de 5 ml para cada colonia, se incubaron a 30°C, 300 rpm por 16 h.

Cultivo:

En un tubo plástico de 5 ml, se recolectó 1.5 ml del cultivo de interés, se adicionó 1 ml de LB sin antibiótico y 10 µl (2µCi) de [1-¹⁴C] acetato. Se incubó a 30 °C durante 16 horas. Se realizaron cultivos líquidos con los antibióticos correspondientes (véase tabla 1) en tubos de vidrio de 5 ml para cada colonia, se incubaron a 30°C, 300 rpm por 16 h.

11.1.3.2.- Extracción de lípidos

El cultivo se centrifugó 2 minutos a 13 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y las células se redisolviéron en 100 µl de agua tridestilada. Se añadió 375 µl de metanol: cloroformo (2:1), se mezcló por medio de un agitador tipo vórtex y se dejó en reposo durante 10 a 40 minutos. Posteriormente se añadió 125 µl de cloroformo y 125 µl de agua tridestilada, se mezcló y se centrifugó 3 minutos a 11 000 rpm (Bligh, *et al.*, 1959). Se transfirió la fase orgánica (Fase: cloroformo-lípidos) a otro tubo y se dejó secar a temperatura ambiente o en un concentrador Eppendorf modelo 5300.

11.1.3.3.- Cromatografía en capa fina (TLC)

Una vez extraídos los lípidos, éstos se redisolviéron en 50 µl de metanol: cloroformo (1:1); se separaron por medio de TLC en placas de sílica gel 60 (Merck), en una o dos dimensiones utilizando la fase móvil correspondiente (véase sección 17.2 para preparación de soluciones). Se dejó saturar la cámara por lo menos 5 min, posteriormente se corrieron las placas por 50 minutos aproximadamente, hasta la absorción total por capilaridad y se dejaron secar por 24 horas.

11.1.3.3.1.- Exposición en pantallas de fosfoimager, para la detección de lípidos

Las placas se expusieron con pantallas de fosfoimager durante 2 días y se revelaron con ayuda de un fosfoimager Molecular Dynamics, modelo 820.

11.1.4.- Extracción los cósmidos identificados con el kit FosmidMAX™

Una vez identificado el cultivo (10 colonias) con el fenotipo buscado por medio de la comparación con el perfil lipídico blanco, se realizaron los procedimientos 11.1.3.1 al 11.1.3.3.1.

La TLC se realizó en dos dimensiones; ocupando la fase móvil B como primera dimensión y la fase móvil C como segunda dimensión (para preparación de soluciones véase 17.2). Se extrajo el cósmido con el kit FosmidMAX™ DNA Purification según las instrucciones del proveedor (vease 17.5).

11.1.5.- Identificación de los genes de OH-OLs y OH-PE

11.1.5.1.- Identificación de OH-OLs

Para la identificación final de genes implicados en la biosíntesis de los OH-OLs, los genes candidato se amplificaron con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clonaron en el plásmido de expresión pET9a (Fig. 7). Los plásmidos se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) OlsF (véase 11.1.6 y 11.1.7), posteriormente se realizó cultivo líquido con Km 50 µg/ml y se siguieron los protocolos de 11.1.3.1 al 11.1.3.3.1. La TLC se realizó en dos dimensiones; ocupando la fase móvil B como primera dimensión y la fase móvil C como segunda dimensión (véase 17.2 para preparado de soluciones).

11.1.5.2.- Identificación de OH-PE

Se realizó el mismo protocolo para la identificación de OH-OLs (véase 11.1.7.1) en este caso el fenotipo buscado es el OH-PE (Fig. 7). La transformación se llevó a cabo en *E. coli* BL21(DE3) (véase 11.1.6 y 11.1.7).

11.1.6.- Obtención de células quimiocompetentes de *E. coli* (CaCl₂)

El siguiente protocolo se obtuvo y se modificó de Morrison, 1977.

1. Recuperar del glicerol la cepa *E. coli* de interés en LB con los antibióticos apropiados
2. Inocular una colonia aislada en 10 ml, de LB, incubar con agitación toda la noche (16 h aproximadamente).
3. Incubar el cultivo en hielo por 20 min.
4. NOTA. Incubar también todas las soluciones a emplear en hielo.
5. Centrifugar a 4,000 g (4°C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
6. Resuspender suavemente en 250 ml de 0.1 M de MgCl₂.
7. Centrifugar a 4,000 g (4°C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
8. Resuspender con suavidad en 250 ml de 0.1 M de CaCl₂, incubar en hielo por 20 min.
9. Centrifugar a 4,000 g (4°C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
10. Resuspender con suavidad en 50 ml de 0.1 M de CaCl₂ + 15% glicerol (vol/vol).
11. Alicuotar (100 µL) en tubos eppendorf estériles enfriados previamente y depositarlos en hielo.
12. Almacenar a -80°C.

11.1.7.- Transformación de *E. coli*

En cada caso se agregaron 10 µl de la reacción de ligación a 200 µl de células competentes, se incubaron 30 minutos en hielo.

Se les aplicó un choque térmico de 42°C por 2 minutos y se incubaron nuevamente en hielo por 5 minutos.

Luego se agregó 1 ml de medio LB estéril y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se plaquearon 100 µl de cada transformación en LB-agar

estéril suplementado con Cb_{100} y 35 μ l de X – gal (5 – bromo – 4 – cloro – 3 – indolil – β – D– galactopiranosido 20 mg/ml) y se incubaron a 37°C por una noche.

11.2- Estrategía 2

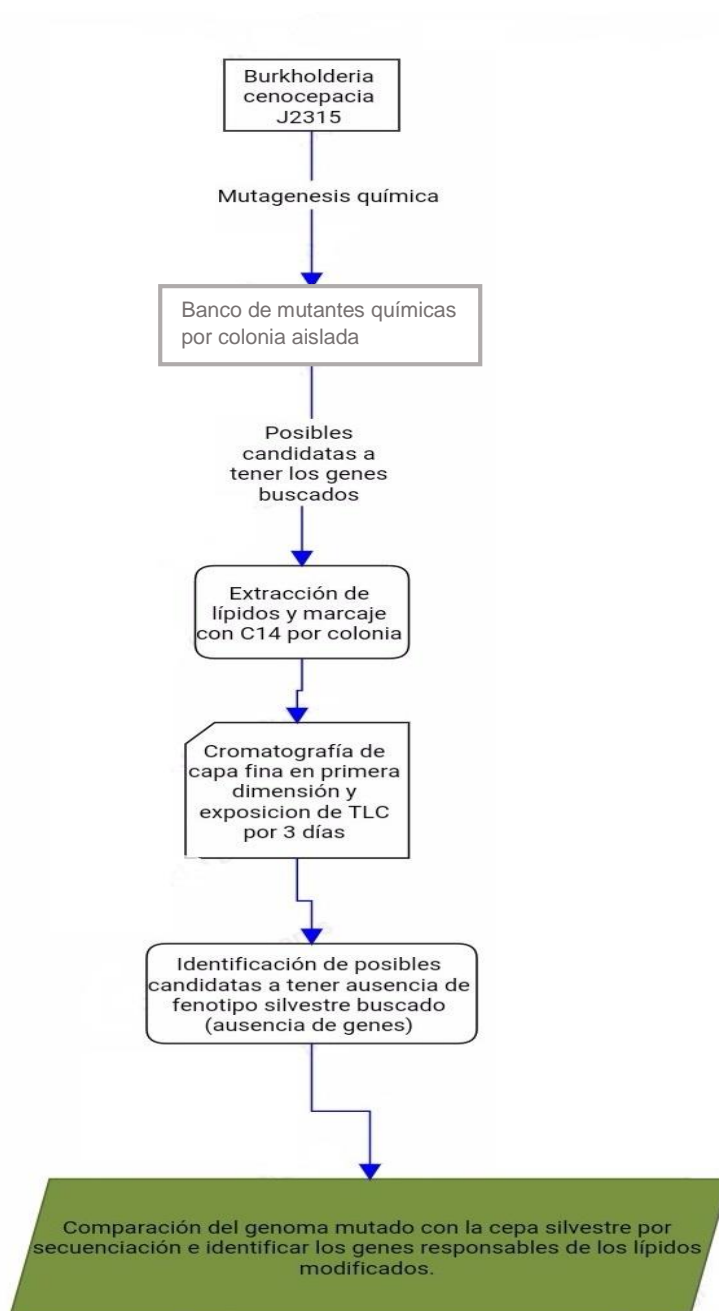


Figura 10.- Diagrama de Flujo donde se muestra el esquema general de metodología a seguir de la estrategia 2. Acotaciones: fin de procesos cuadro verde.

11.2.1.- Obtención de colonias mutantes de *Burkholderia cenocepacia* J2315 por medio de mutagénesis química

Mutagénesis química

El siguiente protocolo "Tratamiento-MNNG" se tomó y se modificó de Goodman, *et al.*, 1984. Véase el apartado 11.3 para composiciones de los buffers y soluciones.

1er parte (Cultivo)

- 1.- Se realizó un cultivo de *B. cenocepacia* en 10 ml de medio LB sin antibiótico en matraz de 125 ml se incubó a 30°C, 300 rpm por 16 h.
- 2.- A partir de precultivo, se inoculó un cultivo en medio LB sin antibiótico a una OD: 0.05.
- 3.- Cuando el cultivo llegó a una OD: 0.35 (Fase logarítmica) se sedimentaron las células a 4,000 rpm por 4 minutos.
- 4.- Se lavó la pastilla dos veces con 10 ml de buffer CP y se suspendió en un tubo Eppendorf en un volumen de 1 ml con buffer CP.

2da parte (Tratamiento)

- 1.- De total de muestras (1ml), se tomaron muestras previas de 2x50 μ l (Muestra sin tratamiento) y se realizó lo descrito en la parte 3.
- 2.- Para el resto de la suspensión (900 μ l) se añadieron 18 μ L (100 μ g/ml) de una solución saturada de MNNG (*N*-methyl-*N*9-nitro-*N*-nitrosoguanidine) (5 mg/ml en agua estéril) y se mezcló.
- 3.- Inmediatamente se tomó una muestra de 2x50 μ l (Tiempo 0).
- 4.- Se incubó en baño María a 30°C-
- 5.- Se tomaron muestras de 2x50 μ l de diferentes tiempos (30 min, 1, 2, 3, y 4 horas)

6.- Cada muestra se centrifugó a 4,000 rpm por 4 minutos. Las células fueron lavadas con 100 μ l de buffer CP.

3er parte (Curva de muerte)

1.- 50 μ l de la muestra (Diferentes tiempos) se diluyeron en buffer CP (50 μ l + 450 μ l) que corresponden a la dilución 10^{-1} y fueron plaqueados 50 μ l de las siguientes diluciones (-2,-3,-4,-5,-6 y -7) en agar con LB sin antibiótico e incubaron a 30°C hasta que hubo colonias aisladas.

3er parte (Incubación)

1.- Los otros 50 μ l de la muestra (Diferentes tiempos) se suspendieron en 5 ml de medio LB en tubos de vidrio (con tapa) estériles de 10 ml a 30°C y se recuperó hasta que el cultivo estuvo turbio.

11.2.2.- Identificación de las colonias que muestren la ausencia de la hidroxilación de OL o de PE a partir de lípidos marcados con acetato [14 C]

Para la identificación de las mutantes químicas *B. cenocepacia* J2315 que ya no acumulen 2-OH-OLs, 2-OH-PE o ninguno de los dos, se picaron colonias aisladas de las diluciones obtenidas y se sembraron en cajas LB sin antibiótico previamente marcadas con un replicador estéril de 6 por 8 pozos.

Se resembraron las colonias aisladas con un replicador estéril en placas de microtitulación (12 por 8 pozos) con 100 μ l de LB sin antibiótico, se incubaron a 30°C por 72 h y se agregó 50 μ l de glicerol al 75% y se almacenaron a -80°C. Posteriormente se realizaron los procedimientos 11.1.3.1 al 11.1.3.3.1 con LB sin antibiótico.

11.2.3.-Identificación los genes modificados de OH-OLs y OH-PE por mutagénesis química

Una vez identificado las colonias que revelan fenotípicamente la ausencia de los genes de los lípidos 2-OH-OLs y o 2-OH-PE. Se extrajo DNA genómico por medio del Kit Roche, con el siguiente protocolo:

Extracción de ADN genómico (kit ROCHE)

- Crecer un cultivo de 3 a 5 ml a una DO alta (toda la noche).
- Centrifugar a 13,000 rpm y desechar el sobrenadante. (Congelar si es necesario).
- Re-suspender las células en 450µl de “Cellular Lysis Buffer”.
- Homogenizar la suspensión con la ayuda de una micropipeta.
- Incubar 15min a temperatura ambiente.
- Agregar 30µl de “Proteinase K Solution” (dilución 1:1000). Vortex 3s.
- Incubar 1h a 65°C.
- Dejar enfriar los tubos con la tapa abierta.
- Agregar 5µl de “RNase solution”; vortex 3s.
- Incubar de 30 a 60min a 37°C.
- Agregar 180µl de “Protein Precipitation Solution”. Vortex 10s.
- Incubar en hielo por 5min.
- Centrifugar 20min a 13,000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (450µl)
- Agregar el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Vortex 5s.
- Centrifugar 3min a 13,000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (400µl)
- Agregar 400µl de cloroformo. Vórtex 5s.
- Centrifugar 3min a 10,000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (300µl)

- Agregar 0.7 partes del volumen de isopropanol a la muestra (210μl aprox.). Mezclar invirtiendo 20 veces.
- Centrifugar 5min a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- Agregar 500μl de etanol al 70%. Mezclar por inversión.
- Centrifugar 5 min a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- Secar el pellet a temperatura ambiente por 5min.
- Resuspender el pellet en 100μl de TE (1/10) pH 8.0.
- Incubar 10min a 55°C.
- Almacenar a -20°C.

El ADN mutagenizado de *B. cenocepacia* extraído, se mandó a secuenciar por NGS (Secuenciación de segunda generación); adicionalmente se envió ADN aislado de la cepa silvestre para poder identificar los polimorfismos de nucleótidos en el genoma de las mutantes.

Para comprobar la identificación de los genes que están implicados en la hidroxilación de OH-OLs se realizó el procedimiento 11.1.5.1. y para los genes de OH-PE se llevó a cabo el procedimiento 11.1.5.2.

12.- Resultados

Con base a los objetivos particulares planteados, se obtuvieron los siguientes resultados por estrategia experimental:

Estrategia 1. Tamizaje de expresión funcional con banco de cósmidos.

Se encontró una transconjugante de *Bordetella bronchiseptica* que presentaba el perfil lipídico buscado presentando la hidroxilación de lípidos de ornitina, lo que indica que contiene un cósmido con el gen que codifica para la enzima que hidroxila el lípido de ornitina (Fig. 11). Se realizó un marcaje de lípidos de esta cepa con [¹⁴C] acetato (Fig. A-11 Y B-11) y [¹⁴C] ornitina (Fig. C-11) y los lípidos fueron separados por TLC de dos dimensiones. Después de confirmar la presencia del OL hidroxilado, se extrajo el cósmido y se transformó a *E. coli*. Se creció un cultivo de la cepa de *E. coli* con el cósmido, el ADN del cósmido se extrajo y se mandó a secuenciar. Se evaluó la calidad de los archivos FASTQ con Trim Galore, posteriormente el genoma del cósmido se ensambló con el algoritmo SPAdes, donde se validó su calidad con QUAST, con PROKKA se obtuvieron los conteos para cada lectura encontrada y por medio de Glimmer se localizaron los genes presentes en el cósmido y por último se compararon con la cepa blanco obteniendo 21 genes que presentaban un porcentaje de identidad de entre 90-100% con la cepa modelo (Tabla 2).

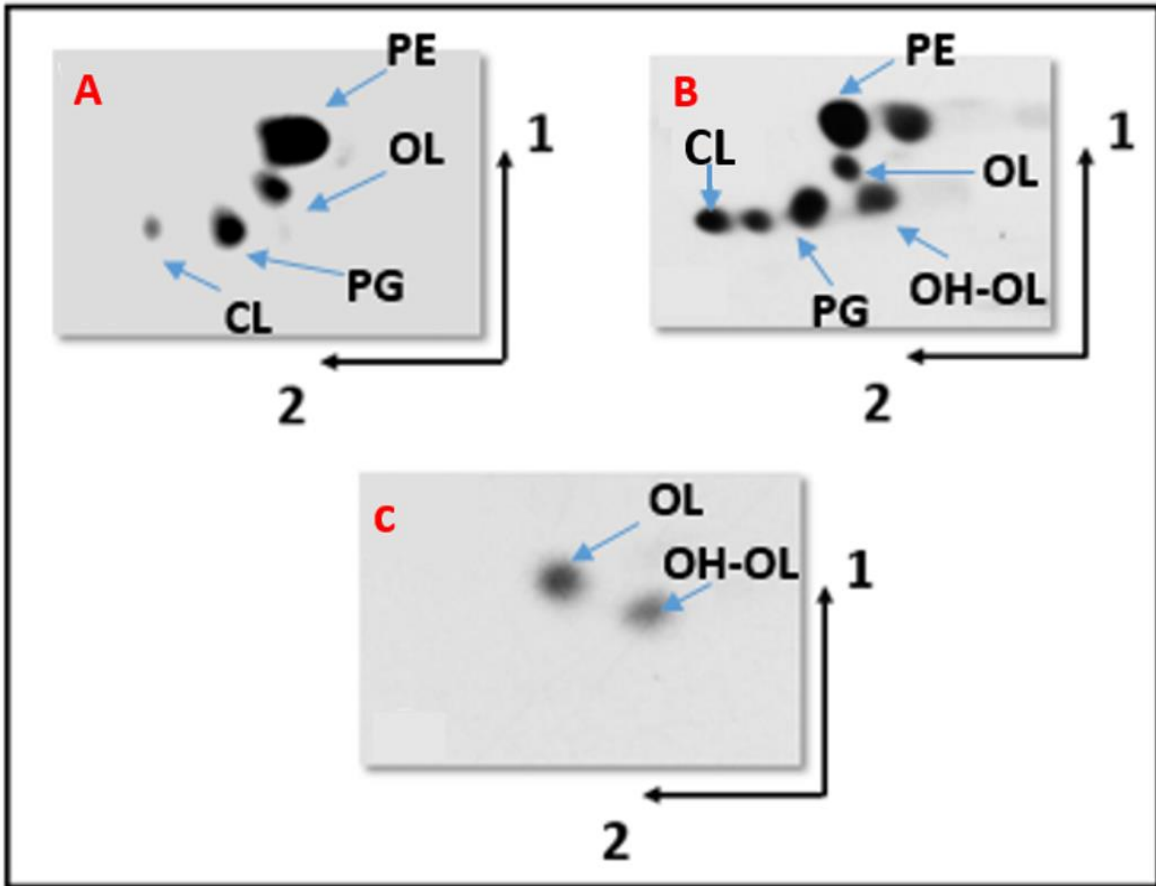


Figura 11. Perfiles lipídicos de membrana de cepas transconjugantes de *Bordetella bronchiseptica* con cosmido pLAFR3 con el genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315 y cepa silvestre. Figura A; cepa silvestre de *Bordetella bronchiseptica* (WT). Figura B Y C; Transconjugantes de *Bordetella bronchiseptica* con cósmido de *Burkholderia cenocepacia* J2315, muestran el lípido de ornitina hidroxilado. Los lípidos de la figura A y B fueron marcados con $[^{14}\text{C}]$ acetato, los de la figura C fueron marcados con $[^{14}\text{C}]$ ornitina. Todos los perfiles lipídicos fueron separados por TLC bidimensional.

Tabla 2. Lista de genes encontrados en el cósmido seleccionado, por secuenciación masiva. Las casillas se muestran en orden horizontal por gene, donde se proporciona la siguiente información; ID gen, ID proteína, descripción de proteína, al menos un dominio, descripción de dominio. Se muestran con color rojo los genes putativos que se consideran ser mejores candidatos a tener actividad en la síntesis de 2-OH-OL.

ID locus gen:	ID proteína:	Descripción de proteína:	Dominio:	Descripción de dominio:
<i>BCAL0226</i>	WP_077199722	DNA-directed RNA polymerase subunit beta', partial	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta; Reviewed
<i>BCAL0227</i>	WP_006482896.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	PRK00566	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'; Provisiona
<i>BCAL0229</i>	WP_006400662	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S12	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12; Validated
<i>BCAL0290</i>	WP_034189833	MULTISPECIES glutamate synthase subunit beta	<i>gltD</i>	glutamate synthase subunit beta; Reviewed
<i>BCAL0331</i>	WP_006400565.1	Chain A, Putative Stringent Starvation Protein A	<i>sspA</i> super family	stringent starvation protein A; Provisional
<i>BCAL0482</i>	WP_058901906.1	rod shapedetermining protein	PRK13927	rod shape-determining protein MreB; Provisional
<i>BCAL0681</i>	WP_126364237	methionine synthase	<i>methH</i> super family	B12-dependent methionine synthase; Provisional
<i>BCAL0825</i>	WP_009693734	MULTISPECIES excinuclease ABC subunit UvrA	<i>uvrA</i>	excinuclease ABC subunit A; Reviewed
<i>BCAL0870</i>	KOR18527	FADlinked oxidase, partial	GlpC	Fe-S oxidoreductase [Energy production and conversion]
<i>BCAL0884</i>	WP_040141902	acylCoA dehydrogenase	PTZ00456 super family	acyl-CoA dehydrogenase; Provisional
<i>BCAL1046</i>	WP_077188796	phospholipase C, phosphocholinespecific	PC_PLC	phospholipase C, phosphocholine-specific, Pseudomonas-type; Members of this protein family are
<i>I35_1177</i>	WP_049102648	carbamoilphosphate synthase large subunit, partial	<i>carB</i>	carbamoil phosphate synthase large subunit; Reviewed
<i>BBJ41_02330</i>	WP_049123580	endopeptidase La, partial	Lon	ATP-dependent Lon protease, bacterial type

				[Posttranslational modification, protein turnover,
<i>BCAL2208</i>	ONX48358	hypothetical protein AF A8F11_10360, partial	PRK11855	dihydrolipoamide acetyltransferase; Reviewed
<i>BCAL2323</i>	WP_040145001	MULTISPECIES thiol disulfide oxidoreductase	PRK11752 super family	putative S-transferase; Provisional
<i>BCAL2339</i>	WP_006493083	NADHquinone oxidoreductase subunit NuoF	NuoF	NADH:ubiquinone oxidoreductase, NADH-binding 51 kD subunit (chain F) [Energy production and
<i>DM42_2792</i>	WP_077184151	UDP,diacylglucosamine diphosphatase	LpxH	UDP-2,3-diacylglucosamine pyrophosphatase LpxH [Cell wall/membrane/envelope biogenesis];
<i>WS57_31630</i>	WP_009688319	MULTISPECIES class I SAM-dependent methyltransferase	Cfa	Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase and related methyltransferases [Lipid transport
<i>Bcen_0196</i>	ABF75110	LSU ribosomal protein L13	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13; Reviewed
<i>Bcenmc03_3717</i>	WP_034174893	AIE family transporter	PerM	Predicted PurR-regulated permease PerM [General function prediction only
<i>BCAL3404</i>	ESS39442	L-arabinose transport ATPbinding protein AraG	<i>araG</i>	L-arabinose transporter ATP-binding protein; Provisional

Al analizar los genes obtenidos de la secuenciación del cósmido, se observó un quimerismo, ya que se encontraron fracciones de DNA de diferentes locus fusionadas, al comparar con los locis conocidos del mapa genómico de la cepa silvestre. Dentro de una de estas fracciones se encontraron dos genes; *BCAL0870* y *BCAL0884* con una cercanía génica, se pueden observar genes adyacentes que se ven involucrados en la vía metabólica de lípidos, que los abarca; específicamente rio arriba se encuentra el gen *BCAL0743* que codifica a una putativa glicerol-3-

fosfato dehidrogenasa, entre éstos el gen *BCAL0882* que codifica para un putativa fosfolipasa D y río abajo una putativa 3-cetoacil-CoA tiolasa (Fig. 12).

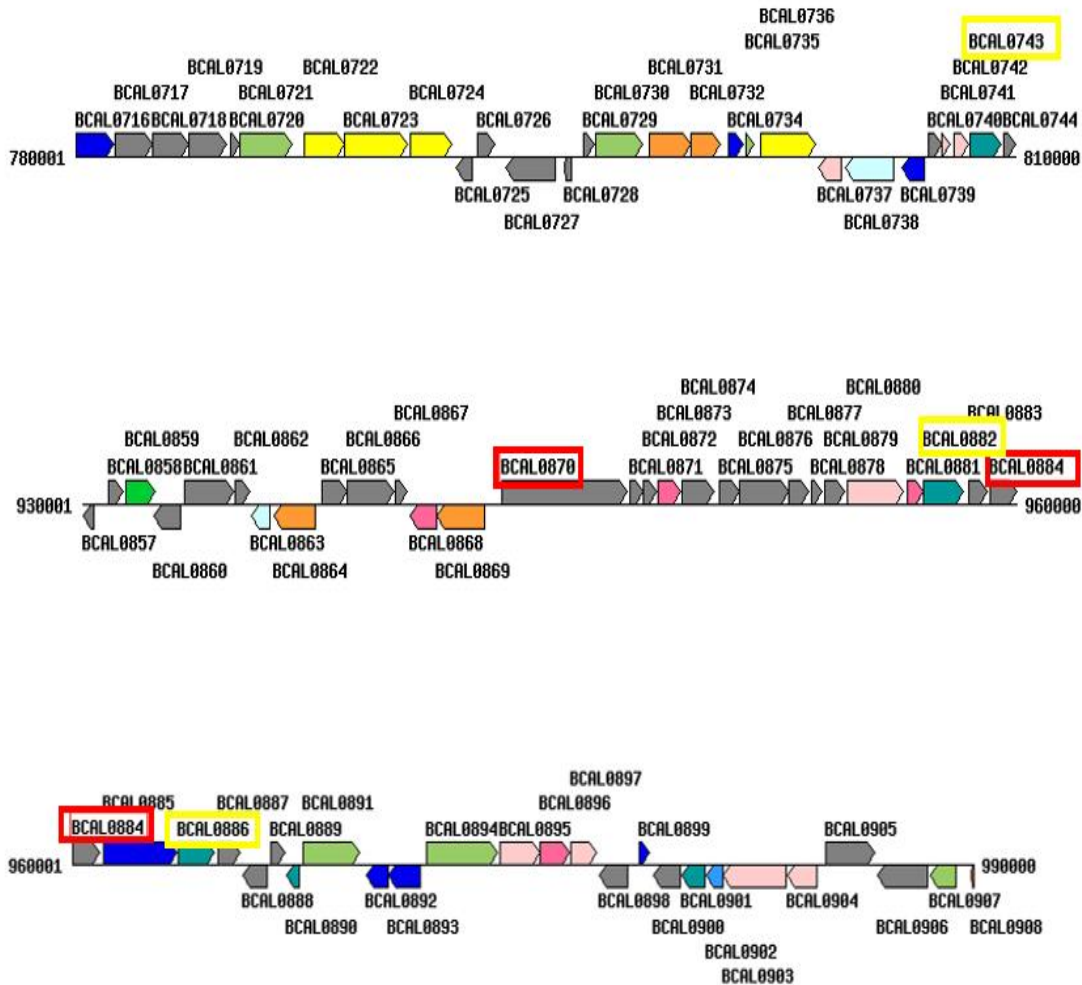


Figura 12. Mapa genético del gen *BCAL0870* y *BCAL0884* putativos. Genes encontrados en pLAFR3 con el genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315 ubicados a menos de 30 kb entre ellos. Al gen *BCAL0870* se le relaciona con posible actividad Fe-S oxidoreductasa principalmente. Se hace notar gen adyacente río arriba *BCAL0743* y río abajo *BCAL0882* que se les relaciona con la vía metabólica de lípidos. El gen *BCAL0884* tiene una posible actividad acyl-CoA deshidrogenasa oxidoreductasa, los genes adyacentes relacionados con la vía de lípidos más cercanos son BCAL0881 y BCAL0886 (véase Tabla 3 para relacionar los genes por color con rutas metabólicas a las que pueden participar). Se encierra en un cuadro rojo los genes candidatos y en amarillo los genes involucrados en la vía metabólica de lípidos. Figura tomada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Estudiando más a detalle *BCAL0870*, éste codifica para una putativa oxidoreductasa, se le relaciona con los dominios conservados; GlpC y Fer4_8 (Fig. 13) que se ven involucrados en reacciones de oxidoreducción. En el caso del dominio Fe-S, se agrupan proteínas que median la transferencia de electrones, contienen tres centros diferentes de hierro-azufre: un 2Fe-2S, un 3Fe-4S y un 4Fe-4S. En este dominio se pueden encontrar familias como GlpC, FAD-oxidase_C, y Fer4_8. En el caso de 4Fe-4S, los grupos consisten en dos tetraedros intercalados que forman una estructura tipo cubane-like, de tal manera que los cuatro fierros ocupan las ocho esquinas de un cubo distorsionado. Cada 4Fe-4S está unido a la cadena de polipéptidos por cuatro enlaces Fe-S covalentes que implican residuos de cisteína (Meyer, *et al.*, 1988 y Otaka, *et al.*, 1987).

Por otro lado, el dominio FAD-oxidase_C tiene relación con enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde y hacia los centros redox (flavina), participando en reacciones de óxido reducción, donde el oxígeno se activa hidroxilando u oxidando. El cofactor FAD consiste en monofosfato de adenosina (AMP) unido al mononucleótido de flavina (FMN) por un enlace pirofosfato. La flavina funciona principalmente en una capacidad redox, pudiendo tomar dos electrones de un sustrato y liberarlos de dos en dos a un sustrato o coenzima, o uno a la vez a un receptor de electrones. La función catalítica del FAD se concentra en el anillo de isoalloxazina, mientras que el fosfato de ribitilo (resto de FMN) y el resto AMP estabilizan principalmente la unión del cofactor a los residuos de proteínas (Mathews F.S, *et al.*, 1991 y Fraaije, *et al.*, 2000). Un ejemplo de proteína con este tipo de dominio es la Aldehído oxidoreductasa subunidad de unión a FAD codificada por el gen *PaoB*, esta enzima cataliza la oxidación de los aldehídos a los ácidos carboxílicos, tiene más afinidad por los aldehídos aromáticos (Neumann, *et al.*, 2009).

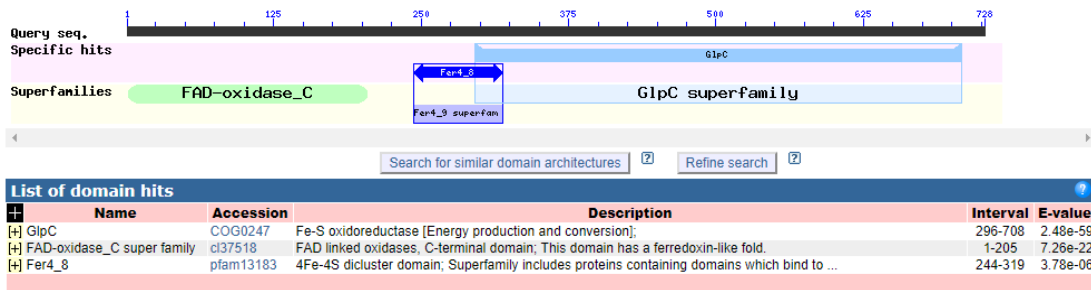


Figura 13. Dominios conservados del gen *BCAL0870*. Gráfico de *Burkholderia cenocepacia* J2315 donde se le relaciona con los dominios conservados; súper familia GlpC, súper familia FAD-oxidase_C y Fer4_8. Figura tomada de NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Por otra parte, el gen *BCAL0884*, codifica para una proteína putativa acil-CoA dehidrogenasa oxidoreductasa. Se le relaciona con la familia de acil-CoA dehidrogenasas (Fig. 14); se sabe que son enzimas que catalizan la deshidrogenación α , β de los ésteres de acil-CoA y transfieren electrones. Las deshidrogenasas de acil-CoA son flavoproteínas FAD. Esta familia actualmente incluye proteínas involucradas en el catabolismo de aminoácidos y lípidos. (Aoyama, *et al.*, 1994; Matsubara Y., *et al.*, 1989 y Tanaka, *et al.*, 1987).

Al analizar las posiciones y probables actividades de los dominios asociados de *BCAL0870* y *BCAL0884*, se puede determinar que son los genes candidatos a tener más posibilidad de tener participación en la hidroxilación del lípido de ornitina en el carbono dos del ácido graso esterificado de *Burkholderia cenocepacia* J2315.

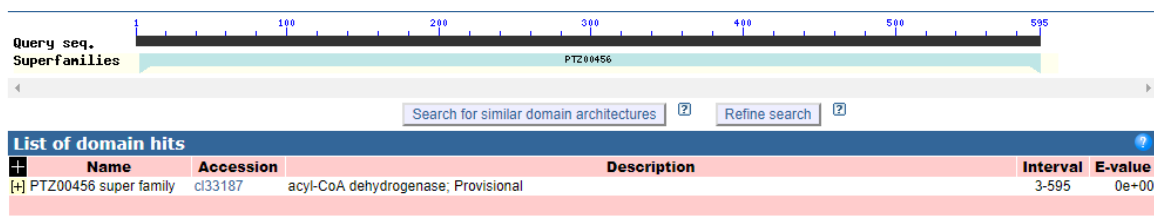


Figura 14. Dominio conservado de *BCAL0884*. Gráfico del gen putativo de *Burkholderia cenocepacia* J2315 donde se le relaciona con el dominio conservado acil-CoA dehidrogenasa. Figura tomada de NCBI: National Center for Biotechnology Information.

BCAL2208 también es un gen que llama la atención por codificar a una dihidrolipoamida acetiltransferasa componente de piruvato. Se pueden observar más genes que están involucrados en la vía metabólica de lípidos; específicamente, río arriba; *BCAL2105* que codifica para una putativa cardiolipina synthetasa y *BCAL2106* que codifica para una enzima glutatión peroxidasa (Fig. 15). Contiene los dominios de BIOTINYL_LIPOYL y PSBD que se ven involucrados en reacciones de oxidoreducción (Fig. 16); por lo que se propone como candidato a tener actividad en la síntesis de 2-OH-OL. Específicamente, el dominio de unión de biotina tiene un residuo de lisina conservado que se une a la biotina o ácido lipoico. La biotina se ve involucrada en realizar una reacción catalítica en la transferencia de carboxilo y se une covalentemente a través de un enlace amida a un residuo de lisina en enzimas que requieren esta coenzima (Shenoy, *et al.*, 1992). Los residuos de lipoil-lisina y biotinil-lisina sirven como brazos oscilantes, transportando sustrato entre los tres sitios activos en sus complejos enzimáticos relevantes. Las enzimas que contienen un dominio biotínico se relacionan con carboxilasas, deshidrogenasas y descarboxilasas (Perham, *et al.*, 1998).

El dominio PSBD pertenece a una familia de complejos multienzimáticos muy grandes que consisten en múltiples copias de al menos tres enzimas que catalizan la descarboxilación oxidativa de varios 2-oxoácidos diferentes, lo que resulta en productos de acil-CoA. Tiene una estructura compacta que consta de dos hélices α cortas y paralelas (H1 y H2) separadas por un bucle (L1), un solo giro helicoidal y un bucle adicional menos ordenado (L2). La estructura compacta del dominio PSBD se estabiliza principalmente por interacciones hidrofóbicas (Robien M.A., *et al.*, 1992; Mande, *et al.*, 1996 y Perham, *et al.*, 2000).

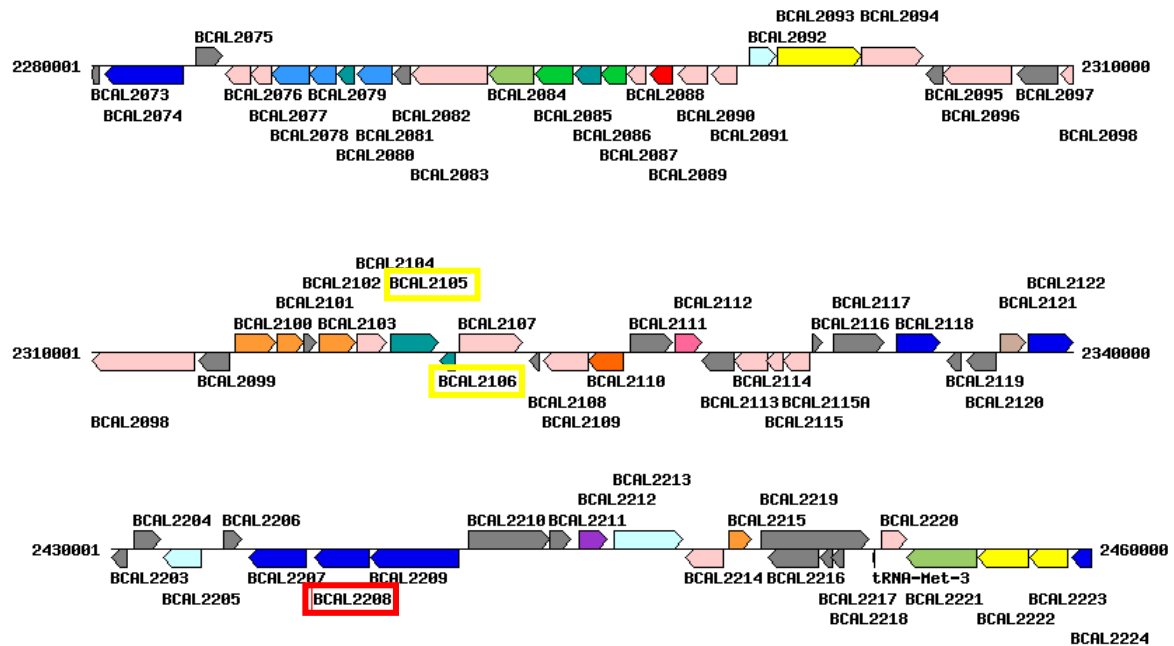


Figura 15. Mapa genético del gen BCAL2208 putativo. Gen encontrado en pLAFR3 con el genoma de *Burkholderia cenocepacia* J2315. Se le relaciona con posible actividad dihidrolipoamide acetyltransfera, se observan río arriba BCAL2105 y BCAL2106 relacionados con la vía metabólica de lípidos (véase Tabla 3 para relacionar los genes por color con rutas metabólicas a las que pueden participar). Se encierra en un cuadro rojo los genes candidatos y en amarillo los genes involucrados en la vía metabólica de lípidos. Figura tomada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

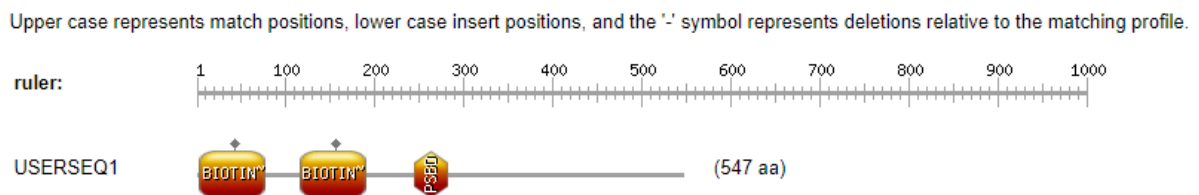




















Figura 16. Dominios conservados de BCAL2208. Gráfico del gen putativo de *Burkholderia cenocepacia* J2315 donde se le relaciona con el dominio conservado BIOTIN y PSSB. Figura tomada de Database of protein domains, families and functional sites; PROSITE.

Tabla 3. Códigos de color para los mapas genómicos, donde cada gen muestra un color que se le relaciona con una vía metabólica célula. Figura tomada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

	Carbohydrate metabolism
	Energy metabolism
	Lipid metabolism
	Nucleotide metabolism
	Amino acid metabolism
	Metabolism of other amino acids
	Glycan biosynthesis and metabolism
	Metabolism of cofactors and vitamins
	Metabolism of terpenoids and polyketides
	Biosynthesis of other secondary metabolites
	Xenobiotics biodegradation and metabolism
	Enzyme families
	Genetic Information Processing
	Environmental Information Processing
	Cellular Processes
	Organismal Systems
	Human Diseases
	Unclassified

Estrategia 2.- Mutagénesis química con MNNG.

Se mutagenizó la cepa modelo (*Burkholderia cenocepacia* J2315), con *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (3mg/ml), para posteriormente dentro de la población mutada detectar mutantes deficientes en la formación de OH-PE y OH-OL. Se obtuvo un 10.42 y 0.0081% de supervivencia en los tiempos 0 a 30 min, en los tiempos posteriores ninguna célula sobrevive (Tablas 4 y 5); se construyó una curva de muerte (Fig. 17), donde se muestra hasta el tiempo de 30 min, simultáneamente se construyó un banco de 192 colonias mutantes, posteriormente se estudió el perfil lipídico de todas y se identificaron dos mutantes candidatas que carecían de PE hidroxilado (fig.19-S2 y 19-S4); también, se encontró otra mutante que carecía de PE hidroxilado y OL hidroxilado (fig.18-S1) en comparación a la cepa silvestre (fig. 18-S3).

Tabla 4. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de *Burkholderia cenocepacia* J2315 que se cuantificaron antes y después (0, 30 min, 1, 2, 3 y 4 horas) del tratamiento con MNNG (3 mg/ml). Se depositaron 100 µL de cada dilución en placas con medio LB estériles, se denota incontables a colonias demasiado juntas ó sin distinción

Muestra	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	UFC/ml
Previa	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	679	459	4.59x10 ⁹
0	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	315	48	4.8x10 ⁸
30 min	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	194	37	3	3.7x10 ⁵
1 h	0	0	0	0	0	0	0	0
2 h	0	0	0	0	0	0	0	0
3 h	0	0	0	0	0	0	0	0
4 h	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 5. Porcentaje de supervivencia de *Burkholderia cenocepacia* J2315, antes y después (0, 30 min, 1, 2, 3 y 4 horas) del tratamiento con MNNG (3 mg/ml).

Muestra	Porcentaje de supervivencia
Previa	100%
0	10.46%
30 min	0.0081%
1 h	0
2 h	0
3 h	0
4 h	0

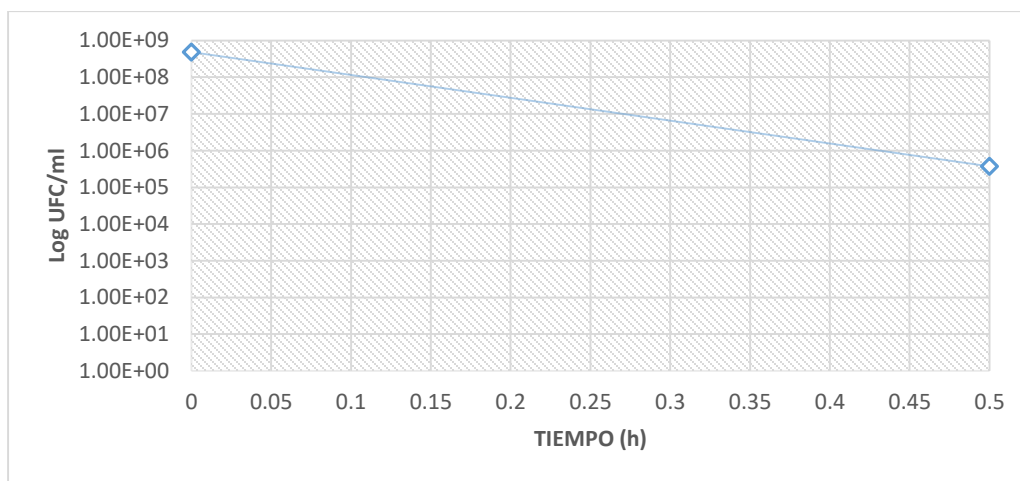


Figura 17. Curva de muerte de *Burkholderia cenocepacia* J2315 por tratamiento con MNNG. Representación gráfica de la curva de muerte *Burkholderia cenocepacia* J2315, antes y después (0, 30 min, 1, 2, 3 y 4 h) del tratamiento con MNNG (3 mg/ml); A partir de 30 min la cepa no mostró UFC/ml.

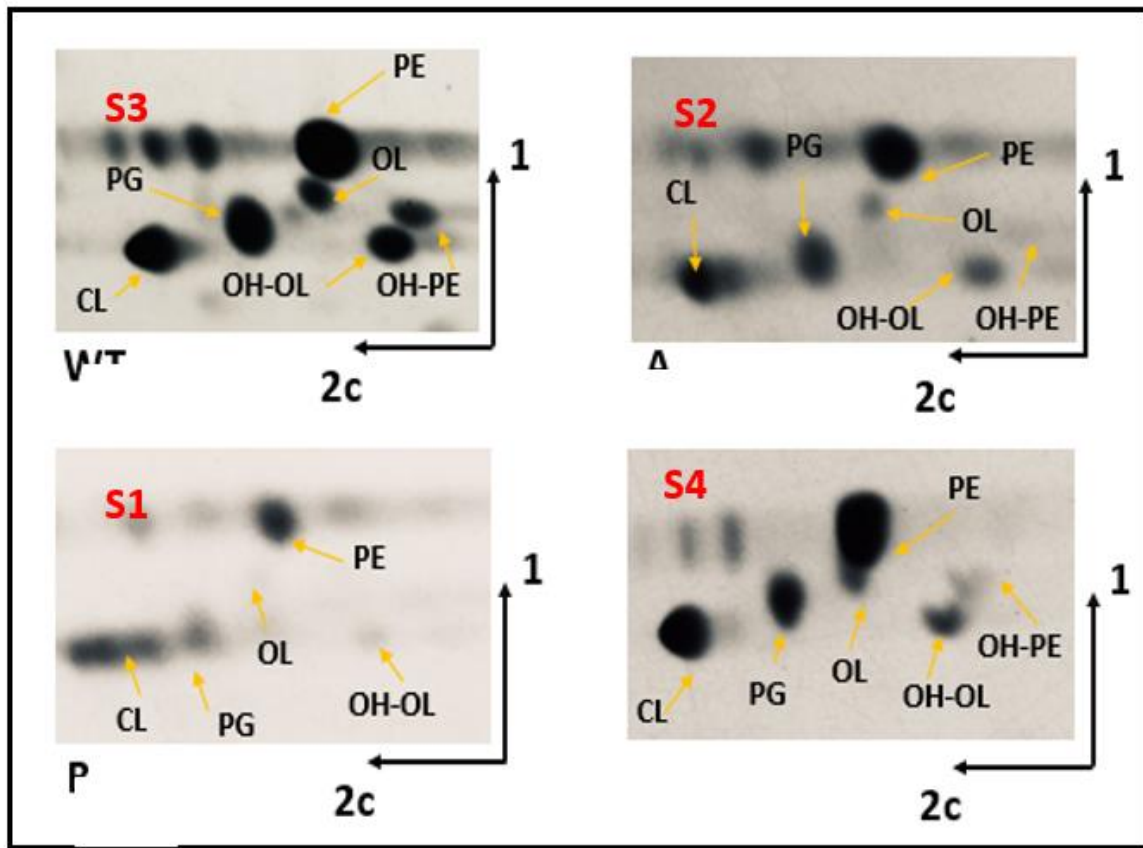


Figura 18. Perfiles lipídicos de membrana de cepa silvestre y mutantes de *Burkholderia cenocepacia* J2315. Figura S3; cepa silvestre de *Burkholderia cenocepacia* J2315.

Figura S2 Y S4; mutantes de *Burkholderia cenocepacia* J2315 mostrando una disminución en la producción de lípido OH-PE con respecto a la cepa silvestre. Figura S1; mutante de *Burkholderia cenocepacia* J2315 mostrando una disminución en la producción de lípido OH-PE y OH-OL con respecto a la cepa silvestre. Los lípidos de todas las figuras mostradas fueron marcados con [¹⁴C] acetato.

De dichas mutantes se extrajo el ADN total y las muestras se mandaron a secuenciar junto con la cepa silvestre, para posteriormente identificar polimorfismos (se esperaban al menos 10 mutaciones por colonia) en comparación con el tipo silvestre. Se evaluó la calidad de los archivos FASTQs con Trim Galore, posteriormente los genomas se ensamblaron con el algoritmo SPAdes, donde se validó su calidad con QUAST y con Tbreseq se pudo predecir las mutaciones en las mutantes y silvestre, ya que muestra la relación con un genoma ya secuenciado. En todas las mutaciones encontradas en las cepas candidatas y silvestre predominaron

deleciones intergénicas de gran tamaño que se pueden asociar como errores del ensamblado, sin embargo, comparando solo las mutaciones donde están involucrados genes que se preservaron después del tratamiento con MNNG, se encontraron 4 mutaciones que comparten las cepas candidatas S1, S2 y S4, además se encontró otra mutación puntual de transición T→C en el gen *BCAM1881* que comparten las cepas S1 y S4, todas estas mutaciones no presentan la cepa silvestre (S3) (Tabla 6).

Tabla 6. Mutaciones que comparten las cepas candidatas a tener el gen mutado involucrado en la hidroxilación de PE en *Burkholderia cenocepacia* J2315. El gen candidato propuesto se muestra con casillas sombreadas color rojo. El gen resaltado con azul muestra la misma mutación en la cepa S1 y S4. Se muestra; el nombre del gen, tipo de mutación, notación (ubicación y detalles de la mutación), por último, la posible actividad del gen.

Gen	Mutación	Notación	Descripción del gen
<i>BCAL3475</i>	2 bp→CT	intergenic (-278/+15)	Dimethyl sulfoxide reductase DmsA/5S ribosomal RNA
<i>BCAL0380</i>	A→G	*278Q (TAG→CAG)	Energy-dependent translational throttle protein EttA
<i>BCAM0949</i>	G→C	W180S (TGG→TCG)	triacylglycerol lipase
<i>BCAM1881</i>	T→C	I171I (ATI→ATC)	hypothetical protein
<i>BCAL1663</i>	T→C	intergenic (-47/+79)	serine protein kinase

Posteriormente se analizaron los dominios y actividades anotadas de los 6 genes mutados y se encontró un gen candidato interesante que pueda participar en la conversión PE → 2-OH-PE; *BCAL3475* una probable putativa oxidorreductasa

que contiene molibdopterina; se le relaciona con los dominios MopB_3 y MopB_CT_3 (Fig. 19). Las molibdopterinas son una clase de proteínas que contienen molibdeno (Mo) o tungsteno (W), esta familia se conforma principalmente por las oxidoreductasas Mo / W, contienen un dominio que coordina un grupo [4Fe-4S]. El grupo está ligado por cuatro o tres residuos Cys y un residuo His. El pliegue del dominio Mo / W bis-MGD-type 4Fe-4S es del tipo $\alpha\beta$ y contiene tres cadenas β y una hélice α . (Wootton, *et al.*, 1991; Rothery, *et al.*, 2008 y Raaijmakers H., *et al.*, 2002).

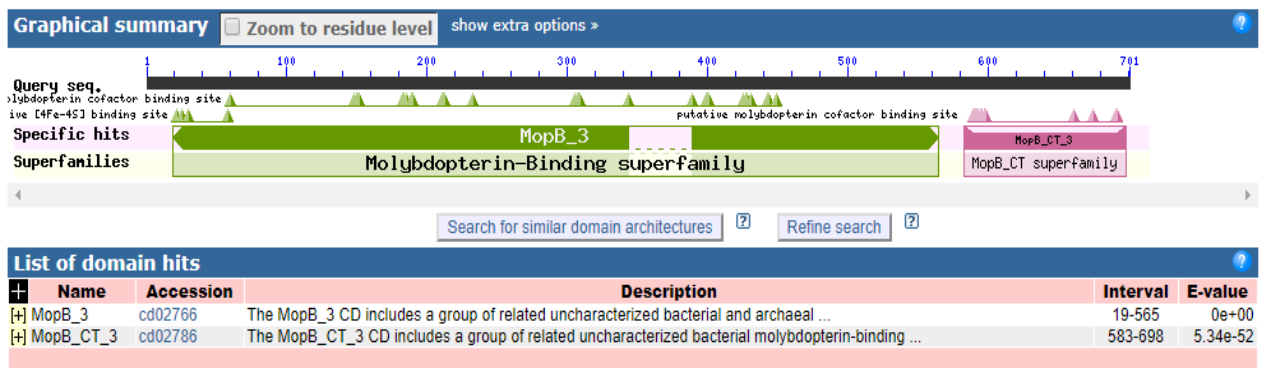


Figura 19. Dominio conservado de BCAL3475. Grafico del gen putativo de *Burkholderia cenocepacia* J2315 donde se le relaciona con el dominio MopB_3 y MopB_CT. Figura tomada de NCBI: National Center for Biotechnology Information.

El gen candidato *BCAL3475* presentó una mutación puntual de sustitución de dos pares de bases (2 bp→CT), en posición intergénica (-278/+15) con el gen 5S-4. Un dato importante es que río arriba se encuentra un gen adyacente involucrado en el metabolismo de lípidos, más específicamente *BCAL3474* con actividad acil-CoA sintetasa de cadena larga (Fig. 20); dentro de la misma familia de proteínas que comparten el dominio Molibdopterina oxidoreductasa Fe4S4, se tiene como ejemplo, al gen PhsA de *Salmonella typhimurium* que codifica para una subunidad que contiene molibdopterina tiosulfato reductasa PhsA. Esta proteína cataliza la

reducción del tiosulfato a sulfito y sulfuro de hidrógeno, con menaquinol como único donante de electrones (Stoffels, *et al.*, 2011), por lo que se propone que el gen *BCAL3475* pueda participar en la conversión PE → 2-OH-PE.

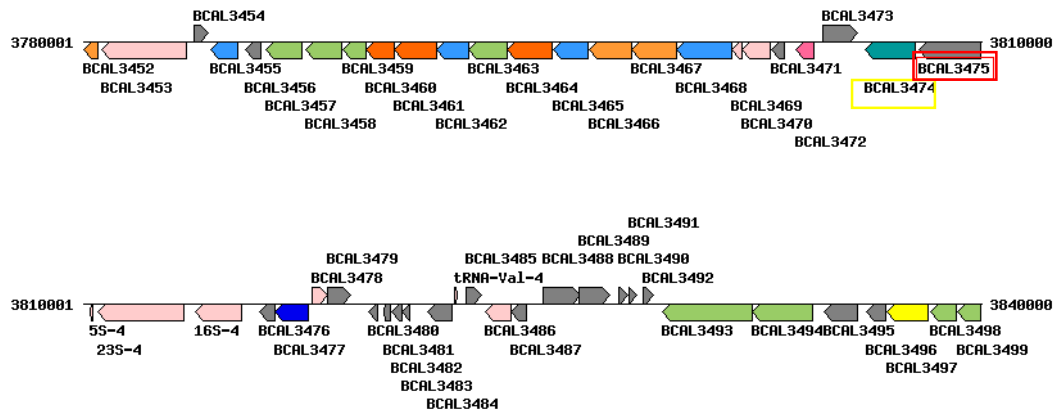


Figura 20. Mapa genético del gen *BCAL3475* putativo de *Burkholderia cenocepacia* J2315. Gen encontrado con una mutación puntual de sustitución de dos pares de bases (2 bp→CT), en posición intergenica (-278/+15) con el gen 5S-4, después del tratamiento con MNNG (3mg/ml). Se observa que arriba se encuentra un gen adyacente *BCAL3475* involucrado en el metabolismo de lípidos (véase Tabla 3 para relacionar los genes por color con rutas metabólicas a las que pueden participar). Se encierra en un cuadro rojo los genes candidatos y en amarillo los genes involucrados en la vía metabólica de lípidos. Figura tomada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

13.- Discusión

El estudio de los lípidos de membrana en *Burkholderia cenocepacia* J2315 es un tema relevante ya que esta bacteria Gram negativa es patógena oportunista para humanos con fibrosis quística y EGC causando neumonía. Esta cepa puede producir los lípidos CL, PG, PE, y OLs, así como los OLs hidroxilados NL1, NL2, 2-OH-PE y 2-OH-OLs.

Cabe mencionar que se ha reportado la relación de los lípidos de membrana con la patogenicidad en otras bacterias como el lípido A de *Salmonella typhimurium*, y la resistencia a altas temperaturas. Se ha encontrado que *Rhizobium tropici* CIAT889 mostró ser más sensible a estrés térmico y ácido cuando muestra mutación en el gen OlsC (Guerrero-Castro, *et al.*, 2018). Sin embargo, una mutante de *Burkholderia cenocepacia* J2315 en el gen OlsB (NG1) que es deficiente en la producción de todas las clases OLs no se vio afectada por el estrés térmico y ácido; Probablemente la producción de PE estándar y 2-OH-PE de la cepa NG1 sustituya la función de los OLs, por lo que PE estándar podría ser un análogo funcional de los OL estándar y sustituya la función de los 2-OH-OLs en *R. tropici* CIAT889 (González-Silva, *et al.*, 2011).

Como primera estrategia para encontrar los genes y enzimas involucrados en la producción de 2-OH-PE y 2-OH-OL, se construyó un banco de cósmidos con 1440 transconjugantes de *Bordetella bronchiseptica*, se analizaron todas las células y se encontró el cósmido que presentaba fenotípicamente la hidroxilación del lípido de ornitina (Fig. 11), posteriormente se mandó a secuenciar; las secuencias encontradas en el cósmido se ensamblaron con el algoritmo SPAdes y se encontraron 21 genes con agrupaciones que no mostraban especificidad entre sí, provenían de regiones muy alejadas; sin embargo se piensa que esto pudo haber ocurrido por quimerismo, ya que, al tener replicones estructuralmente similares, se unieron fragmentos de ADN separados en el genoma original en el inserto de este cósmido.

Al analizar las posiciones y probables actividades de los dominios de los genes obtenidos de la secuenciación del cósmido, se proponen tres genes candidato; *BCAL0870*, *BCAL0884* y *BCAL2208* que puedan tener participación en la hidroxilación del lípido de ornitina en el carbono 2 del ácido graso esterificado de *Burkholderia cenocepacia* J2315. Al observar el mapa genómico de estos candidatos se encuentran genes adyacentes que se ven involucrados en la vía metabólica de lípidos (Fig. 12).

BCAL0870 codifica para una putativa oxidoreductasa, se le relaciona con los dominios conservados; GlpC, FAD-oxidase_C, y Fer4_8, 4 (Fig. 13) que se ven involucrados en reacciones de oxidoreducción (Otaka, *et al.*, 1987 y Fraaije, *et al.*, 2000). Por otra parte, el gen *BCAL0884*, codifica para una proteína putativa acil-CoA dehidrogenasa oxidoreductasa. Se le relaciona con la familia de acil-CoA dehidrogenasas (Fig. 14); se sabe que son enzimas que catalizan la transferencia de electrones, como la deshidrogenación α , β de los ésteres de acil-CoA (Matsubara Y., *et al* 1989 y Tanaka, *et al* 1987). Se podría analizar fenotípicamente la actividad de estas enzimas putativas clonándolos cada gen en un plásmido de expresión pET9a y transformarlos en una cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3) OlsF formando Ols. Sin embargo, podría haber la posibilidad de que los genes *BCAL0870* y *BCAL0884* actúen en conjunto, por lo que una alternativa es clonarlos juntos (véase 11.1.5 a 11.1.7).

La principal elección de *BCAL2208* como uno de los candidatos putativos a la actividad buscada, fue por la relación con los dominios de BIOTINYL_LIPOYL y PSBD (Fig. 16), donde se ven involucrados en reacciones de oxidoreducción principalmente en la transferencia de un grupo carboxilo y la unión covalentemente a través de un enlace amida a un residuo de lisina en enzimas requeridas (Shenoy, *et al.*, 1992). Cabe mencionar, que se pueden observar genes que están involucrados en la vía metabólica de lípidos ubicados río arriba de dicho gen (Fig. 15).

Como segunda estrategia para encontrar el gen involucrado en la síntesis de 2-OH-PE, se analizaron 199 mutantes obtenidas por mutagénesis química con MNNG. En estudios anteriores del grupo de investigación no reportados está cepa se había tratado con 100µg/ml de MNNG, y se había observado que el porcentaje de sobrevivencia no disminuyó lo suficiente para asegurarse de haber causado suficiente daño celular. Por lo tanto, se trató la cepa modelo con 30 veces más concentración de MNNG, es decir 3mg/ml y se consideró exitoso el parámetro de concentración usado ya que, a los 30 min, la cepa dejó de crecer. Se analizaron las colonias mutagenizadas para buscar el fenotipo de ausencia de los lípidos hidroxilados y se lograron identificar 3 mutantes con un fenotipo interesante. Dos de ellas (S2 y S4) presentaban una reducción en la producción de 2-OH-PE, mientras que la otra (S1) presentaba una reducción en la producción de 2-OH-OL y 2-OH-PE (Fig.18). Se mandaron a secuenciar las muestras de ADN genómico de estas 3 cepas junto con la cepa silvestre; los genomas se ensamblaron con el algoritmo SPAdes y por medio de Tbreseq se pudieron determinar las mutaciones de cada una. Se realizó una comparación de los genes con mutaciones identificados en las tres cepas mutantes, que no estaban presentes en tipo silvestre y se encontró un gen candidato a estar involucrado en la hidroxilación de PE. El gen *BCAL3475* codifica una oxidorreductasa que contiene molibdopterina. Un dato importante es que, río arriba del gen candidato se encuentra un gen adyacente involucrado en el metabolismo de lípidos, más específicamente *BCAL3474* con actividad acil-CoA sintetasa de cadena larga (Fig. 20).

Se ha observado en *Salmonella typhimurium* el gen *phsA* que codifica para una subunidad que contiene molibdopterina tiosulfato reductasa PhsA que cataliza la reducción del tiosulfato a sulfito y sulfuro de hidrógeno, con menaquinol como único donante de electrones (Stoffels, *et al.*, 2011), por lo que se propone que el gen *BCAL3475* pudiera participar en la hidroxilación de PE.

Cabe mencionar que no se encontró ninguna mutación que solo compartieran las cepas S2 y S4 que presentaban el mismo fenotipo (2-OH-PE reducido

fenotípicamente). En la mayoría de los casos la cepa S1 (cepa con 2-OH-OL Y 2-OH-PE reducido fenotípicamente) también, presentó las mismas mutaciones, con la excepción de *BCAM1881* quien compartía esta cepa y S4. La posibilidad de que la enzima que está involucrada en la producción de 2-OH-PE también lo esté en la producción de 2-OH-OL es baja debido a que la transconjugante de *B. bronchiseptica* con el cósmido solo mostró el fenotipo de 2-OH-OL; sin embargo en el presente trabajo la cepa S1 también, presenta una reducción cualitativa significativa de 2-OH-OL, se podría deducir que esto se debe a la presencia de más mutaciones encontradas en esta cepa con respecto a las cepas S2 y S4 (Tabla 8 y 9), las descripciones de tales mutaciones apuntan a reguladores transcripcionales (Tabla 7). Por lo que se deduce que las cepas están relacionadas en cuanto al fenotipo mostrado.

Esta estrategia se llevó a cabo debido a que la búsqueda del cósmido que podría haber tenido el gen que codifique a la enzima responsable o involucrada en la síntesis de 2-OH-PE no fue exitosa.

Por último, se realizó un alineamiento con los 21 genes que se encontraron en el cosmido de la primera estrategia con los genes mutados y deleciones obtenidas de cada mutante candidata obtenida por tratamiento con MNNG del genoma de *Burkholderia* como segunda estrategia, sin embargo, no se encontró ninguna coincidencia. Por otro lado, se obtuvieron los genes únicos presentes en cada una de las mutantes químicas para perspectivas futuras, véase sección 17.4.

14.-Conclusión

Como primera parte de este trabajo se construyó un banco con 1344 de transconjugantes de *Bordetella* con cósmidos que contienen la librería de *Burkholderia cenocepacia* J2315.

Se encontró un cósmido cuya presencia en la cepa de *B. bronchiseptica* causaba la presencia de 2-OH-OL. Se extrajo el cósmido de esta cepa y se mandó a secuenciar.

Se obtuvieron 21 genes presentes en el cósmido secuenciado, de los cuales se proponen tres candidatos; *BCAL0884*, *BCAL0870*, *BCAL2208*, donde, al menos uno podría tener actividad como OlsC al estar involucrados en la reacción $OL \rightarrow 2-OH-OL$.

La probabilidad de que la enzima que está involucrada en la producción de 2-OH-PE también lo esté en la producción de 2-OH-OL es baja, debido a que la transconjugante de *B. bronchiseptica* con el cósmido solo mostró el fenotipo de 2-OH-OL.

Por otro lado, como segunda estrategia para encontrar el gen involucrado en la síntesis de 2-OH-PE, se construyó un banco con 192 mutantes químicas utilizando MNNG a 3mg/ml.

Se encontraron tres mutantes candidatas de la cepa modelo, dos de ellas presentan fenotípicamente la ausencia de producción del lípido de 2-OH-PE y la otra presenta la disminuida producción de 2-OH-OL y 2-OH-PE. El ADN total de estas mutantes se mandó a secuenciar.

Por medio de la identificación de polimorfismos en comparación con el tipo silvestre, se obtuvieron 5 mutaciones que estaban presentes en las tres cepas mutantes y 1 mutación que solo compartían la cepa S1 y S2.

Se propone que el gen *BCAL3475* encontrado en las 3 mutantes químicas, pueda estar involucrado en la producción de 2-OH-PE.

Recopilando los resultados obtenidos, podemos concluir que en el presente trabajo se redujo la búsqueda de los genes responsables de la hidroxilación en la posición dos del ácido graso tanto para OL como para lípido PE.

15.- Perspectivas

Con base a los resultados obtenidos, se podrá determinar si los genes candidatos putativos; *BCAL0884*, *BCAL0870*, *BCAL2208* encontrados de *Burkholderia cenocepacia* J2315 tienen actividad como hidroxilasas o están involucrados en la síntesis de 2-OH-OL, de igual manera el gen *BCAL3475* para la producción 2-OH-PE (Véase 9.1.5.1 y 9.1.5.2).

Una vez identificado el gen responsable, se podría construir una mutante deficiente de los genes de interés para realizar pruebas de resistencia a antibióticos, también, podría llevarse a cabo un ensayo enzimático y ensayos de virulencia.

16.-Referencias bibliográficas

Aoyama, *et al.*, 1994. Rat very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, a novel mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase gene product, is a rate-limiting enzyme in long-chain fatty acid beta-oxidation system. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of the cDNA-expressed protein. Department of Biochemistry, Shinshu University School of Medicine, Nagano, Japan. *J Biol Chem*:19088-94.

Araque, *et al.*, 2008. Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. Obtenido de Sistema de Información Científica Redalyc Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal: 28, (2), 82-88

Bligh, *et al.*, 1959. A rapid method of total lipid extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*: 911-917

Bottero, *et al.*, 2010. Bases moleculares para la prevención de una enfermedad causada por *Bourdella pertussis*, un patógeno re emergente. Universidad Nacional de la Plata. Tesis de doctorado: 23-34.

Ditta, *et al.*, 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13: 149-153.

Dowhan, *et al.*, 2008. Functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5thEdition). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. 1-37.

Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2015. OlsG (Sinac_1600) Is an Ornithine Lipid N-Methyltransferase from the *Planctomycete Singulisphaera acidiphila*. *J Biol Chem.*; 290(24): 15102–15111.

Fingermann, *et al.*, 2011. Caracterización molecular y funcional de la respuesta a la acidez en *bordetella bronchiseptica*. posible rol en la infección persistente. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Tesis de Doctorado: 13-14.

Fraaije, *et al.*, 2000. Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem*: 25(3):126-32.

Gao, *et al.*, 2004. Identification of a gen required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Molecular Microbiology* 53 (6), 1757-1770.

Geiger, *et al.*, 1999. The regulator gen *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Molecular Microbiology* 32 (1), 63-73.

Geiger, *et al.*, 2010. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Progress in lipid research* 49 (1):46-60

Gibbons, *et al.*, 2000. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-Hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid a: FUNCTION OF LpxO, a NEW Fe²⁺/a-KETOGLUTARATE-DEPENDENT DIOXYGENASE HOMOLOGUE. *Journal of Biological Chemistry*: 275 (42), 32940-32949.

Gibbons, *et al.*, 2005. Role of Mg²⁺ and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumor cells. *Molecular Microbiology*: 55 (2), 425-440.

Gibbons, *et al.*, 2008. An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. *Biochemistry* 47 (9), 2814-2825.

González-Silva, *et al.*, 2011. The Dioxygenase-Encoding *olsD* Gene from *Burkholderia cenocepacia* Causes the Hydroxylation of the Amide-Linked Fatty Acyl Moiety of Ornithine-Containing Membrane Lipids, *de Biochemistry*. *Biochemistry*:6396-408

Goodman, *et al.*, 1984. Synthesis and evaluation of radioiodinated terminal para-iodophenyl-substituted .alpha.- and .beta.-methyl-branched fatty acids. *J. Med. Chem*: 390–397

Guerrero-Castro, *et al.*, 2018. Dissecting the Acid Stress Response of *Rhizobium tropici* CIAT 899. National Library of Medicine National Institutes of Health. *Front Microbiol*; 9: 846.

Hall, *et al.*, 1983. Enzymatic deacylation of the lipid A moiety of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides by human neutrophils. *Medical Sciences*:6671-6675.

Hanahan, *et al.*, 1983. 8. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol.*

Kawai, *et al.*, 1982. Characteristic lipids of *Bordetella pertussis*: simple fatty acid composition, hydroxy fatty acids, and an ornithine-containing lipid. *J. Bacteriology*: 996-1005.

Kim, *et al.*, 2018. Bacterial ornithine lipid, a surrogate membrane lipid under phosphate-limiting conditions, plays important roles in bacterial persistence and interaction with host. *Environ Microbiol*, 20(11):3992-4008.

López-Lara, *et al.*, 2003. Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (7), 567-579.

Madigan, *et al.*, 2006 *Brock biology of microorganisms*. Pearson Prentice Hall, 11th ed. U. S. A..

Mahenthiralingam, *et al.*, 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol*, 3.

Mande, *et al.*, 1996. Protein-protein interactions in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: dihydrolipoamide dehydrogenase complexed with the binding domain of dihydrolipoamide acetyltransferase. *Structure* 4:277-286(1996).

Mandrell, *et al.*, 1993. Lipooligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS". *Immunobiology*: 382–402

Martina, *et al.*, P. F. 2013. Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia* recuperados del tracto respiratorio de. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. Tesis de Doctorado: 27-38.

Mathews F.S, *et al.*, 1991, New flavoenzymes *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:954-967.

Matsubara Y., *et al.*, 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. Sequence homology of four enzymes of the acyl-CoA dehydrogenase family. *J Biol Chem.*:16321-31.

Meyer, *et al.*, 1988. The evolution of ferredoxins. *Trends Ecol.*: 3, (9), 222-226.

Morrison, *et al.*, 1977. Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cell. *J Bacteriol*: 132.

Murakami, *et al.*, 2020 Tripartite transporters as mechanotransmitters in periplasmic alternating-access mechanisms. *FEBS Lett*: 594(23):3908-3919

Neidhardt, *et al.*, 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Celular and Molecular Biology*: 58-

Neumann, *et al.*, 2009, A periplasmic aldehyde oxidoreductase represents the first molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor containing molybdo-flavoenzyme from *Escherichia coli*. Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Germany. FEBS J.;276(10):2762-74

Nikaido, *et al.*, 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol. Microbiol Mol Biol: 593-656.

Otaka, *et al.*, 1987. Examination of protein sequence homologies: IV. Twenty-seven bacterial ferredoxins. J. Mol. Evol.: 26, 257-267.

Parsons, *et al.*, 2013. Bacterial Lipids: Metabolism and Membrane Homeostasis. Prog Lipid Res. :249–276.

Perham, *et al.*, 1998. Swinging arms in multifunctional enzymes and the specificity of post-translational modification. Biochem. Soc. Trans: 299-303

Perham, *et al.*, 2000. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. Annu. Rev. Biochem. 69:961-1004.

Raaijmakers H., *et al.*, 2002 Teixeira S. Bursakov S. Huber R. Moura J.J. Moura I. Romao M.J. Gene sequence and the 1.8 Å crystal structure of the tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Structure 10:1261-1272.

Raetz, *et al.*, 2007. Lipid a modification systems in gram-negative bacteria. Annual review of biochemistry: 76, 295-329.

Robien M.A., *et al.*, 1992. Three-dimensional solution structure of the E3-binding domain of the dihydrolipoamide succinyltransferase core from the 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. Biochemistry 31:3463-3471.

Rock, *et al.*, 2008 Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes. In: Vance, D. E., and Vance, J. E., editors. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5th Edition). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 59-96.

Rojas-Jiménez, *et al.*, 2005. A CIC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance. . Mol. Plant-Microbe Interact., 1170-1185.

Rojas-Rojas, *et al.*, 2018. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal patógenas de plantas, animales y humanos.. Revista Argentina de Microbiología: 51 (1) 84-92.

Rothery, *et al.*, 2008. The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. Biochim. Biophys. Biochim Biophys;1778(9):1897-929.

Rudder, *et al.*, 1997. *Rhizobium meliloti* Mutants Deficient in Phospholipid. Institute of Biotechnology, Technical University of Berlin, Berlin, Germany,1 and Department of Mass Spectrometry, Utrecht University, The Netherlands. J. of Bacteriology: 6921–6928.

Shenoy, *et al.*, 1992. The importance of methionine residues for the catalysis of the biotin enzyme, transcarboxylase. Analysis by site-directed Mutagenesis. J. Biol. Chem 267 (26): 18407-18412.

Sohlenkamp, *et al.*, 2015. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. FEMS Microbiology Reviews. FEMS Microbiol Rev.;40(1):133-59

Stoffels, *et al.*, 2011. Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force Institute for Microbiology and Wine Research, Johannes Gutenberg-University of Mainz, Mainz, Germany. *J Bacteriol.*;194(2):475-85.

Studier, *et al.*, 1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol Biol.*, 219:37–44.

Tanaka, *et al.*, 1987. Molecular basis of isovaleric acidemia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Methods Enzymol.*: 185:60-89.

Ulrich, *et al.*, 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology* 13 (2), 52-56.

Vences-Guzmán, *et al.*, 2011. Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol Microbiol.*: 1496–1514

Vences-Guzmán, *et al.*, 2012. Ornithine lipids and their structural modifications: from A to E and beyond. *FEMS Microbiology Letters*: 1–10

Vences-Guzmán, *et al.*, 2013. *Agrobacteria* lacking ornithine lipids induce more rapid tumour formation. *Environmental Microbiology*:15 (3), 895-906.

Vences-Guzmán, *et al.*, 2014. ESTUDIOS SOBRE LAS MODIFICACIONES QUE PUEDEN SUFRIR LOS LÍPIDOS DE ORNITINA EN BACTERIAS DE LA FAMILIA *Rhizobiaceae*. Tesis de Doctorado: 15-36.

Vences-Guzmán, *et al.*, 2015. Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environmental Microbiology* . *Environ Microbiol.*:1487-96.

Weissenmayer, *et al.*, 2002. Identification of a gen required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Molecular Microbiology*: 45 (3), 721-733.

Wootton, *et al.*, 1991. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1057:157-185.

Zavaleta, *et al.*, 2010. Sinorhizobium meliloti phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107(1), 302–307.

17.-Apéndice

17.1.-Medio de cultivo para todas las cepas utilizadas

Medio LB (5 g extracto de levadura, 10 g de peptona de caseína, 10 g NaCl y en caso de medio sólido agar – agar 15 g para 1L).

17.2.- Fases móviles utilizadas, mostrándose solventes y proporción (v/v/v)

Fase móvil A:

CHCl₃ – CH₃OH – H₂O (130:50:8, v/v/v)

Fase móvil B:

CHCl₃ – CH₃OH – H₂O (140:60:10, v/v/v)

Fase móvil C:

CHCl₃ – CH₃OH – CH₃COOH (130:50:20, v/v/v)

17.3.-Buffers y soluciones

17.3.1.-Electroforesis de ADN

Buffer de carga 6X: 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol FF, 40% sacarosa

TAE 10X: (0.04 M Tris, 1% ácido acético, 0.05 EDTA, pH 8).

17.3.2.-Buffer CP

7.6 g de Ácido cítrico anhidro y 22.6g de Fosfato de sodio heptahidrato dibásico por litro de agua mili-Q.

17.4.-Genes mutados *Burkholderia cenocepacia* J2315 tratada con MNNG 3mg/ml que podrían ser de interés.

Tabla 7. Genes mutados únicamente presentes en la cepa S1 de *Burkholderia cenocepacia* J2315 tratada con MNNG 3mg/ml. Tabla donde se muestra la descripción general de los genes mutados que únicamente están en la cepa S1 que presenta fenotípicamente la reducción en producción de 2-OH-OL y 2-OH-PE. El nombre de los genes se asignó de acuerdo con el programa breseq, para más información solicitar los archivos completos al autor del presente trabajo.

Mutation	annotation	gene	description
G→A	K178K (AAG→AAA)	<i>resA_2</i> →	Thiol-disulfide oxidoreductase ResA
C→T	A16T (GCC→ACC)	<i>BCWT_03645</i> ←	hypothetical protein
T→G	F66V (ITC→GTC)	<i>rplO</i> →	50S ribosomal protein L15
G→A	T3T (ACC→ACI)	<i>dmlR_27</i> ←	HTH-type transcriptional regulator DmlR
G→A	Q22* (CAG→IAG)	<i>rhIE_1</i> ←	ATP-dependent RNA helicase RhIE
C→T	E372K (GAG→AAG)	<i>gpFI_1</i> ←	Putative prophage major tail sheath protein
C→T	E256E (GAG→GAA)	<i>tamB</i> ←	Translocation and assembly module TamB
C→T	intergenic (+49/+100)	<i>BCWT_05197</i> → / ← <i>maeB_3</i>	hypothetical protein/NADP-dependent malic enzyme
C→T	intergenic (+138/-21)	<i>BCWT_00934</i> → / → <i>BCWT_00935</i>	Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein/hypothetical protein
A→T	F302Y (TIC→TAC)	<i>mutL</i> ←	DNA mismatch repair protein MutL

G→A	intergenic (-165/-9)	<i>mutL</i> ← / → <i>BCWT_06109</i>	DNA mismatch repair protein MutL/putative membrane protein
G→A	Q1092Q (CAG→CAA)	<i>mfd</i> →	Transcription-repair-coupling factor
G→A	R331C (CGC→IGC)	<i>trpS</i> ←	Tryptophan--tRNA ligase
C→T	E136K (GAA→AAA)	<i>BCWT_06792</i> ←	putative HTH-type transcriptional regulator
T→C	intergenic (-11/-265)	<i>tolB_1</i> ← / → <i>norG_3</i>	Protein TolB/HTH-type transcriptional regulator NorG
G→A	G73E (GGG→GAG)	<i>BCWT_02398</i> →	hypothetical protein
+G	intergenic (-/+1537)	- / ← <i>BCWT_07083</i>	-/hypothetical protein
G→A	I527I (ATC→ATI)	<i>ftsK_2</i> ←	DNA translocase FtsK

Tabla 8. Genes mutados únicamente presentes en la cepa S2 de *Burkholderia cenocepacia* J2315 tratada con MNNG 3mg/ml. Tabla donde se muestra la general de los genes mutados que únicamente están en la cepa S2 que presenta fenotípicamente la reducción en producción de 2-OH-PE. El nombre de los genes se asignó de acuerdo con el programa breseq, para más información solicitar los archivos completos al autor del presente trabajo.

gen	annotation	gene	description
C→T	A215T (<u>G</u> CC→ <u>A</u> CC)	<i>aaeB_3</i> ←	p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeB
Δ386 bp		<i>BCWT_07229</i>	BCWT_07229
C→T	G388D (<u>G</u> G <u>C</u> → <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u>)	<i>BCWT_06204</i> ←	hypothetical protein
T→C	N228D (<u>A</u> AC→ <u>G</u> AC)	<i>guaB_1</i> ←	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
C→T	D246D (G <u>A</u> <u>C</u> →G <u>A</u> <u>T</u>)	<i>vgrG1_10</i> →	Actin cross-linking toxin VgrG1
G→A	G513S (<u>G</u> GC→ <u>A</u> GC)	<i>speF</i> →	Inducible ornithine decarboxylase

Tabla 9. Genes mutados únicamente presentes en la cepa S4 de *Burkholderia cenocepacia* J2315 tratada con MNNG 3mg/ml. Tabla donde se muestra la descripción general de los genes mutados que únicamente están en la cepa S4 que presenta fenotípicamente la reducción en producción de 2-OH-PE. El nombre de los genes se asignó de acuerdo con el programa breseq, para más información solicitar los archivos completos al autor del presente trabajo.

mutation	annotation	gene	description
G→A	P224S (<u>C</u> CG→ <u>T</u> CG)	<i>iucB_2</i> ←	N(6)-hydroxylysine O-acetyltransferase
C→T	D78D (G <u>A</u> <u>C</u> →G <u>A</u> <u>T</u>)	<i>lpxH_1</i> →	UDP-2,3-diacetylglucosamine hydrolase
C→T	C154C (T <u>G</u> <u>C</u> →T <u>G</u> <u>T</u>)	<i>catM_2</i> →	HTH-type transcriptional regulator CatM

17.5 Anexos

FosmidMAX™, L. (2018). FosmidMAX™ DNA Purification Kit. Epicentre. Web: <https://www.lucigen.com/fosmidmax-dna-purification-kit/>

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Sitio web: <https://www.genome.jp/kegg/>. Kanehisa Laboratories. (1995-2019).

Kit: EZ-Tn5™ Insertion, K.-2. (2016). Lucigen. Obtenido de Epicentre: <https://www.lucigen.com/EZ-Tn5-KAN-2-TET-1-DHFR-1-Insertion-Kits/#subcat-tabs2>

National Center for Biotechnology Information, de U.S. National Library of Medicine Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PCR, K. G. (s.f.). Thermofisher. Obtenido de Applied biosystems: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_041555.pdf

The biology corner. (s.f.). Obtenido de <https://www.biologycorner.com/category/worksheets/cell-biology/>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **VENCES GUZMAN MARITZA LORENA** con número de matrícula **20144012121** cuyo título es:

“CARACTERIZACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA HIDROXILACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 27 de abril del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA
DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP
DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA
DR. RAÚL PERALTA RODRÍGUEZ

(PRESIDENTE).
(SECRETARIO).
(VOCAL).
(SUPLENTE).
(SUPLENTE no participa)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2022-04-28 00:15:57 | Firmante

oDnQUKo2VBuRW6+slxWe42uoud4TW0K5REsed6Kv8dZCFgiL9PTfaXGmCUD3xhqmwWiiChzv7Dfgq7DeOmKcgnwnjoa7N0U6RBfj4eWBQXkHQ9IRfTorD+8kZeYahbwwCAz2hnPWUmBDUzNNOVa+ORSLobWWDwhZBwqtpNpus9Qjtucq2G+xJcNXBCW6qo7g8XFMJIDWh6AknfeHCytnngamJak617EMo9OQpEg80tstZWGblng6/dm0B5vi2nPqXBWuZ9LUNtV15luX2FLvXfktUZM2c6kmvk4vfn7l6g1AzZVoXxvWciAJ+Xo7WYjBT6+p4QOWkDxbkMWHY8mE9Lg==

CHRISTIAN SOHLENKAMP | Fecha:2022-04-28 09:14:08 | Firmante

OWCnhluYFfjUFSBn/Dii/H9uuxdaBV1e2L46WezS82XAycUgO+SE5vfbX12qfotTupLnsdTinYAW477rNjuqI08A90Q6ik+TuHeLI5hL20wlhJvmeBhj7RtYRuWQBF2x6R9gGQxTX1BqRgYT+y8BtjH8PzHShuuKpbR/fIBH0loK8/biNYUf7L7nRM8VvqK35EfUqgMHmD96upGw2oHP4rcaBq06vs46qB9zEwLR8PJER+uWag7bsfdgG8YrWYmWGsJwF+wIE7KsgmqiRoxsh9Hq4KOP7aoykfAoEtB5DtN9MiX2YW7HMDK7f7ixZot2vusGZeTeS42iYrjAjXg==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-04-28 10:28:53 | Firmante

X+eebayB5BeEMltCZxvkg92j3ZubhMOWdHzrZ0HNMIImoZTzSS0jn7DZT1xN/8C7F+hTXcJDifc3s06NR88mvarQATdwnAMPqurqjECgxu87dRngaiG8lmyRvaKt/Qd7Ra54VlaFRgF+YRaS3kYSziYywkVnMU0PeAEw3LY2JUCjnhumlIxbNW5DTTPz7hjHNAI3yYllgFJ8shLJX7YomhqnOfktnogy6A/M/1xVr5VBKkqm3iQ592OqFWLMLhgBghAyzMXcnjhRfLityQ9jx6fMF0KIRuYVTxvRawFAVMQHa2hqqh3ii+ceDHUJlxZly6UrWojH0yyRZSbhdnEg==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2022-05-03 11:00:23 | Firmante

mxvdZC1jUP0jqxgJcqnlijnfjBe9K7vWnrr35K9b4qJ0BFmHivUxWPSlkiWRYBUfKzZ1EOdOyYrkl29ePP3SXJkVZ42wc0RQhhKz9uTZmZ+HN7y8wzcPIUaN1e7nvCV3TB2mc+mK6/qKdiVQBWDCOursppNq++fu75Ntp1FGdD/VZA02pZM2S0hHwQc83QTOH12C4cDdXnJAmwX8R3tEFAPz48zi88A7PkGtntgb70F/KP+HdOzRf2Zjv8EHCEvvsGjptnta4vWyD FefR2JWmKVfvrSeb6gRKEixkRQA1A7AJX+fWc+GQTuTAa6ymuNSJZcXa+Mlwj6XO81BBUw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



MUCSeOPkX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/D33wpaTvrGk4zxqQsCHTqqEs4EhbInS>

