



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Identificación y clonación de algunos de
los genes de *Alicyclophilus* sp.
relacionados con su capacidad para
utilizar poliuretano como única fuente de
carbono

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

CLAUDIA JULIETA SOLÍS GONZÁLEZ

Tutora: DRA. HERMINIA LOZA TAVERA



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE ALGUNOS DE LOS GENES DE
ALICYCLIPHILUS SP. RELACIONADOS CON SU CAPACIDAD PARA UTILIZAR
POLIURETANO COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera en el laboratorio 105 del Departamento de Bioquímica, en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dra. Katy Juárez López	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Patricia Coello Coutiño, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de amplificación por PCR. Además, agradecemos de forma muy especial el apoyo brindado como tutora temporal durante el primer año de mis estudios de maestría.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, en cuyo laboratorio se realizaron las pruebas preliminares para estandarizar las reacciones de PCR.

Se reconoce la asesoría y colaboración del Dr. Miguel Ángel Cevallos y del M. en C. Luis Lozano del Instituto de Ciencias Genómicas, en cuyo laboratorio se han ensamblado las secuencias pertenecientes al genoma de *Alicyclophilus* sp.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (82881) y por el Programa de apoyo a la investigación y posgrado, FQ-UNAM. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (No. CVU 268810)

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos	Instituto de Ciencias Genómicas, UNAM
Suplente	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

*Sí quieres ser sabio, aprende a interrogar razonablemente,
a escuchar con atención, a responder serenamente y,
a callar cuando no tengas nada que decir.*

Johann Kaspar Lavater

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme cada día la fuerza y el valor necesarios para cumplir las metas propuestas.

A mis padres Emilio Solís y Sara González por todo su amor y su gran apoyo. Gracias papitos porque jamás han dejado de creer en mí pero más importante, porque siempre me han alentado a cumplir mis sueños. Los amo tanto.

A mis amados hermanos Joaquín y Luis porque han llenado de muchas alegrías cada etapa de mi vida. Los adoro latosos.

A Gustavo Cruz Barrios por siempre estar a mi lado durante esta etapa. Gracias por todo tu cariño y apoyo pero sobre todo, porque jamás has dejado de tener fe en mí. No podría decirte todas las ocasiones que tus palabras me dieron la fuerza para continuar.
T.A. Tavito queridito

A la familia Cruz Barrios por su cariño y apoyo. Gracias por los ánimos brindados y por abrirme las puertas de su hogar y de su corazón.

A todos mis amigos, los nuevos, los viejos y los ahora reencontrados, por los grandes momentos de alegría que han compartido conmigo. No pretendo mencionar nombres por temor al olvido de alguno, pero saben muy bien que los quiero mucho.

Gracias a todos por comprender las ausencias, los retrasos, el mal genio y la frustración que en momentos me impidieron estar a su lado. Sin embargo, debo decirles que jamás he dejado de tenerlos en mi mente y en mi corazón.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Herminia Loza Tavera por el cariño y la confianza que siempre ha depositado en mí. Gracias nuevamente por guiarme también en esta etapa.

Al Dr. Martín Vargas por sus consejos y apoyo pero sobre todo por su amistad.

A la M. en C. María del Carmen Parra por su enorme apoyo y todo su cariño.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y del Depto. por hacer más divertido el trabajo.

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
BSA	Bovine serum albumin
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Gm	Gentamicina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Bertani
LT	Lytic transglycosylase
MM-PUh	Medio mínimo poliuretano (Hydroform [®])
pBS	pBluescript
PB	Periplasmic binding protein
PBP	Peptidoglycan binding protein
PU	Poliuretano
PE-PU	Poliuretano-poliéter
PS-PU	Poliuretano- poliéster
SDR	Short chain dehydrogenase-reductase
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Estreptomina
SSC	Citrato sódico salino
VOC	Vicinal oxygen chelate
x-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

CONTENIDO

Abreviaturas	v
Contenido	vi
Índice de tablas y figuras	ix
1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 Poliuretano	3
2.2 Biodegradación del poliuretano	5
2.3 Antecedentes del proyecto	9
2.4 Identificación de los genes de <i>Alicycliphilus</i> sp. BQ1 relacionados con su capacidad de crecer en PU	11
3. Objetivo	16
4. Estrategia experimental	17
5. Materiales y métodos	20
5.1 Cultivo y almacenamiento de las cepas	20
5.1.1 <i>Alicycliphilus</i> sp. BQ1	20
5.1.2 Clonas mutantes PU de <i>Alicycliphilus</i> sp. BQ1	20
5.2 Generación de una mini biblioteca genómica de <i>Alicycliphilus</i> sp. BQ1	21
5.2.1 Extracción de DNA genómico	21
5.2.2 Restricción del DNA genómico con las endonucleasas <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> y <i>PstI</i>	23
5.2.3 Transferencia de DNA a una membrana de nylon.	24
5.2.4 Síntesis y marcaje de las sondas	26
5.2.5 Hibridación tipo Southern	27
5.2.6 Purificación de los fragmentos positivos en el Southern Blot a partir de un gel réplica	29
5.2.7 Construcción de las minibibliotecas	30
5.3 Escrutinio de las mini bibliotecas por hibridación en colonia	34
5.3.1 Transferencia y fijación de la membrana	34
5.3.2 Pre-hibridación/hibridación	35
5.3.3 Purificación de los plásmidos	36

5.4	Escrutinio de una biblioteca genómica de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 mediante hibridación en colonia	36
5.4.1	Sub-clonación de los insertos obtenidos durante el escrutinio de la biblioteca	37
6.	Resultados y discusión	40
6.1	Viabilidad y cultivo de las clonas mutantes	40
6.2	Análisis de los plásmidos recombinantes con los fragmentos genómicos del transposón.	41
6.3	Construcción de mini-bibliotecas genómicas de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	42
6.3.1	Aislamiento y digestión del DNA genómico con las endonucleasas <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> y <i>PstI</i>	43
6.3.2	Marcaje de las sondas con [α - ³² P]dCTP	43
6.3.3	Hibridación tipo Southern	44
6.3.4	Análisis de las clonas resultantes durante la hibridación	45
6.4	Escrutinio mediante hibridación en colonia de una genoteca de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 construida en pUCP24	47
6.4.1	Clonas positivas obtenidas con la sonda 8	48
6.4.2	Clonas positivas obtenidas con la sonda 9	51
6.4.3	Clonas positivas obtenidas con la sonda 38	53
6.5	Identificación de los genes mutados en el genoma de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	54
6.5.1	Clona mutante 5	54
6.5.2	Clona mutante 8	60
6.5.3	Clonas mutantes 9 y 38	66
6.6	Búsqueda del <i>PUase gene cluster</i> en el genoma parcial de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	71
7.	Conclusiones y perspectivas	72
8.	Anexos	74
9.	Bibliografía	91

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1. Reacción de síntesis del poliuretano (PU).
- Figura 2. Sitios posibles de actividad enzimática microbiana sobre el PU.
- Figura 3. Barniz de PU marca Hydroform
- Figura 4. Generación de mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 por inserción del transposón Mariner Himar1:: Gm^R Amp R
- Figura 5. Vector Bluescript KS II (Stratagene)
- Figura 6. Arreglo genómico de los plásmidos pBS8, pBS9 y pBS38
- Figura 7A. DNA genómico purificado de *Alicyclophilus* sp. BQ1
- Figura 7B. Restricciones de 10 μ g DNA genómico con las enzimas ya descritas
- Figura 8. Reacciones de PCR para la síntesis de las sondas
- Figura 9. Hibridación del DNA de *Alicyclophilus* sp. BQ1, con las sondas 8, 9 y 38 sintetizadas y marcadas por PCR con [α - ^{32}P]dCTP
- Figura 10. Patrón de restricciones con *EcoRI*, *PstI* y *HindIII*
- Figura 11. Escrutinio de la genoteca de *Alicyclophilus* sp. BQ1 en pUCP24 mediante hibridación en colonia
- Figura 12A. Análisis y mapa de restricción de la clona UCP8.16 con las enzimas *EcoRI* y *PstI*
- Figura 12B. Contexto genómico identificado en la clona UCP8.16 (*Alicyclophilus* sp. BQ1) comparado con *A. ebreus*
- Figura 13. Análisis de la clona UCP8.17
- Figura 14. Análisis de la clona UCP9.7
- Figura 15. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 5 (cepa BQ1) y el gen Alide_1725 (*A. denitrificans* BC)
- Figura 16. Análisis del contexto genómico de la mutante 5 en *Alicyclophilus* sp. BQ1.
- Figura 17. Comparación del arreglo genético identificado en la región río abajo del gen mutado en la clona 5
- Figura 18. Representación general de los transportadores tipo ABC
- Figura 19. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 8 (cepa BQ1) y el gen Alide_0611 (*A. denitrificans* BC)
- Figura 20. Comparación de los contextos genómicos en *Alicyclophilus* sp. BQ1 y *A. denitrificans* BC identificados para el gen de la mutante 8

- Figura 21. Alineamiento múltiple del dominio LT-GEWL presente en organismos filogenéticamente cercanos
- Figura 22. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 9 (cepa BQ1) y el gen Rru_A3158 (*Rhodospirillum rubrum*).
- Figura 23. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 38 (cepa BQ1) y el gen Alide_4197 (*A. denitrificans* BC)
- Figura 24. Comparación de los contextos genómicos en *Alicyclophilus* sp. BQ1 y *A. denitrificans* BC identificados para los genes mutados en las clonas 9 y 38

Tabla 1. Actividades de tipo “poliuretanasas” identificadas en bacterias

Tabla 2. Análisis de las secuencias parciales de las mutantes obtenidas por la inserción del transposón Himar1 en el genoma de *Alicyclophilus* sp.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para sintetizar las sondas

Tabla 4. Marcaje de las sondas con [α - 32 P]-dCTP

1. RESUMEN

El poliuretano (PU) un polímero sintetizado desde hace 50 años, ofrece grandes ventajas por su versatilidad, resistencia y durabilidad. Existen poliuretanos de tipo poliéter (PE-PU) o poliéster (PS-PU) y pueden ser rígidos, flexibles y líquidos. Los PU se emplean en industrias como la de la construcción, la automotriz y el recubrimiento de muebles, entre otras. La producción y consumo de este polímero, al igual que sus desechos, han aumentado con los años. Los tratamientos físicos y químicos dados a estos residuos son ineficientes y costosos lo que ha ocasionado su acumulación en el ambiente. La biodegradación se ha considerado como alternativa para facilitar y mejorar los tratamientos de desechos sólidos. El PS-PU es vulnerable al ataque por hongos y bacterias, sin embargo, los mecanismos que éstos emplean no son claros. Dada la estructura química del polímero, se propone que enzimas del tipo proteasa, ureasa, esterasa y/o lipasa actúan sobre la molécula y liberan compuestos con menor tamaño mucho más fáciles de utilizar como fuente de carbono por los microorganismos.

En nuestro laboratorio se aisló y se identificó la cepa *Alicyclophilus* sp. BQ1, capaz de crecer en un medio mínimo cuya única fuente de carbono es un barniz de PU comercial (Hydroform®, marca Polyform®) (MM-PUh). Con la idea de identificar los genes relacionadas con el crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ1 en PU, en el laboratorio del Dr. Jesús Campos (IIQB-UMSNH) se generó una biblioteca de mutantes de esta cepa, incapaces de crecer en MM-PUh. La mutagénesis se realizó mediante la inserción del transposón *Mariner Himar1::Gm^R* empleando un plásmido suicida. De 811 clonas analizadas se obtuvieron cuatro mutantes incapaces de crecer en PU. Las secuencias parciales de los genes mutados mostraron que sus productos correspondían a un transportador de tipo ABC (clona 5), una transglicosilasa lítica (clona 8), una proteína hipotética seguida por otra proteína con plegamiento α/β hidrolasa (clona 9) y, una deshidrogenasa reductasa (clona 38).

El objetivo de este trabajo fue obtener la secuencia completa de los genes afectados y analizar el contexto genómico en el que se localizan. Para cumplir estos objetivos se siguieron dos estrategias experimentales: en la primera parte, se realizó un

“Southern blot” utilizando como sondas las secuencias parciales de los genes mutados en las clonas 8, 9 y 38. A partir de los fragmentos de DNA genómico correspondientes a las señales positivas de la hibridación se construyeron mini-bibliotecas de *Alicyclophilus* sp. BQ1 mientras que su escrutinio se realizó a través de hibridación en colonia. Desafortunadamente, el análisis de las clonas resultantes no proporcionó nueva información. Por otro lado, se realizó también el escrutinio de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1 (2,341 clonas), mediante hibridación en colonia, utilizando las tres sondas anteriores. Las clonas positivas se analizaron por reacciones de restricción y los plásmidos de aquéllas que resultaron distintas se purificaron y se secuenciaron. El análisis completo de las secuencias encontradas en los distintos plásmidos mostró que los insertos correspondían a genes distintos a los afectados durante la mutagénesis. Simultáneamente, se obtuvo una secuencia parcial del genoma de la cepa BQ1 y en enero de 2011 se liberó la versión final del genoma de *Alicyclophilus denitrificans* BC. Con esta información se rastrearon los genes mutados dentro del genoma de la cepa BQ1 y las secuencias completas correspondientes a los cuatro genes se identificaron. El gen mutado en la clona 5 tiene un tamaño 1,050 nt y codifica una proteína periplásmica de unión al sustrato, la cual forma parte de un transportador tipo ABC de sulfonatos. Por su parte, el gen mutado en la clona 8 tiene un tamaño de 1,983 nt y su producto es una transglicosilasa lítica. El gen identificado en la clona 9 tiene un tamaño de 417 nt y codifica una proteína hipotética sin caracterizar. Finalmente, el gen mutado en la clona 38 mide 390 nt y su producto es una proteína con un dominio perteneciente a la superfamilia de metaloproteínas VOC.

El papel que las proteínas codificadas por estos genes desempeñan en el metabolismo de la cepa BQ1 sobre PU aún no es claro. Sin embargo, dado el contexto genómico de cada gen, es probable que estén participando un sistema de transporte así como uno relacionado con la detoxificación de la célula.

2. ANTECEDENTES

2.1 Poliuretano

El poliuretano (PU) es un polímero derivado de la condensación de un poliisocianato y un poliol que resulta en la formación del enlace intramolecular uretano (enlace éster carbamato -NHCOO-). De acuerdo al tipo de poliol utilizado, los poliuretanos se dividen en poliuretano de tipo poliéter (PE-PU) y poliuretano de tipo poliéster (PS-PU) (figura 1) (Howard, 2002).

Los PUs presentan distintas características dependiendo de las estructuras químicas de sus precursores, por lo que adquieren distintas formas y propiedades. De manera general se clasifican en rígidos y flexibles. Los PUs rígidos presentan una densidad más elevada que los PUs flexibles pero tienen características muy similares. Los PU rígidos se utilizan como paneles para el aislamiento térmico en la construcción y para la fabricación de autopartes en la industria automotriz. Por su parte, los PUs flexibles se utilizan ampliamente como espumas, elastómeros, adhesivos y selladores de alto rendimiento, entre muchas otras funciones. Por último, también existen los PUs líquidos, empleados como barnices, pinturas para el recubrimiento de superficies (Howard, 2002).

El uso de los PUs en la industria y en la vida cotidiana proporciona muchas ventajas en comparación con el uso de otros polímeros. Estos compuestos son preferidos sobre otros plásticos gracias a su alta resistencia al agua y a otros solventes, su alta resistencia a la tracción, además de puntos de fusión más altos por lo que logran ser mucho más duraderos (Howard, 2002). Debido a su enorme versatilidad, el uso de los PUs se ha incrementado enormemente en las últimas décadas. Tan solo en el año 2001, el consumo de PU en México fue de 69,152 toneladas, de las cuales el 44% se utilizó para la producción de colchones, mientras que el resto se empleó en la industria automotriz, la fabricación de muebles y de calzado (ANIQ, 2001).

Si bien es cierto que la utilización de estos materiales trae a nuestras vidas grandes ventajas, además de que ha disminuido el uso de maderas y algunos metales, sus

desechos se han convertido en uno de los principales contaminantes sólidos, debido a su difícil degradación. En el año 2000, el 11% del total de la basura estuvo conformado por plásticos, entre los cuales se encuentran los residuos de PU (Inare, 2000)

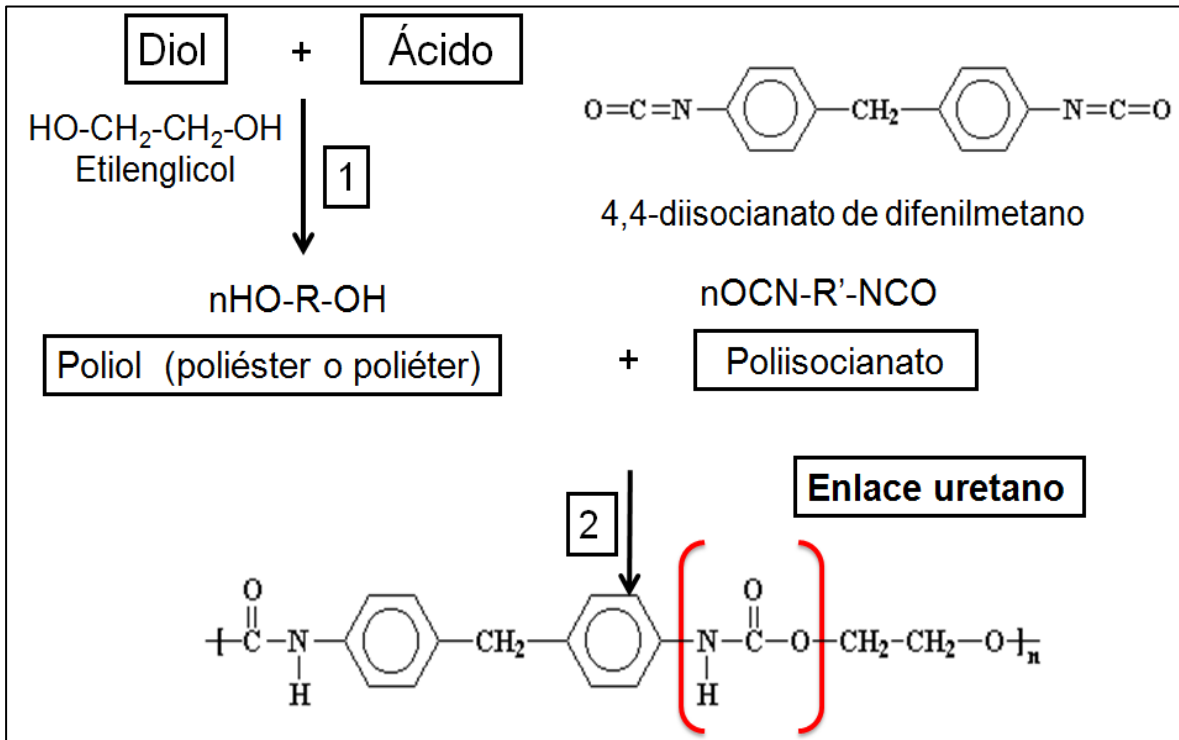


Figura 1. Reacción de síntesis del poliuretano (PU). 1) Formación del grupo poliol mediante la reacción entre un diol, por lo general etilenglicol, y un ácido, por ejemplo ácido adípico. El poliol formado puede ser poliéter o poliéster, dependiendo del ácido utilizado. 2) Una vez formado el poliol, éste reacciona con un grupo diisocianato para formar el enlace uretano.

Actualmente, el tratamiento de residuos de PU se realiza mediante métodos químicos como la hidrólisis de los enlaces éster y uretano que permiten romper al polímero en polioles y diaminas aromáticas. De estas últimas se regenera el diisocianato que, junto con el poliol, pueden reutilizarse. También se utilizan otros métodos de tratamiento como la pirólisis, con la cual se generan hidrocarburos líquidos y gaseosos mediante la aplicación de calor bajo una atmósfera inerte. En la hidrogenación los residuos se tratan con hidrógeno a temperaturas y presiones elevadas (Magdalena, 2007). Por último, la incineración es la forma más efectiva de

reducir los materiales orgánicos que, de otra forma, irían a parar a un vertedero. Sin embargo, durante este proceso se liberan compuestos aromáticos, radicales libres y derivados de isocianatos que, tras exponerse uno a ellos, provocan diversas enfermedades respiratorias como el asma, el aumento en los niveles de inmunoglobulinas E (IgE) y del calcio citosólico en los linfocitos, ocasionando reacciones alérgicas e irritaciones en la piel y ojos (Boutin *et al.*, 2004; Baur, 1994). Por otro lado, el CO₂ generado es perjudicial para el medio ambiente dado que es un gas de los que provocan el llamado efecto invernadero (Magdalena, 2007). En el caso del tratamiento por métodos físicos, básicamente las espumas de poliuretano se muelen y se someten en presencia de ciertos aditivos a presiones y temperaturas altas. Esto permite obtener nuevos productos de PU, que disminuye, en parte, el consumo de PU virgen. Sin embargo, en muchos casos el reciclado mecánico por sí solo no es suficiente para la reutilización de los desechos de PU, por lo que se necesita además el uso de métodos químicos (Magdalena, 2007). Como vemos, el tratamiento actual de estos desechos no es totalmente eficiente y ha resultado complicado, costoso y puede incluso, llegar a ser perjudicial para la salud y el ambiente.

2.2 Biodegradación del poliuretano

Dado lo difícil que resulta el tratamiento de los residuos de PU, en las últimas décadas, se han llevado a cabo estudios enfocados a la búsqueda de nuevas alternativas para la eliminación de estos contaminantes. La biorremediación es una estrategia que utiliza la acción de los microorganismos sobre sistemas contaminados que facilita la eliminación de los compuestos nocivos e impide su acumulación en el ambiente a través de los procesos biodegradativos que ocurren naturalmente. Todo esto ocurre si a los microorganismos se les provee de una fuente de nutrientes y de energía lo que favorece su rápido crecimiento y reproducción (Corton y Viale, 2006).

Como la mayoría de los plásticos, los PUs no se consideraban biodegradables, sin embargo, el PS-PU ha mostrado cierta vulnerabilidad al ataque por hongos y bacterias (Morton y Surman, 1994). Darby y Kaplan (1968) reportaron por primera vez el ataque al PU por hongos, mientras que, en el caso de bacterias, se han descrito cepas de

Corynebacterium sp. (Kay *et al.*, 1993), *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake, 1998), *P. chlororaphis* (Howard *et al.*, 1999) y *Bacillus subtilis* (Rowe y Howard, 2002) capaces de crecer en un medio con PU y extracto de levadura o glucosa como suplementos. Por otro lado, también se ha reportado el crecimiento de *Comamonas acidovorans* TB-35 utilizando PU como única fuente de carbono y nitrógeno (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Desde hace más de diez años ha surgido un gran interés por la biodegradación considerada como una alternativa para eliminar los desechos de estos polímeros, o bien, para facilitar y mejorar su tratamiento fisicoquímico.

El mecanismo por el cual los microorganismos logran degradar estos compuestos no se conoce con detalle. Sin embargo, dada la estructura química del polímero, se ha propuesto que enzimas de tipo proteasa, ureasa, esterasa y/o lipasa podrían actuar sobre los diversos enlaces de la molécula. La liberación de compuestos de menor tamaño facilitaría entonces su utilización como fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999) (figura 2).

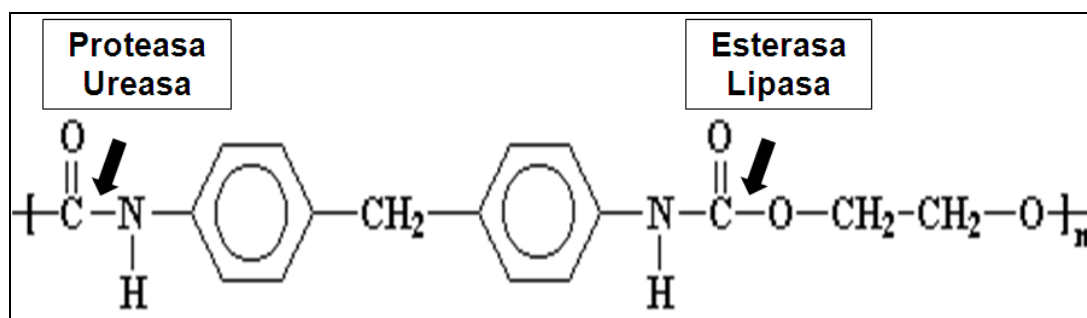


Figura 2. Sitios posibles de actividad enzimática microbiana sobre el PU.

Se han realizado diversos estudios para determinar las actividades enzimáticas que poseen los microorganismos capaces de crecer en PU. En la tabla 1 se muestra una recopilación de la información publicada hasta el momento. Las actividades más representadas son las lipasas y las esterasas, aunque algunas proteasas, e inclusive una uretanasas, también se han identificado como posibles agentes de degradación del PU.

Las actividades de tipo esterasa y de tipo lipasa se centran en la hidrólisis de los enlaces tipo éster presentes a lo largo de la estructura del polímero. En *P. fluorescens* una esterasa con un peso de 48 kDa tiene una secuencia consenso de tipo serina-hidrolasa (Vega *et al.*, 1999). Esta secuencia se encuentra muy relacionada con algunas lipasas de cepas de *P. fluorescens* y *Serratia marcescens* aunque éstas no son capaces de vivir en PU como única fuente de carbono (Ruiz y Howard, 1999).

En *P. chlororaphis* se han identificado tres proteínas extracelulares con características de esterasa (Howard *et al.*, 1999). Se han logrado purificar dos de ellas, (PueA y PueB) con tamaño de 65 y 60 kDa respectivamente, y se demostró que ambas presentan actividad lipasa.

Asimismo, en la cepa de *C. acidovorans* TB-35 se ha reportado la existencia de dos tipos de esterases, una extracelular y otra que se mantiene unida a la membrana plasmática (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Sin embargo, aunque las dos proteínas tienen actividad esterasa capaz de utilizar al p-nitrofenilacetato (p-NPA) como sustrato, únicamente la actividad asociada a la membrana es capaz de atacar al PU sólido (Akutsu *et al.*, 1998).

Hasta el momento, se tiene poca información sobre las actividades de tipo proteasas y de uretanasas sobre el PU. Howard y Blake (1998) purificaron una proteína extracelular de 29 kDa con actividad de tipo proteasa en *P. fluorescens* capaz de atacar PU (Impranil®). Posteriormente se reportó la purificación de una poliuretanasas (PUasa) de 63 kDa con actividad tanto de proteasa como de esterasa en *P. chlororaphis* (Ruiz *et al.*, 1999).

En el caso de actividades de tipo uretanasas, se purificó una proteína con un peso molecular de 55 kDa de la cepa TB-60 de *Rhodococcus equi*. Esta enzima es capaz de romper los enlaces uretano presentes en el ácido 2,4-tolueno dicarbámico dibutil éster (TDCB) utilizado como única fuente de carbono durante el aislamiento de la cepa TB-60 (Akutsu *et al.*, 2006).

Tabla 1. Actividades de tipo “poliuretanasas” identificadas en bacterias.

Organismo	Actividad	Referencia
<i>Corynebacterium</i> sp.	Esterasa (extracelular)	Kay <i>et al.</i> (1993)
<i>P. fluorescens</i>	Esterasa (extracelular)	Vega <i>et al.</i> (1999)
<i>P. chlororaphis</i>	Esterasa	Howard <i>et al.</i> (1999) Stern y Howard (2000) Howard <i>et al.</i> (2001)
<i>C. acidovorans</i> TB 35	Esterasa (extracelular) Esterasa (unida a membrana)	Nakajima-Kambe <i>et al.</i> (1997), Akutsu <i>et al.</i> (1998), Akutsu <i>et al.</i> (1999)
<i>C. acidovorans</i>	Esterasa (extracelular)	Allen <i>et al.</i> (1999)
<i>P. fluorescens</i>	Proteasa	Howard y Blake (1998)
<i>P. chlororaphis</i>	Esterasa y proteasa (extracelular)	Ruiz <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipasa	Rowe y Howard (2002)
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Uretano hidrolasa	Akutsu <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus pumilus</i>	Lipasa	Nair y Kumar (2007)

Por otro lado, se conoce muy poco sobre los genes que codifican a las proteínas responsables de la utilización del PU en bacterias. El gen *pudA* codifica la esterasa asociada a la membrana en *C. acidovorans* TB-35. Cuando este gen se clonó y se expresó en *E. coli* se observó también la presencia de la esterasa extracelular, lo cual indica que ambas enzimas están codificadas por el mismo gen, y que la forma extracelular se libera al medio de cultivo, por alguna modificación postraduccional aún desconocida (Nomura *et al.*, 1998; Akutsu *et al.*, 1999).

Ruiz y Howard (1999) identificaron al gen *pulA*, cuyo producto es una proteína con actividad de esterasa extracelular presente en *P. fluorescens*. Esta proteína tiene un peso de 48 kDa con 451 residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos tiene una identidad del 71% con lipasas de *P. fluorescens* y un 51% con lipasas de *Serratia marcescens*.

También se han clonado los genes *pueA* (Stern y Howard, 2000) y *pueB* (Howard *et al.*, 2001), los cuales codifican dos esterasas extracelulares, que participan en la degradación de PU por *P. chlororaphis*. Utilizando la estrategia de “genome walking” estos genes se han mapeado en una agrupación génica al que denominaron “PUase gene cluster”. En esta agrupación se han identificado siete genes que codifican lo siguiente: una proteína con un cassette de unión a ATP (ABC) (*abc1*); una proteína de fusión de membranas (*mfp1*); una proteína de unión a membrana externa (*omp1*); PueA y PueB, ambas con alta identidad a lipasas de tipo I, y por último, dos serina proteasas PspA y PspB. Este cluster tiene similitud con otros en *P. fluorescens* cuyos genes codifican lipasas extracelulares y a las proteínas involucradas en su transporte. Dada esta información, se ha propuesto que el *PUase gene cluster* de *P. chlororaphis* está relacionado con la producción de poliuretanasas y, probablemente, con la forma de secreción de éstas, empleando un sistema tipo I de lipasas (Howard *et al.*, 2007).

El sistema de secreción tipo I es uno de los mecanismos utilizados por las bacterias Gram negativas para la liberación de proteínas, como las lipasas de tipo I.3, al exterior de las células. Este tipo de lipasas se secretan directamente sin la necesidad de otras proteínas de tipo chaperonas, es decir, la secreción ocurre en un solo paso mediante un complejo exportador que atraviesa las membranas interna y externa de la célula. Este complejo, relativamente sencillo, consta de tres componentes: una proteína con un cassette de unión a ATP (ATP binding cassette, ABC), una proteína de fusión de membranas (membrane fusion protein, MFP) y una proteína de membrana externa (outer membrane protein, OMP). La proteína ABC se encuentra unida a la membrana interna, forma un complejo con la MFP que reside en el espacio periplasmático y con la OMP, que en parte reside en el espacio periplásmico y se encuentra embebida en la membrana externa (Angkawidjaja y Kanaya, 2006).

2.3 Antecedentes del proyecto

En el año 2002 se comenzó un proyecto de investigación bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera del Departamento de Bioquímica, en colaboración con el Dr. M. Javier Cruz G. del Departamento de Ingeniería Química, ambos de la Facultad

de Química, UNAM, cuyos objetivos han sido aislar, identificar y caracterizar bacterias capaces de crecer en un medio con PU como única fuente de carbono y estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la biodegradación. Con estos objetivos en mente, a partir de muestras de hule espuma en descomposición, colectadas en varios sitios del basurero Bordo de Xochiaca (Netzahualcóyotl, estado de México) y empleando un medio selectivo cuya única fuente de carbono es un barniz comercial de PU base agua (Hydroform[®], marca Polyform[®]) (MM-PUh) (Carrillo-García, 2004), se aislaron ocho cepas bacterianas capaces de crecer en PU como única fuente de carbono (Oceguera-Cervantes, 2005) (figura 3). Tres de las cepas aisladas (BQ1, BQ5 y BQ8) que presentaron el máximo crecimiento en MM-PUh, se seleccionaron para continuar con su caracterización. Las tres cepas se identificaron como miembros del género *Alicyclophilus* mediante la secuenciación del gene del 16S *rRNA* (Oceguera *et al.*, 2007; Solís-González, 2008). Este género pertenece a las β -proteobacterias dentro de la familia *Comamonadaceae* y se ha descrito su capacidad de utilizar compuestos como el ciclohexanol como única fuente de carbono (Mechichi *et al.*, 2003). Se observa como bacilos cortos gram negativos, es anarero bio facultativo y se desarrolla en un intervalo de temperatura de 30-37°C.



Figura 3. Barniz de PU marca Hydroform. El barniz es base agua y contiene un 30% de sólidos, producido por Polyform[®] de México.

Al analizar la capacidad de las cepas BQ1 y BQ8 de atacar el PU, se demostró por microscopía electrónica de barrido la presencia de orificios sobre la superficie de laminillas del polímero incubadas con la bacteria, los cuales no aparecieron en las

laminillas control, que presentaban una superficie lisa. Asimismo, por espectrometría de infrarrojo se determinó que la cepa BQ1 fue capaz de atacar los enlaces éster del PU y que una actividad enzimática de tipo esterasa estaba presente en el sobrenadante de los cultivos de estas cepas en MM-PUh (Oceguera *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha podido aclarar si esta esterasa extracelular es la responsable de la actividad, ya que también se ha purificado una actividad esterasa asociada a membrana en cultivos de *Alicyclophilus* sp. BQ1 creciendo en MM-PUh (Sánchez Tafolla, 2010).

La cepa BQ5 por su parte, presenta características de crecimiento diferentes a las observadas en las otras dos cepas. Las células forman agregados desde el inicio del cultivo, en medio líquido, a diferencia de los cultivos de las cepas BQ1 y BQ8 en los cuales se observan estos agregados después de 16 horas. Sumado a esta característica, la cepa BQ5 presenta tres variantes en la morfología de sus colonias al crecer en medio LB sólido. Se ha observado que estas variantes revierten entre sí, sin embargo, hasta el momento no se ha determinado si existe algún factor que dispare la aparición de dichos cambios (Solís-González, 2008).

2.4 Identificación de los genes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 relacionados con su capacidad de crecer en PU

Hasta la fecha, todos los trabajos publicados describen genes cuyos productos son esterases que atacan al PU así como las proteínas posiblemente involucradas en su secreción. Sin embargo, no existe mayor conocimiento sobre la ruta metabólica utilizada por las bacterias para la asimilación de PU. Por esta razón y para comprender más claramente el mecanismo utilizado por *Alicyclophilus* para desarrollarse en PU, ha surgido el interés por aislar y clonar los genes relacionadas con dicha actividad mediante la generación de clones mutantes incapaces de crecer en PU. La mutagénesis la realizó Nancy Barajas en el laboratorio del Dr. Jesús Campos, del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México, utilizando el transposón Mariner Himar1::Gm^R Amp^R contenido en el plásmido suicida pFAC.

Los transposones, presentes tanto en procariontes como en eucariontes, son pequeñas secuencias de DNA capaces de generar mutaciones por inserción y en algunas ocasiones también por deleción. Estos elementos, que de forma natural intervienen en la generación de variabilidad genética a corto plazo y en el desarrollo evolutivo a largo plazo, se han convertido en una importante herramienta utilizada para el análisis genético. Las tecnologías de transposición *in vivo* utilizan la transformación con plásmidos, la conjugación o la infección con fagos como mecanismos para introducir el transposón dentro del organismo blanco. Una adaptación a esta metodología ha sido el desarrollo de vectores suicidas. Un vector suicida tiene dos propiedades 1) después de la transfección, su genoma no se hereda a la siguiente generación por no contener un origen de replicación reconocido por la célula hospedera y 2) el gen que codifica la transposasa se encuentra en el plásmido pero fuera del transposón, por lo tanto, después de la transposición y pérdida del vector suicida, la secuencia que codifica la transposasa no está presente y el producto será genéticamente estable (Reznikoff y Winterberg, 2005).

Utilizando esta estrategia, basada en el trabajo de Wong y Mekalanos (2000) y totalmente estandarizada en el laboratorio del Dr. Campos, se generaron mutantes incapaces de crecer en PU, mediante la movilización del transposón *Himar1::Gm^RAmp^R*. Esta movilización se logró conjugando el plásmido suicida pFAC de *Escherichia coli* S17-1 (cepa donadora) a una cepa de *Alicyclophilus* BQ1 resistente a estreptomycin (Sm). La selección con Sm y Gm permitió obtener las células transconjugantes de *Alicyclophilus* que adquirieron el transposon. La identificación de las mutantes de BQ1 incapaces de crecer en PU se realizó mediante su siembra en MM-PUh y en cajas réplica de LB con Sm y Gm. Se comprobó que las mutantes incapaces de crecer en MM-PU no eran mutantes auxotróficas mediante su siembra en medio mínimo M9 adicionado con 0.2% de glucosa como fuente de carbono y energía. Se confirmó la presencia del transposón en el DNA genómico de las mutantes mediante hibridación tipo Southern, empleando como sonda el fragmento *Himar1::Gm^RAmp^R* amplificado por PCR a partir del plásmido pFAC. El DNA total de las mutantes se digirió con *Pst*I, y se ligo al vector pBluescript. La reacción de ligación se transformó en *E. coli* y se

seleccionaron los plásmidos recombinantes resistentes a Gm, que son aquellos que contienen los genes interrumpidos por el transposón. Los plásmidos recombinantes en los que se confirmó la presencia del fragmento Himar1::Gm^RAmp^R se secuenciaron empleando el oligonucleótido específico MarOut, el cual se encuentra dirigido hacia las secuencias repetidas invertidas del transposón (Barajas-García, 2008). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el algoritmo BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) empleando la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (figura 4).

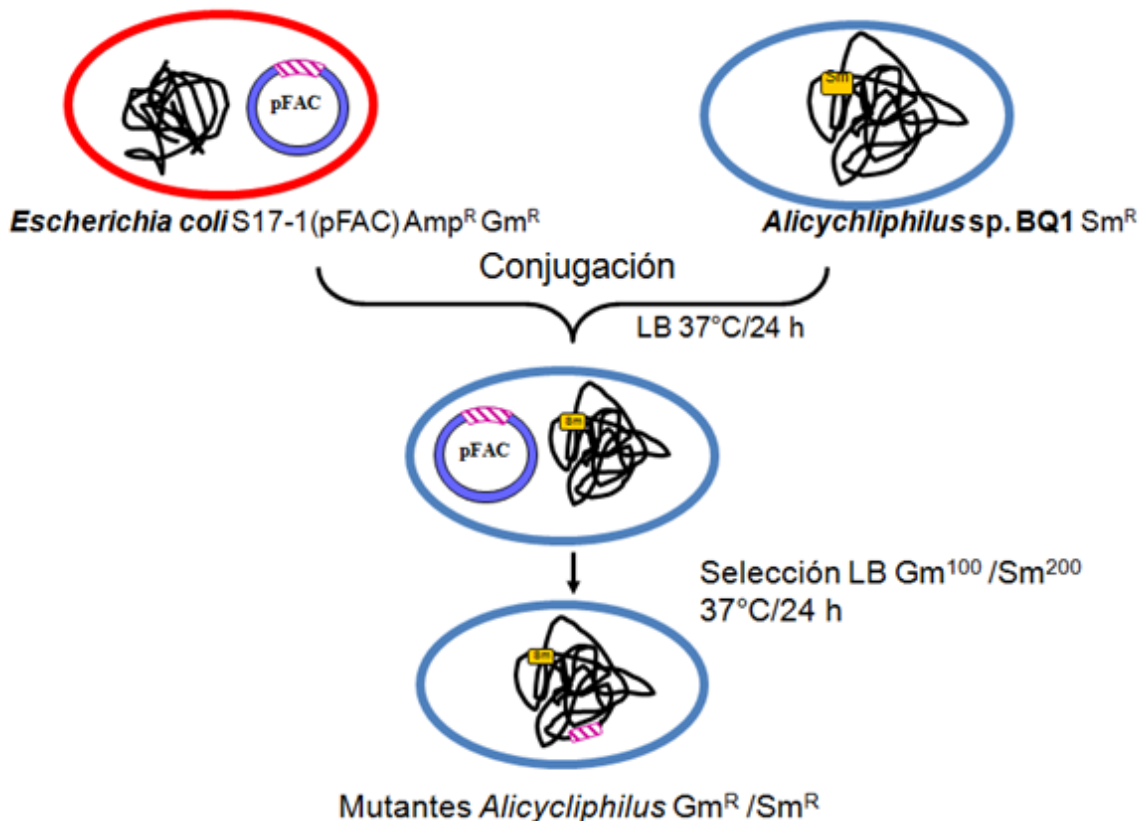


Figura 4. Generación de mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 por inserción del transposón Mariner Himar1::Gm^R Amp^R. Realizado en el laboratorio del Dr. Jesús Campos (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México) siguiendo el método de Wong y Mekalanos (2000) (Tomado de Barajas-García, 2008).

A partir de un banco de mutantes, se analizaron al azar 861 clonas y se obtuvieron cuatro (5, 8, 9, y 38) incapaces de crecer en PU. El trabajo realizado por Barajas-García

(2008) concluyó con el análisis preliminar de las secuencias parciales obtenidas para cada mutante. Las proteínas codificadas por los genes interrumpidos se presentan en la tabla 2. Las secuencias de estas clonas se incluyen en el anexo.

La clona 5 presenta la inserción en un gen cuyo producto es un transportador de tipo ABC, mientras que la secuencia afectada en la clona 8 corresponde a una transglicosilasa lítica (LT), ambas proteínas encontradas en *Acidovorax* sp. JS42, un género filogenéticamente cercano a *Alicyclophilus*. La secuencia obtenida en la clona 9 presenta dos marcos de lectura abiertos. El primero codifica una proteína hipotética de *Rodospirillum rubrum* cuya función se desconoce. En el mismo marco, se encuentra un codón de término seguido por un codón de inicio cuya secuencia corresponde a una proteína con plegamiento α/β hidrolasa encontrado en *Geobacter* sp.

Tabla 2. Análisis de las secuencias parciales de las mutantes obtenidas por la inserción del transposón *Himar1* en el genoma de *Alicyclophilus* sp.

Mutante	Proteína codificada por el gen mutado	Identidad/Similitud %	Organismo
5	Transportador ABC	38/55	<i>Acidovorax</i> sp. JS42
8	Transglicosilasa lítica	87/92	<i>Acidovorax</i> sp. JS42
9	Proteína hipotética	59/76	<i>Rodospirillum rubrum</i>
	α/β hidrolasa	75/85	<i>Geobacter</i> sp. FRC32
38	Deshidrogenasa reductasa	76/84	<i>Acidovorax ebreus</i> TPSY

Finalmente, en la secuencia de la clona mutante 38 se identificó un gen cuyo producto es una proteína deshidrogenasa reductasa de cadena corta (SDR) presente en *Acidovorax ebreus* (Barajas-García, 2008).

El papel que las distintas proteínas identificadas en la mutagénesis, desempeñan dentro de la actividad de la cepa BQ1 sobre poliuretano se mantiene aún desconocido.

Sin embargo, los resultados preliminares para algunos genes han resultado interesantes. Por ejemplo, la posible participación en un sistema de transporte de la clona 5 dado que, como describimos antes, una proteína con unión a ATP también se localizó en el cluster génico relacionado con la capacidad poliuretanolítica de *P. chlororaphis*, sugiriendo entonces la posible existencia de un sistema similar en *Alicycliphilus* sp. BQ1. Por otro lado, si bien el gen identificado en la clona 9 codifica una proteína hipotética cuya función no es clara, el producto del gen vecino muestra un dominio α/β hidrolasa, el cual se encuentra en distintas lipasas y esterases, actividad que se ha encontrado en los cultivos de *Alicycliphilus* sp. BQ1. En el caso de los genes restantes (clona 8 y 38) se necesita más información para proponer su posible función en la actividad sobre el polímero.

En este trabajo se ha planteado conocer las secuencias completas de los genes mutados y el contexto genómico en que se encuentran. Para ello se decidió seguir varias estrategias: mediante la construcción y el escrutinio de una mini-biblioteca, por el escrutinio de una biblioteca genómica, ambas de *Alicycliphilus* sp. BQ1, así como por análisis bioinformáticos.

La información obtenida servirá como punto de partida para un estudio más profundo, el cual será realizado en un proyecto posterior. Dicha información será empleada para la amplificación por PCR de los genes completos y llevar a cabo la complementación de las mutantes. Al recuperar la capacidad de crecimiento en MM-PUh se comprobará la participación de los genes mutados en la actividad de BQ1 sobre PU. Por otro lado, resultará interesante analizar los contextos genómicos en que se encuentran los genes y determinar si su participación en la actividad sobre PU se da en forma individual o en sistemas de operones, lo cual llevará a conocer otros genes involucrados. Finalmente, el análisis bioinformático de las secuencias de las proteínas codificadas por dichos genes permitirá identificar dominios funcionales y predecir sus posibles estructuras secundarias y terciarias con la idea de caracterizar mejor su actividad.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar y analizar las secuencias completas de los genes afectados durante la mutagénesis por transposición, los cuales pudieran estar involucrados en la utilización de PU por *Alicyclophilus sp.* BQ1

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el laboratorio del Dr. Jesús Campos se generaron mutantes incapaces de crecer en PU siguiendo el protocolo de mutagénesis por transposición propuesto por Wong y Mekalanos (2000). Las mutantes y los plásmidos donde se clonaron los genes interrumpidos se enviaron a nuestro laboratorio para continuar con su caracterización. En este trabajo se probó la viabilidad y la estabilidad de las mutantes en medio rico con los antibióticos selectivos, así como su incapacidad para utilizar al PU como fuente de carbono. Cada clona se conservó en cultivos con los antibióticos de selección y glicerol al 30% a -70°C .

Se siguieron tres estrategias diferentes para conocer la secuencia completa de dichos genes. Las primeras dos corresponden al trabajo experimental que permitieran obtener los genes completos, utilizando las secuencias parciales con las que ya se contaba, a partir de distintas bibliotecas genómicas de la cepa BQ1. En la tercera alternativa, se realizó un análisis bioinformático con la nueva información sobre la cepa BQ1 y la cepa BC de *Alicyclophilus denitrificans* disponible en la base de datos, la cual hasta hace poco no existía. *A. denitrificans* BC es la cepa más cercana filogenéticamente a la cepa BQ1 y de la cual se tiene la mayor información disponible en las bases de datos. Esta última estrategia permitiría identificar además de la secuencia completa de los genes mutados, regiones promotoras, zonas de regulación y, mediante el análisis de los contextos genómicos, la posible participación de los genes en operones.

A. Construcción y escrutinio de mini-bibliotecas de *Alicyclophilus* sp. BQ1

El DNA genómico de *Alicyclophilus* sp. BQ1 se purificó con el método convencional de CTAB adaptado de Ausubel (1994). La integridad del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y las muestras se conservaron en alícuotas a -20°C .

El DNA purificado se digirió independientemente, con las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Pst*I para obtener distintos fragmentos de DNA genómico. Los fragmentos resultantes de cada digestión se separaron por

electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Después de la electroforesis, el DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon. Posteriormente, se identificaron fragmentos de DNA, complementarios a las secuencias parciales de los genes mutados, mediante hibridación tipo Southern. Las sondas se marcaron radioactivamente por PCR. Los fragmentos en donde hubo hibridación se purificaron de otro gel réplica, realizado bajo las mismas condiciones, empleando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y clonados en el vector pBluescript KS II digerido con las enzimas correspondientes y desfosforilado con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP). Los plásmidos recombinantes se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Las transformantes se seleccionaron en placas con ampicilina puesto que el plásmido tiene un cassette de resistencia a este antibiótico.

El escrutinio de las mini-bibliotecas construidas previamente se realizó mediante hibridación en colonia utilizando las sondas sintetizadas y marcadas durante el Southern Blot.

B. Escrutinio de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1

Alternativamente, se realizó el escrutinio de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1 albergada dentro del vector pUCP24. Dicha genoteca se construyó previamente en nuestro laboratorio (Casarrubias-Ríos, 2010). El escrutinio se realizó mediante hibridación en colonia utilizando las sondas radioactivas descritas anteriormente. Los plásmidos de las clonas positivas se purificaron y se enviaron a secuenciar.

A partir de las secuencias obtenidas, se determinó si dentro de cada clona se encontraba la secuencia completa de los genes afectados por la mutagénesis. Posteriormente, se analizó la posible participación de cada gen en el crecimiento de la cepa en MM-PUh.

C. Búsqueda de los genes mutados en el genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1

En diciembre de 2010, a la par del procedimiento experimental, se obtuvo el genoma parcial de la cepa BQ1. Por otro lado, en enero de 2011 se liberó la versión completa en el GenBank del genoma de *A. denitrificans* BC, segunda cepa reportada dentro del género *Alicyclophilus*. A partir de esta información, como tercera estrategia, se rastrearon las secuencias parciales de los genes mutados dentro del genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y se analizaron las distintas proteínas codificadas por dichos genes así como el contexto genómico en el que se encuentran.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo y almacenamiento de las cepas

5.1.1 Alicyclophilus sp. BQ1

1. A partir de un cultivo en caja con medio Luria Bertani(LB) sólido se tomó una asada y se inoculó en un tubo con 5 ml de LB. El cultivo se incubó toda la noche (10-14 h) a 37°C y 200 rpm.
2. Concluido este tiempo, se determinó la densidad óptica a 660 nm (DO_{660}) y se re-inoculó un nuevo tubo con 5 ml de LB para tener una D.O. de 0.1, el cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm, durante 6 horas, permitiendo así que las células alcancen la mitad de la fase exponencial de crecimiento corroborado por una $DO_{660} = 0.95$ (Oceguera-Cervantes, 2005). Terminada la incubación se inoculó un matraz Erlenmeyer con 50 ml de MM-PUh al 0.3% a una DO_{660} de 0.02. El matraz se incubó a 37°C y 200 rpm durante 16 h.
3. El cultivo en MM-PUh se distribuyó en alícuotas de 350 μ l en tubos Eppendorf de 600 μ l y se les adicionó glicerol al 30%. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -70°C.

Al comenzar cualquier prueba, se reactivó la cepa mediante la siembra de una porción del cultivo en glicerol sobre una caja Petri con LB sólido e incubada a 37°C durante 48 h. A partir de este cultivo sólido se tomaron asadas para inocular los cultivos en MM-PUh tanto líquidos como sólidos. Esta caja solo se utilizó durante tres semanas al cabo de las cuales se resembró nuevamente a partir de los gliceroles.

5.1.2 Clonas mutantes PU de *Alicyclophilus sp. BQ1*

Las clonas que se usaron en este trabajo nos las envió el Dr. Jesús Campos, ya que él y su grupo se encargaron de la generación de las mutantes por la inserción del transposón Himar::Gm, en el genoma de *Alicyclophilus sp. BQ1*.

Para comprobar la viabilidad de las clonas después del traslado, se sembró cada una de ellas por estría, sobre cajas con medio LB más gentamicina (Gm) y estreptomycin (Sm), con una concentración de 30 y 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h. Se verificó el crecimiento y la pureza de los cultivos.

1. A partir de cada cultivo sólido se tomó una asada y ésta se inoculó en un tubo con 5 ml de LB con Gm³⁰/Sm⁵⁰. Los tubos se incubaron a 37°C en agitación (200 rpm), durante toda la noche (10-14 h).
2. Después del tiempo de incubación se determinó la DO₆₆₀ de cada cultivo y se re-inoculó un matraz Erlenmeyer con 50ml de LB con Gm³⁰/Sm⁵⁰. El matraz se incubó a 37°C y 200 rpm durante 6 h. Alícuotas del cultivo se distribuyeron en tubos Eppendorf con glicerol al 30%. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

Para corroborar que las mutantes se mantuvieran estables cada clona se sembró por estría sobre una caja con medio MM-PUh y con MM-PUh Gm³⁰ y Sm⁵⁰, las cajas se incubaron a 37°C por 48 h. Un control positivo con la cepa BQ1 silvestre fue sembrado bajo las mismas condiciones para comprobar el correcto funcionamiento de los medios.

5.2 Generación de una mini-biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1

5.2.1 Extracción de DNA genómico

El DNA cromosómico de *Alicyclophilus* sp. se aisló y purificó utilizando el método de CTAB (Ausubel *et al.*, 1994).

1. En una caja Petri con LB sólido se sembró por estría una alícuota de un glicerol de la cepa BQ1 que había estado almacenado a -70°C y se incubó durante 48h a 37°C. A partir de esta caja, se tomó una colonia aislada y se inoculó en un matraz Erlenmeyer con 25 ml de medio LB líquido. El cultivo se incubó a 37°C y con agitación constante a 200 rpm, por 12 h.

2. Después de la incubación, el cultivo se transfirió a un tubo falcon de 50 ml estéril y se centrifugó en una centrífuga Sorvall-RC5B y rotor GSA, durante 7 min a 10,000 rpm.
3. Se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 500 μ l de solución amortiguadora TES (Tris 10 mM, EDTA 10 mM y SDS 1.0%, pH 8.0) y la suspensión se transfirió a un tubo falcon de 15 ml. Se adicionaron 100 μ l de solución de lisozima (10 mg/ml) y se incubó durante 15 min a 37°C. Posteriormente se agregaron 125 μ l de solución de proteinasa K (20mg/m, Sigma) y se incubó durante 1 h a 65°C. Se agregaron 300 μ l de SDS al 10% y se incubó por 10 min más a 65°C.
4. Terminada la incubación, se adicionaron 310 μ l de NaCl (5 M) y 170 μ l de solución CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio)/NaCl (CTAB 10%, NaCl 0.7M) y se incubó nuevamente 10 min a 65°C. Posteriormente, se adicionaron 900 μ l de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm en una centrífuga Sorvall-RC5B y rotor SS-34.
5. Después de centrifugar se retiró la fase acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril. A esta solución se adicionó un volumen de isopropanol frío, y se dejó reposar por 20 min a -20°C. Después de este tiempo, la muestra se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm en una microfuga Eppendorf 5417C.
6. Después de retirar el sobrenadante, la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70% y se secó a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de agua destilada y desionizada estéril. Se agregaron 50 μ l de RNAsa (10 μ g/ μ l, Roche) y se incubó 1h a 37°C. Terminando este tiempo se incubó a 65°C por 5 min para inactivar la enzima.
7. Nuevamente se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm.

8. La fase acuosa se retiró y se transfirió a un tubo nuevo estéril y se le adicionó 1/10 de volumen de solución de acetato de sodio 3M, pH 5.2; se agitó brevemente, se adicionó un volumen de isopropanol frío y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm.
9. El sobrenadante se retiró y la pastilla se lavó nuevamente con etanol al 70%. Por último, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de agua desionizada estéril y la suspensión se guardó a -20°C .
10. La integridad del DNA genómico se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% pre-teñido con bromuro de etidio y corrida a 80 volts durante 1.5 h.
11. Debido a que en el gel se observó contaminación con RNA se realizó una segunda purificación agregando 20 μ l más de la solución de RNAsa y se repitieron los pasos 6-10.
12. Una alícuota de 0.5 μ l de la solución de DNA genómico se aforó con agua estéril a un volumen de 150 μ l y se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm para su cuantificación y 280nm para determinar su pureza. Esto se realizó después de la primera y segunda purificación del DNA con RNAsa.

5.2.2 Restricción del DNA genómico con las endonucleasas *EcoRI*, *BamHI* y *PstI*

Las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *BamHI* y *PstI* cortan en las siguientes secuencias respectivamente 5'..GAATTC...3', 5'...GGATCC...3' y 5'...CTGCAG...3' en ambas cadenas de DNA, dejando extremos pegajosos y las tres tienen una temperatura óptima de reacción de 37°C .

1. Se realizó una reacción individual para cada enzima utilizando 10 μ g de DNA genómico, como se describe a continuación:

$$\text{Rx} \left\{ \begin{array}{l} 15 \mu\text{l de solución de DNA genómico (10}\mu\text{g)} \\ 5\mu\text{l buffer de reacción correspondiente a cada enzima 10X} \\ 1 \mu\text{l enzima } EcoRI(12U/\mu\text{l}) \text{ o } BamHI (10U/\mu\text{l}) \text{ o } PstI(10U/\mu\text{l}) \\ 29 \mu\text{l de agua destilada estéril} \end{array} \right.$$

Volumen final de reacción: 50 μ l

Las reacciones se incubaron durante 3 h a 37°C.

2. Terminada la incubación, una alícuota de 5 μ l se utilizó para comprobar la eficiencia de la digestión mediante electroforesis en un mini-gel de agarosa al 0.8%. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante 5-10 min para luego observar el DNA en un transiluminador UV.
3. Una vez que se verificó que el DNA estuviera digerido correctamente, al resto del volumen de cada reacción se le adicionó 4 μ l de buffer de carga y la mezcla se cargó sobre un gel de agarosa al 0.8% en una cámara de mayores dimensiones para lograr una mejor separación de los fragmentos digeridos (HE99 MAX™ Hoeffler). La electroforesis se realizó a 85 V durante 6.5 h.

5.2.3 Transferencia del DNA a membrana de nylon

Preparación del gel

1. Después de la electroforesis el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (5 μ g/ml), por 5 min y se observó en el transiluminador de luz UV. Con una navaja limpia se retiraron los excesos de agarosa. El resto del gel se colocó en una bandeja y se enjuagó con agua destilada por unos segundos.
2. El agua se retiró y se agregó solución desnaturalizante (1.5 M NaCl/0.5 M NaOH), lo suficiente para que cubriera el gel (aproximadamente 50 ml) y se dejó agitando levemente durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Pasado este tiempo, la solución se retiró y el gel se enjuagó nuevamente con agua destilada. Después se agregó solución neutralizante (1.5 M NaCl/0.5 M Tris-HCl pH 7.2/1 mM EDTA) hasta cubrir el gel y se agitó por 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, la solución se retiró y se repitió esto último por 15 minutos más. Finalmente se procedió a ensamblar el sistema para la transferencia.

4. El gel se depositó sobre un soporte colocado dentro de un refractario de vidrio, el cual contenía la solución de transferencia (SSC 20X). Entre el gel y el soporte se colocó un puente de papel Wathman 3M[®] humedecido con SSC 20X, para que alcanzara la solución de transferencia que va en el fondo del refractario.
5. Sobre el gel se colocó la membrana de nylon cargada positivamente (Hybond[™]-N+ de Amersham LIFE SCIENCES) con dimensiones idénticas a las del gel asegurándose que no queden burbujas.
6. Sobre la membrana se colocaron tres láminas de papel Wathman3M[®] cortadas con las mismas dimensiones del gel y humedecidas con la solución de transferencia asegurándose que no queden burbujas.
7. Posteriormente, se colocó una torre de papel periódico de aproximadamente 12cm de altura con las mismas dimensiones que el gel y, sobre ésta, se puso una placa de vidrio. Finalmente, sobre la placa se colocó un peso de alrededor de 700 g. La transferencia se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.
8. Terminada la transferencia, cada componente se retiró cuidadosamente. Antes de retirar la membrana se realizó un pequeño corte en la esquina superior izquierda para marcar su orientación. Posteriormente, se retiró y se enjuagó con 50 ml de SSC 2X para eliminar cualquier resto de agarosa, mientras que el gel se tiñó nuevamente con una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml) para verificar así la transferencia completa del RNA del gel a la membrana.
9. Finalmente, la membrana se colocó sobre un papel absorbente humedecido completamente con NaOH 0.4 M para fijar el DNA durante 20 minutos a temperatura ambiente. Terminado este tiempo, se retiró y enjuagó en 50 ml de SSC 5X por 40 s.

5.2.4 Síntesis y marcaje de las sondas

A partir de las secuencias parciales de los genes afectados por la inserción del transposón, se diseñaron tres diferentes juegos de oligonucleótidos que flanquearan cada secuencia y permitieran amplificarlas por PCR. Estos primers se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM). A partir de la solución stock se realizó una dilución para tener cada oligo a una concentración de 10 μ M.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para sintetizar las sondas

Clona	Primer	Tm °C	Nt	Secuencia	Tamaño producto
8-1	8-1 forward	66	21	5' CCCATTTGTTGTCCAGCAGGC 3'	499 bp
	8-1 reverse	66	19	5' TGCAGCGCTTCGCCGGCA 3'	
9-1	9-1 forward	60	21	5' AGTTTCTTGCTTCATTGAGGG 3'	900 bp
	9-1 reverse	60	18	5' TGCCTGGCTACGTCAGCG 3'	
38-1	38-1 forward	62	19	5'GACGGCAACAAGCTGTGCC 3'	900 bp
	38-1 reverse	62	20	5' ATGGCGTCAAACCTCCTGCTG 3'	

Se probó la funcionalidad de los primers mediante reacciones de PCR utilizando la enzima Gotaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega) y como DNA molde pBluescript con los insertos de los genes interrumpidos por el transposón. Se probaron distintas temperaturas de alineamiento (56 - 62°C), así como diferentes concentraciones de MgCl₂ (1-5 mM) con el fin de obtener las condiciones de mejor amplificación para cada par de primers, utilizando el Thermal cycler 2720 (Applied Biosystems). El volumen final de cada reacción fue de 25 μ l.

1. Después de 25 ciclos de reacción, una alícuota de 10 μ l de cada reacción se cargó directamente en un gel de agarosa al 0.8%. Terminada la electroforesis el gel se tiñó con solución de bromuro de etidio y se analizó bajo la luz UV. La presencia de

bandas correspondientes a los tamaños esperados de los productos corroboraron la eficiencia de los primers.

- Una vez optimizadas las condiciones de PCR, se repitió la reacción para cada sonda sustituyendo uno de los nucleótidos por [α - 32 P]-dCTP (10 mCi/ml, actividad específica 3,000 Ci/mmol). Las cantidades utilizadas de cada componente se muestran en la tabla 4 y las condiciones adecuadas para cada PCR se describen en el capítulo de resultados.

Tabla 4. Marcaje de las sondas con [α - 32 P]-dCTP

Componente	Rx sonda 8-1	Rx sonda 9-1 y 38-1
Buffer de la enzima 5X	10 μ l	10 μ l
Sol MgCl ₂ (25 mM)	2 μ l	6 μ l
Mix dNTPs (dATP, dGTP, dTTP)(10mM)	1 μ l	1 μ l
[α - 32 P]-dCTP (10mCi/ml, act. esp. 3000Ci/mmol)	1 μ l	1 μ l
Primer forward 10 μ M	1 μ l	1 μ l
Primer reverse 10 μ M	1 μ l	1 μ l
DNA molde	5 μ l	1 μ l
GoTaq [®] DNA polimerasa (5 U/ μ l)	0.25 μ l	0.25 μ l
H ₂ O	28.75 μ l	28.75 μ l
Volumen final	50 μ l	50 μ l

5.2.5 Hibridación tipo Southern

- Después de haber fijado la membrana con NaOH 0.4 M, descrito previamente, ésta se colocó cuidadosamente dentro de una botella de hibridación y se agregaron 0.1 ml de solución de prehibridación (fosfato de sodio 0.5 M, pH 7.2; EDTA 1 mM, pH 8.0; SDS 7% p/v, BSA 1% p/v) por cada cm² de la membrana. Este procedimiento se repitió con otras dos membranas para hibridar con las sondas separadas. Las botellas se cerraron perfectamente, se verificó que no hubiera fugas y se colocaron dentro de un horno de hibridación (Robbins Scientific Modelo 400) por 2 h a 60°C.

2. Transcurrido el tiempo de pre-hibridación, las sondas marcadas se calentaron a 94°C por 5 min y se colocaron en hielo por 5 min más. Posteriormente, cada sonda marcada y desnaturalizada se agregó a la solución de una botella diferente dejando de ser solución de pre-hibridación y convirtiéndose en la solución de hibridación. Las botellas cerradas perfectamente se colocaron dentro del horno de hibridación y se dejaron a 60°C durante 4h.
3. Después del tiempo de hibridación, la solución con la sonda radioactiva se retiró cuidadosamente y se colocó en un tubo falcon de 50 ml. El tubo cerrado y sin fugas se almacenó en el congelador, dentro de una caja de acrílico.
4. Para comenzar los lavados de la membrana, se agregaron 15 ml de la solución de lavado 1 (SSC 2X/ SDS 0.5%) a cada botella y se colocaron nuevamente en el horno a temperatura ambiente durante 20 min.
5. Transcurrido este tiempo, la solución del primer lavado se desechó y se agregó 15 ml de la solución de lavado 2 (SSC 2X/ SDS 0.1%). Nuevamente se colocaron en el horno de hibridación y se dejaron transcurrir 20 min a temperatura ambiente.
6. Terminado este segundo lavado la membrana se retiró del tubo con unas pinzas y se colocó sobre una hoja de acetato para monitorear la cantidad de radiactividad presente y buscar señales correspondientes a hibridaciones específicas. Si la membrana aún contenía demasiada marca radioactiva, se colocó nuevamente en el tubo de hibridación y se agregaron 15ml de la solución de lavado 3 (SSC 0.1X/SDS 0.1%) dejándola dentro del horno de hibridación 20 min más a 60°C.
7. Finalmente, la membrana se colocó nuevamente sobre una hoja de acetato y tras detectar la presencia de bandas específicas, se cubrió con un trozo de Kleen pack. Las membranas ya cubiertas se expusieron a una pantalla intensificadora (BioRad) durante 6 h. Tras este tiempo, la pantalla se colocó en el equipo Phosphor Imager (Biorad) utilizando el software Quantity One y la aplicación Personal FX para visualizar el resultado. Las membranas, después de exponerse, fueron colocadas en refrigeración dentro de una caja de acrílico.

5.2.6 Purificación de los fragmentos positivos en el Southern Blot a partir de un gel réplica

Una vez determinada la presencia de bandas claras por la hibridación tipo Southern, se volvieron a cargar tres nuevas reacciones de digestión del DNA genómico de la cepa BQ1 para purificar los fragmentos de DNA que presumiblemente contienen la secuencia complementaria a las sondas utilizadas en la hibridación.

1. Tres nuevas reacciones de digestión con las enzimas *EcoRI*, *BamH1* y *PstI* se realizaron con el DNA genómico de *Alicyclophilus* sp.BQ1 siguiendo las condiciones exactas descritas previamente.
2. Nuevamente se verificó que cada digestión ocurriera eficientemente, mientras que el resto de las reacciones se cargaron sobre un gel de agarosa al 0.8% con dimensiones de 15 x 20 cm preparado de manera similar al anterior y pre-teñido con SYBR[®]Safe(Invitrogen)(10µl/100ml de gel) utilizando una cámara Hoefer HE99X Max Submarine. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo las condiciones utilizadas en la ocasión anterior.
3. Después de la electroforesis se observó el gel con DNA teñido con Sybr Safe empleando el Safe Imager[™] 2.0 (Invitrogen). De acuerdo con los RFs calculados a partir de las señales de hibridación obtenidas previamente, se determinaron las zonas correspondientes en estos nuevos geles y se recortaron los fragmentos de agarosa, con una navaja limpia.
4. Los fragmentos de DNA presentes en los bloques de agarosa cortados se purificaron con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), se resuspendieron en 50 µl de agua destilada estéril y guardaron a -20°C.

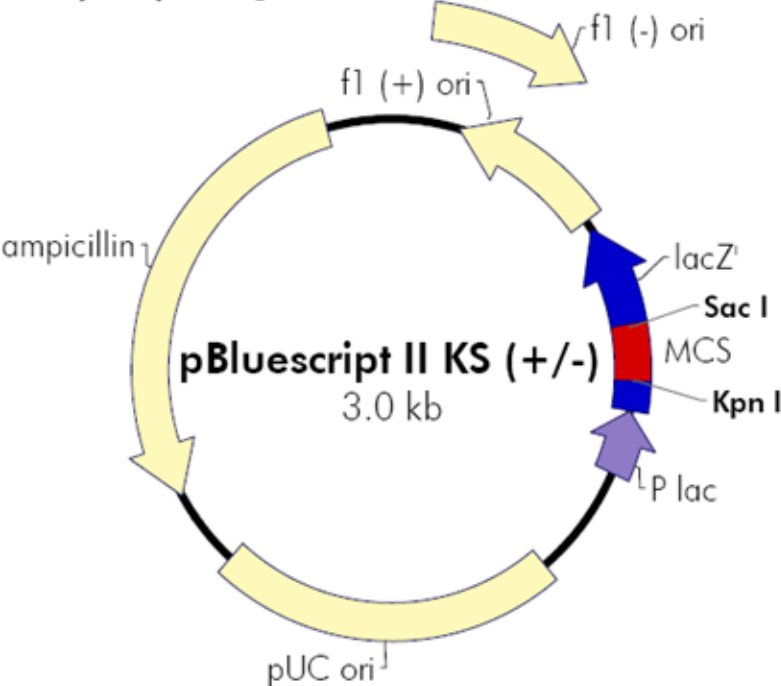
5.2.7 Construcción de las minibibliotecas

Preparación del vector

Se utilizó el plásmido pBluescriptII KS+ (pBS) (Stratagene[®]) como vector para clonar los fragmentos que dieron positivo en la hibridación con las sondas específicas marcadas. Este vector tiene un tamaño de 3.0 kb y dentro de su secuencia se encuentra un cassette de resistencia a ampicilina y un sitio múltiple de clonación con 21 sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción. Este sitio múltiple de clonación se encuentra dentro de la secuencia codificante del fragmento α de la β -galactosidasa lo que permitirá diferenciar las colonias con los plásmidos recombinantes (blancas) de las que únicamente contienen el vector vacío (azules) al ser inducidas con IPTG y empleando X-gal (figura 5).

1. El vector se digirió en reacciones individuales con las enzimas *PstI* o *EcoRI* siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Una alícuota de 5 μ l de cada reacción se tomó para verificar la eficiencia de la digestión, mediante un gel de agarosa al 0.8 %.
2. La presencia de una sola banda en un mini gel de agarosa al 0.8% mostró una digestión completa del vector. Ambas bandas se escindieron con una navaja limpia y el vector se purificó utilizando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y se resuspendió en 50 μ l de la solución de elución provista en el kit.
3. Una alícuota de 30 μ l de cada solución se colocó en un tubo limpio y se adicionaron 5 μ l de buffer de reacción de fosfatasa alcalina (10X), 0.5 μ l de fosfatasa alcalina (20 U/ μ l) y agua hasta completar un volumen final de 50 μ l. La reacción para desfosforilar el vector se realizó a 37°C durante 45 min.
4. Terminado el tiempo de incubación, se adicionó a la reacción 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, el DNA plasmídico se precipitó con isopropanol absoluto frío y se dejó a -20°C durante 1h.

pBluescript II KS (+/-) Phagemids



Sitio múltiple de clonación

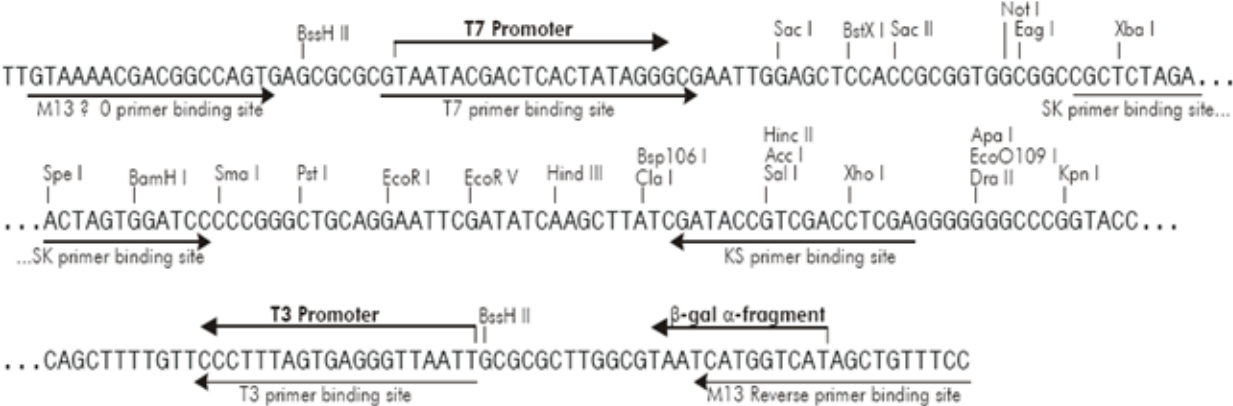


Figura 5. Vector Bluescript KS II (Stratagene)

5. Por último cada mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se retiró todo el líquido. Las pastillas se dejaron junto al mechero por unos minutos para evaporar el etanol restante y se resuspendieron en 30 μ l de agua estéril. La concentración de DNA de cada muestra fue determinada mediante el espectrofotómetro a 260 nm.

Preparación de células electrocompetentes

1. Un glicerol de *E. coli* DH5 α almacenado a -70°C se sembró sobre una placa de LB sólido. La caja se incubó a 37°C por una noche.
2. A partir de esta caja, se tomó una colonia aislada para inocular un matraz Erlenmeyer con 25 ml en medio LB y se cultivó toda la noche a 37°C.
3. Al terminar la incubación, se tomaron 8 ml de este cultivo y se inocularon 500 ml de medio LB precalentado. El cultivo se incubó con agitación constante 250 rpm y 37°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ ~0.39-0.41 (aproximadamente 3 h). El cultivo se colocó en hielo durante 30 min.
4. Las células se cosecharon a 4°C y a 4,000 rpm, en una centrífuga Sorvall-RC5B con un rotor GSA, durante 15 min. Terminada la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 250 ml de agua filtrada y estéril fría. La suspensión de células se incubó en hielo por 15 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones.
5. El paquete celular se resuspendió en 125 ml de agua con 10% glicerol estéril frío y se dejó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 4,000 rpm por 15 min a 4°C.
6. Se realizó un tercer lavado con 25 ml de una solución de glicerol al 10% estéril y fría. Nuevamente se incubó en hielo y la suspensión se centrifugó como en los pasos anteriores.

7. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de solución de glicerol al 10% y se dispensaron en alícuotas de 50 μ l, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C .

Ligación y electroporación

1. Para comprobar que la desfosforilación del vector se efectuó de manera correcta, se tomó una alícuota de 0.3 μ l de cada reacción (0.1 μ g de plásmido) y se colocó cada una en un tubo Eppendorf limpio al cual se le añadió 1 μ l de buffer de T4 DNA ligasa (10X), 1 μ l de T4 DNA ligasa (1 U/ μ l) y 7.7 μ l de H₂O destilada. La reacción, con un volumen final de 10 μ l, se incubó a 16°C durante toda la noche.
2. Una alícuota de las reacciones se colocó sobre filtros de nitrocelulosa VSWP con poro de 0.025 μ m y 1cm de diámetro (Millipore) suspendidos sobre agua estéril por 30 minutos para retirar las sales de la reacción.
3. Se tomaron 5 μ l de cada reacción de ligación para transformar mediante electroporación (330 μ F, 4 k Ω y 400 V Gibco BRL (Hoefer) Cell-porator 1600) 50 μ l de células DH5 α electrocompetentes, las cuales tienen una eficiencia de transformación de 10^8 . Después de la electroporación se adicionó a cada celda 1ml de medio SOC y luego de invertir un par de veces, el contenido de cada celda se transfirió a tubos eppendorf estériles y se incubó por 2 h a 37°C .
4. Pasado este tiempo, las células se colectaron por centrifugación a 10,000 rpm por 7 min y se resuspendieron en 250 μ l de medio LB. Una alícuota (100 μ l) de cada suspensión se distribuyó sobre una placa de LB con Ampicilina (100 μ g/ml). Las cajas se incubaron a 37°C , por 24 h.
5. Transcurrida la incubación se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar la eficiencia de las reacciones de ligación y comprobar que la desfosforilación fue adecuada.

6. Después de comprobar que el vector estaba listo (un número bajo de colonias en las placas control), se realizaron las reacciones de ligación entre los fragmentos de DNA genómico obtenidos mediante el Southern blot y el vector, siguiendo una relación 3:1 DNA genómico/vector.

Reacción	}	4 μ l de fragmentos DNA (150 ng)
		1.4 μ l de pBlueScript digerido (50 ng)
		1 μ l Buffer 10X
		3.6 μ l de agua destilada estéril
		1 μ l de la enzima T4 DNA ligasa
		Volumen total de reacción: 10 μ l

La reacción se dejó toda la noche en un baño de agua a 16°C.

7. La electroporación de células DH5 α con una alícuota de 5 μ l de cada reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas antes.

5.3 Escrutinio de las mini-bibliotecas por hibridación en colonia

Utilizando las sondas específicas sintetizadas y marcadas para la hibridación tipo Southern, descritas anteriormente, se identificaron las clonas de la mini-biblioteca que contuvieran insertos de los genes afectados durante la mutagénesis.

5.3.1 Transferencia y fijación en la membrana

1. A partir de las cajas de LB Amp¹⁰⁰ X-gal (20 mg/ml) e IPTG (20%) se eligieron al azar alrededor de 30 diferentes colonias blancas recombinantes con los fragmentos de DNA genómico clonados en el sitio *Pst*I y 10 colonias con los fragmentos obtenidos con *Eco*RI, esta última presentaba menor número de UFC. Estas colonias se sembraron en una nueva caja de LB Amp¹⁰⁰ y se incubaron a 37°C, durante 24 h. Terminada la incubación se colocó sobre la caja una membrana circular de Nylon cargada positivamente (Hybond N+ de Amersham) con un diámetro de 82 mm estéril. Después de un par de minutos, la membrana se retiró cuidadosamente con unas pinzas esterilizadas al mechero y se colocó con el lado de las colonias hacia

arriba sobre una nueva caja de LB Amp¹⁰⁰ dejándose en incubación por 24 h más. Este procedimiento se realizó por duplicado para hibridar con las sondas de las clonas 8 y 9.

2. Por otro lado, la caja de la cual se transfirieron las colonias se colocó nuevamente en incubación para que éstas volvieran a crecer. Terminada la incubación esta caja fue guardada en refrigeración.
3. Las membranas por su parte se retiraron de la caja y se colocaron sobre un papel absorbente humedecido con solución desnaturalizante por 7 min, para lisar las células.
4. Después de este tiempo las membranas se colocaron sobre otro papel humedecido con solución neutralizante por 3 min. Al finalizar el tiempo las membranas se retiraron y se colocaron en un nuevo papel humedecido con solución neutralizante por tres minutos más. Finalmente las membranas se lavaron con SSC 2X a temperatura ambiente y leve agitación por un par de minutos.
5. Para fijar las membranas, se colocaron sobre un nuevo papel absorbente humedecido con NaOH 0.4M y se dejaron por 25 min. Transcurrido el tiempo las membranas se retiraron y se enjuagaron con SSC 5X por no más de un min.

5.3.2 Pre-hibridación/hibridación

1. Después de fijar el DNA, cada membrana se introdujo dentro de una botella de hibridación y se adicionaron 12 ml de solución de pre-hibridación.
2. Las botellas se introdujeron en el horno de hibridación por 2 h a 60°C. Pasado este tiempo la solución se retiró y se adicionaron aproximadamente 12 ml de la solución de hibridación que contenía cada sonda de manera individual ya marcadas y desnaturalizadas mediante calentamiento previo a ebullición por 5 min y puestas en hielo por 5 min más. La hibridación transcurrió por entre 3-5 h a 60°C.

3. Finalmente, cada membrana se trató con solución de lavado 1 por 20 min a temperatura ambiente y después 20 min más con solución de lavado 2 nuevamente a temperatura ambiente.
4. Después de monitorear la presencia de señales positivas, la membrana se colocó sobre una hoja de acetato para evitar contaminar la zona de trabajo con marca radioactiva y se cubrió con Kleenpack[®]. Nuevamente las membranas se colocaron sobre una pantalla intensificadora (Biorad) para visualizar las colonias positivas como se describió antes.

5.3.3 Purificación de los plásmidos

1. Después de detectar la presencia de colonias positivas éstas se identificaron en la caja original y se reestriaron en una caja nueva de LB Amp¹⁰⁰.
2. Tras 24 h de incubación a 37°C, cada colonia aislada se reinoculó en 5 ml de LB líquido con Amp¹⁰⁰. Estos cultivos se incubaron durante 12 h a 37°C y 200 rpm.
3. Utilizando el QIAprep Spin Miniprep kit se aislaron los plásmidos siguiendo las indicaciones del fabricante y su concentración se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.
4. Para corroborar la presencia del inserto, así como para realizar un mapa de restricción del mismo, se realizaron digestiones de 0.5 µg (3 µl) de cada plásmido con las enzimas *PstI*, *EcoRI* y *HindIII*. Agregando 0.5 µl de cada enzima en un volumen final de reacción de 10 µl por 3 h a 37°C. Terminada la incubación, una alícuota de cada reacción se retiró para observar la liberación del inserto en un gel de agarosa al 0.8%.

5.4 **Escrutinio de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1 mediante hibridación en colonia**

Con la idea de seguir una ruta alterna que permitiera cumplir con nuestro objetivo se decidió realizar el escrutinio de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1 construida a partir de restricciones con *Sau3A1* y clonada en el vector pUCP24

albergadas en *E.coli* DH5 α ; esta biblioteca se construyó en nuestro laboratorio y estaba constituida por un poco más de 2000 clonas (Casarrubias-Ríos, 2010). El escrutinio se realizó mediante hibridación en colonia utilizando las sondas 8-1, 9-1 y 38-1 de acuerdo al protocolo descrito el punto anterior.

1. Cada clona se sembró en un caja Petri de LB Gm¹⁵ e incubó a 37°C durante 24 h. Después de la incubación todas las clonas de la biblioteca se transfirieron a una membrana cargada de Nylon de 140 mm de diámetro y se realizó el tratamiento como se describió anteriormente.
2. La prehibridación se realizó como se describió antes y cada membrana se hibridó con una mezcla de las tres sondas ya marcadas. Posteriormente aquellas clonas que resultaron positivas se identificaron en la caja original y se sembraron en tres nuevas cajas con LB y Gm¹⁵. Se repitió la transferencia y la hibridación, utilizando en esta ocasión las sondas de manera individual para determinar las clonas positivas específicas a cada una de ellas.
3. Los plásmidos de cada clona se purificaron y se digirieron con *EcoRI*, *BamHI* y *PstI* para determinar el tamaño de los insertos y los patrones de restricción de cada clona.
4. Los plásmidos que resultaron diferentes de acuerdo con su patrón de restricción, se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) utilizando primers específicos al vector, UCP forward 5'GATTAAGTTGGGTAACGCCAG3' y UCP reverse 5'GTGGAATTGTCAGCGGATAAC 3'.

5.4.1 Sub-clonación de los insertos obtenidos durante el escrutinio de la biblioteca

A partir del análisis de restricción de los fragmentos clonados y de los resultados de la secuenciación que se realizó con las clonas positivas de pUCP24, y debido a que los fragmentos clonados eran muy largos, se decidió realizar la subclonación de los insertos presentes en las clonas pUCP8.16 y pUCP9.7 en el vector pBS con la idea de obtener la secuencia completa de los insertos de una manera más rápida y fácil.

1. Cada clona se colocó en un cultivo individual de 5 ml de LB y Gm¹⁵ y se dejó en incubación durante toda la noche a 37°C y 200 rpm.
2. Transcurrido este tiempo los plásmidos de cada clona se purificaron utilizando el QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos purificados se resuspendieron en 75 µl de agua destilada estéril.
3. Se tomó una alícuota de cada plásmido y se digirieron con las enzimas *EcoRI* (clona pUCP9.7) y *PstI* (clona pUCP8.16) en un volumen final de 50µl siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Terminado el tiempo de digestión se agregaron 5 µl de buffer de carga y las muestras se depositaron sobre un gel de agarosa al 0.8% preteñido con Sybr safe DNA gel stain (Invitrogene) (2.5 µl/25 ml) para separar los fragmentos de cada inserto. La electroforesis se realizó a 80 V durante 35 min.
4. Terminada la electroforesis cada banda se recortó del gel con una navaja limpia y se recuperó de la agarosa utilizando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). El DNA purificado se resuspendió en 60 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -20°C.
5. Cada fragmento se subclonó en el vector pBS digerido con su correspondiente enzima y desfosforilado. Los productos de la ligación se electroporaron en *E. coli* DH5α como se describió antes y una alícuota de las células transformadas se distribuyó sobre una caja de LB y Amp¹⁰⁰. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 h.
6. Las colonias blancas aisladas se colectaron y se inocularon nuevamente en 5 ml de LB y Amp¹⁰⁰ para purificar así los plásmidos con los fragmentos de interés. Los plásmidos se cuantificaron en el espectrofotómetro UV/visible (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) A_{260nm} y una alícuota de esta preparación se digirió con su correspondiente enzima para asegurarse que todos los plásmidos presentaran el fragmento del tamaño esperado.

7. Finalmente, una alícuota de la suspensión de cada plásmido se envió nuevamente al IBT para secuenciación utilizando los primer M13 forward y M13 reverse, ambos dirigidos hacia el vector pBS.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existe poca información referente a los genes utilizados por bacterias para la asimilación de PU como fuente de carbono y de energía. Howard y colaboradores (2007) describieron en *Pseudomonas chlororaphis* la existencia de dos genes (*pueA* y *pueB*) que codifican lipasas con actividad sobre el PU. El análisis del contexto cromosómico mostró que los genes *pueA* y *pueB* se localizan en un *cluster* acompañados por otros genes, cuyos productos son proteínas de unión tanto a la membrana interna como la externa, dos serina proteasas y una proteína de unión a ATP. Dado que este *cluster* es semejante al involucrado con el sistema de secreción tipo I de lipasas en *P. fluorescens* se ha propuesto que sus productos génicos pudieran estar relacionados con la producción de las poliuretanasas y, probablemente, su forma de secreción sea similar al sistema utilizado para lipasas en bacterias Gram negativas.

A partir de esta idea, ha surgido el interés por conocer los genes cuyos productos son responsables de la capacidad de *Alicyclophilus* sp. BQ1 para utilizar PU como fuente de carbono y, comprender el sistema utilizado por la bacteria para desplegar dicha actividad. Para alcanzar este objetivo, se siguió una estrategia basada en la inserción del transposón Himar::Gm en el genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1.

6.1 Viabilidad y cultivo de las clonas mutantes y plásmidos recombinantes

En nuestras manos, el crecimiento en cultivos sólidos de LB con Gm³⁰ y Sm⁵⁰ de las diferentes mutantes fue adecuado. Además, se confirmó la inserción estable del transposón en las mutantes mediante su siembra en MM-PUh sólido con Gm³⁰ y Sm⁵⁰. A pesar de contar en un inicio con cuatro mutantes, una vez que se comenzó el trabajo experimental, una de ellas revirtió (clona 5), ya que creció nuevamente en las placas con MM-PUh, por esta razón, se decidió continuar el trabajo con el resto de las clonas que aún fueron incapaces de crecer en el PU (8, 9 y 38).

Finalmente también se reactivaron cultivos de *E. coli* TOP10, los cuales albergaban los plásmidos recombinantes (pBS) con fragmentos de los genes afectados por el transposón.

6.2 Análisis de los plásmidos recombinantes con los fragmentos genómicos afectados por el transposón

Una alícuota de cada plásmido (pBS8, pBS9 y pBS38) se secuenció utilizando el oligonucleótido marOUT, dirigido hacia la secuencia repetida invertida del transposón. El análisis del plásmido pBS8 mostró que, en efecto, existe una región que muestra homología con una LT de *Acidovorax ebreus* TPSY. En el plásmido pBS9, la secuencia obtenida mostró identidad con una proteína hipotética de *R. rubrum*, seguida además por una proteína con plegamiento α/β hidrolasa presente en *Geobacter* sp. Finalmente, en la secuencia analizada dentro del plásmido pBS38, se identificaron fragmentos de dos genes distintos. El primer gen codifica una proteína SDR presente en *A. ebreus*, mientras que el producto del segundo gen es una proteína relacionada con la toma de DNA en procesos de transformación, también dentro del genoma de *A. ebreus* (figura 6). En la secuencia de este plásmido no se identificaron inicialmente sitios *Pst*I, por lo que el diseño de los primers para la amplificación de la sonda, se realizó considerando al inserto completo. Sin embargo, dado que posteriormente las secuencias de las clonas obtenidas en el escrutinio, cuando se empleó la sonda 38, no concordaron con lo esperado, se decidió confirmar si la secuencia de este plásmidos era correcta. En esta ocasión, se identificó dos sitios *Pst*I, posibles ligaciones espurias explicarían el arreglo génico en el plásmido pBS38.

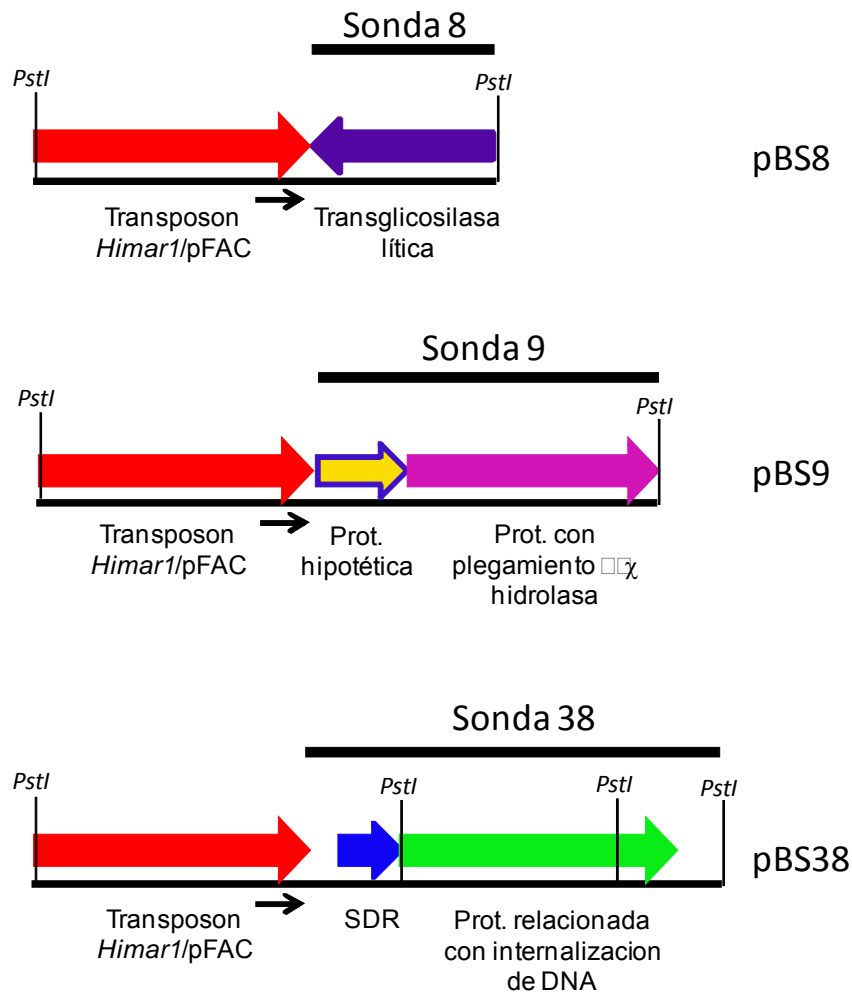


Figura 6. Arreglo genómico de los plásmidos pBS8, pBS9 y pBS38. Los insertos fueron obtenidos después de digerir el DNA genómico de las mutantes con *PstI* y clonarlos en el vector pBS. La secuencia de cada inserto se obtuvo empleando el oligonucleótido marOUT dirigido hacia el transposón (las flechas de color negro señalan su posición y orientación). Todas las secuencias son parciales por lo que las flechas indican únicamente el sentido de la transcripción de cada gen.

6.3 Construcción de mini-bibliotecas genómicas de *Alicyclophilus* sp. BQ1

6.3.1 Aislamiento y digestión del DNA genómico con las endonucleasas *EcoRI*, *BamHI* y *PstI*

A partir de un cultivo líquido de LB, se purificó el DNA genómico de la cepa BQ1 de *Alicyclophilus* sp. (figura 7A). La concentración del DNA purificado fue de 8.5 $\mu\text{g/ml}$ con una pureza ($\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$) de 1.978 y se realizaron tres distintas restricciones con las

enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *PstI* (figura 7B). Posteriormente, el DNA desnaturalizado se transfirió a una membrana de Nylon cargada positivamente.

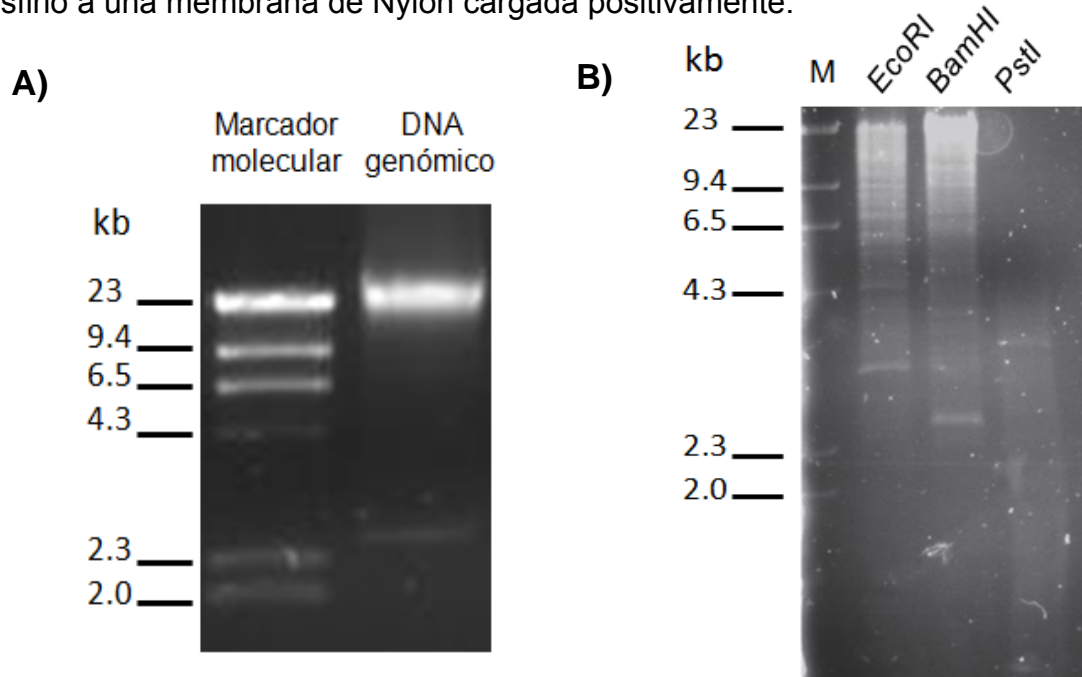


Figura 7.A. DNA genómico purificado de *Alicyclophilus* sp. BQ1 B. Restricciones de 10 μ g DNA genómico con las enzimas ya descritas. Geles de agarosa al 0.8% en buffer TBE 0.5X. M: marcador molecular.

6.3.2 Marcaje de las sondas con [α - 32 P]dCTP

A partir de las secuencias parciales de los genes mutados, se diseñaron juegos de primers que permitieran amplificar y marcar radioactivamente cada una mediante PCR y empleando como molde los plásmidos pBS8, pBS9 y pBS38. Los productos de amplificación se obtuvieron con el tamaño esperado (figura 8A), utilizando las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de las siguientes condiciones 95°C por un minuto durante la etapa desnaturalización, 58°C (sonda 8) y 56°C (sonda 9 y 38) por 30 segundos para la fase de anillamiento y 72°C por un minuto para la fase de extensión, terminando con una etapa de extensión final a 72°C durante siete minutos (figura 8B).

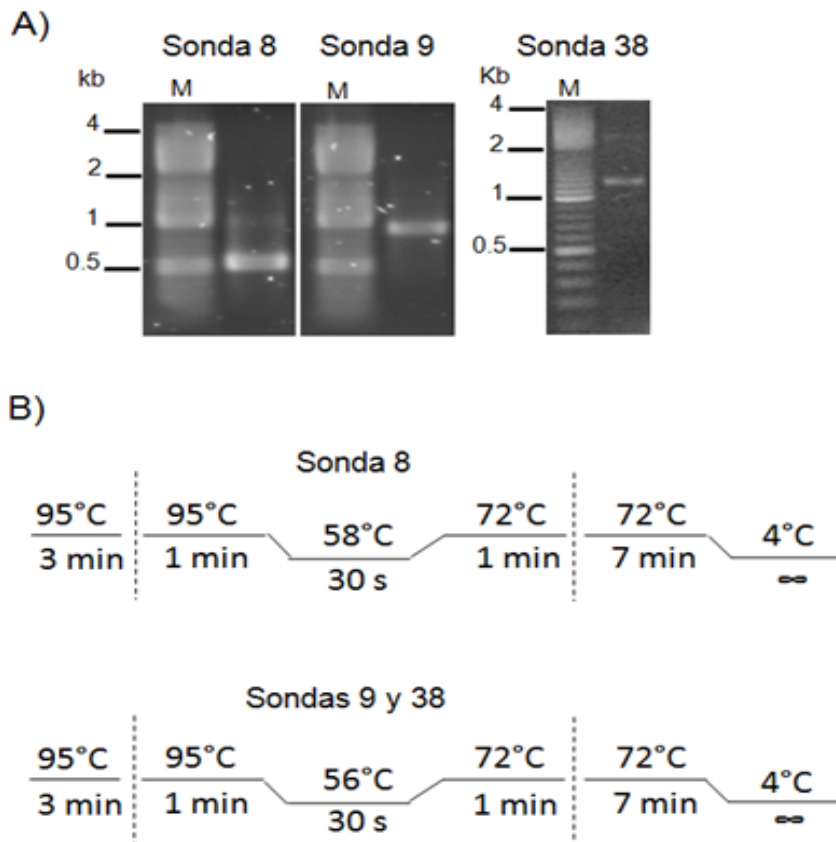


Figura 8. Reacciones de PCR para la síntesis de las sondas. A) Síntesis de las sondas 8 (499 pb), 9 (948 pb) y 38 (1.2 kb). M: Marcador molecular. B) Condiciones de PCR utilizadas para la síntesis y marcaje de las sondas con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$. La fase de amplificación en cada reacción fue de 35 ciclos.

6.3.3 Hibridación tipo Southern

Las hibridaciones con las distintas sondas se realizaron como se describió en materiales y métodos. Una banda clara con un tamaño aproximado de 4 kb se observó en la digestión con *PstI* en la membrana hibridada con la sonda 8.

En el caso de la membrana que se hibridó con la sonda 9 se obtuvieron dos señales, la primera con un tamaño aproximado de 3 kb en la digestión con *EcoRI* y, la segunda en la digestión con *PstI* con un tamaño aproximado de 5 kb. En el caso de la hibridación con la sonda 38 no se logró obtener alguna señal, a pesar de repetir el procedimiento en cinco ocasiones e incluso, aumentando el tiempo de hibridación a toda la noche y suavizando las condiciones en los lavados (figura 9).

A partir de otro gel corrido bajo las mismas condiciones, se purificaron los fragmentos de DNA correspondientes a las señales que se obtuvieron en las hibridaciones y se clonaron en el vector pBS. Los plásmidos recombinantes se electroporaron en *E.coli* DH5 α . El escrutinio de cada mini-biblioteca se realizó mediante hibridación empleando su respectiva sonda. Aquellas colonias que resultaron positivas se recuperaron y sus plásmidos se purificaron.

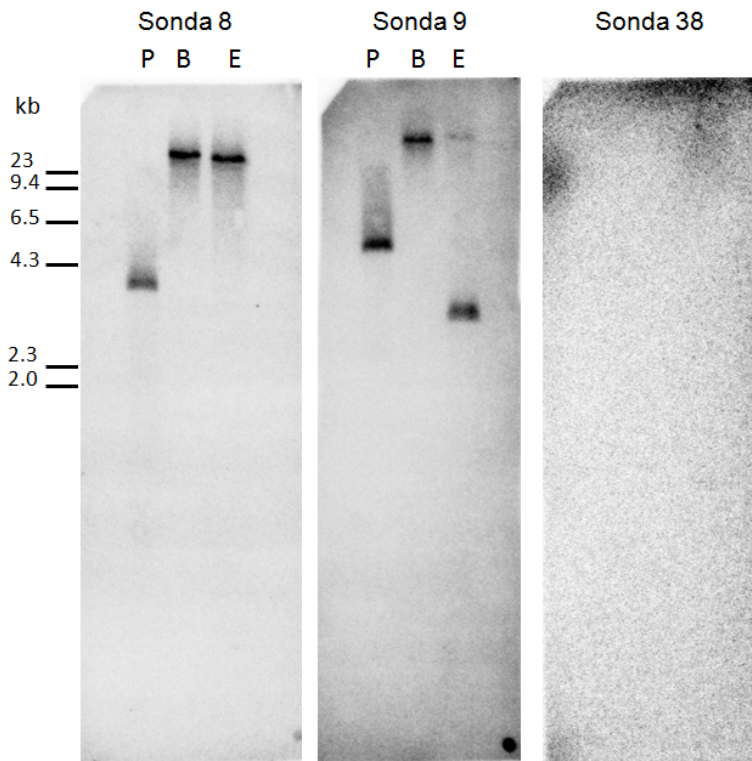


Figura 9. Hibridación del DNA de *Alicyclophilus* sp. BQ1, con las sondas 8, 9 y 38 sintetizadas y marcadas por PCR con [α - 32 P]dCTP. P: digestión con *Pst*I, B: digestión con *Bam*HI y E: digestión con *Eco*RI.

6.3.4 Análisis de las clonas resultantes durante la hibridación

Después del escrutinio las mini-bibliotecas con cada sonda, se obtuvieron cuatro clonas positivas para la sonda 8 y tres clonas para la sonda 9, cuyos insertos provenían, en ambos casos, de DNA genómico digerido con *Pst*I. Los plásmidos purificados se digirieron con las enzimas *Pst*I, *Eco*RI y *Hind*III

El análisis de restricción de los plásmidos obtenidos con la sonda 8, muestra una sola banda con un tamaño de 3 kb en las digestiones de los plásmidos pBS8.1 a 3, la cual corresponde al tamaño del vector lineal y vacío, por lo que en estos plásmidos no se clonó ningún inserto. En la digestión del plásmido pBS8.4 además de la banda

correspondiente al vector, se observa otra con un tamaño de 2.3 kb tanto en la digestión con *PstI* como con *HindIII*, mientras que en la digestión con *EcoRI*, el inserto se aprecia con un tamaño un poco mayor a 3 kb. Aunque el tamaño de los fragmentos de DNA genómico seleccionados para construir la mini biblioteca fue de 4 kb, también se purificaron fragmentos con menor tamaño y se ligaron en el vector pBS, como en el caso de esta clona (figura 10 A).

Al realizar las restricciones de las clonas obtenidas a partir de la hibridación con la sonda 9, tanto en el plásmido pBS9.1 como en pBS9.2 se observó una sola banda correspondiente al tamaño del vector lineal, indicando que se encontraban vacíos. En los carriles correspondientes a las digestiones del plásmido pBS9.3 se observan, en todos los casos, dos bandas con tamaños de 2.0 y 2.8 kb, pero no la del vector de 3 kb. Además, en la restricción con *PstI*, no se observa una banda cercana al tamaño del inserto clonado (5 kb), la cual se esperaba. Nuevamente, obtuvimos una clona con un inserto de menor tamaño al buscado (figura 10 B).

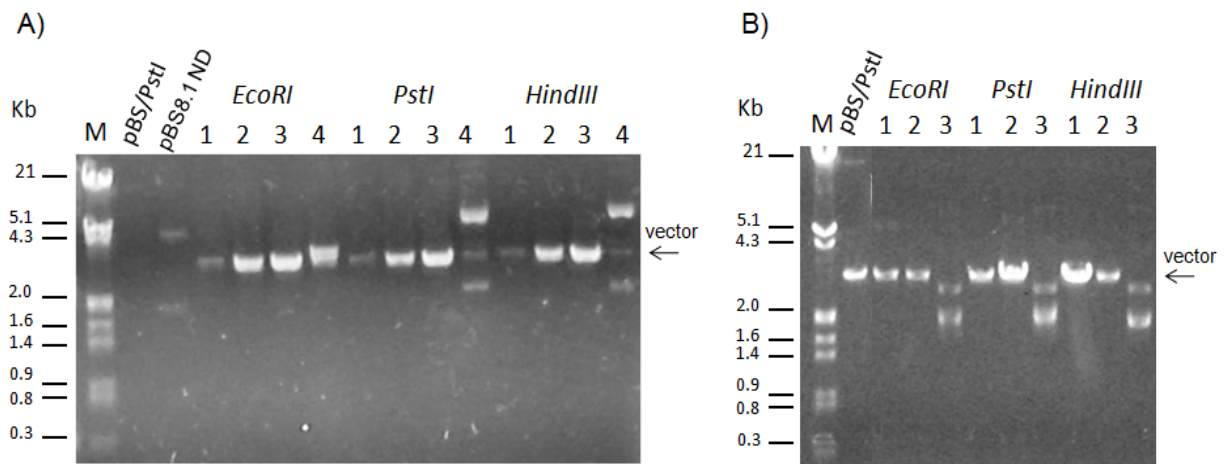


Figura 10. Patrón de restricciones con *EcoRI*, *PstI* y *HindIII*. A) Plásmidos positivos para la hibridación con la sonda 8, pBS8.1 a pBS8.4; pBS8.1ND plásmido sin digerir. B) Plásmidos positivos para la hibridación con la sonda 9, pBS9.1 a pBS9.3; pBS/*PstI* vector vacío linealizado; M: marcador de tamaño: DNA λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

Repetimos en distintas ocasiones la restricción y la electroforesis obteniendo siempre los mismos resultados. Dado que las señales positivas obtenidas en la hibridación con las sondas 8 y 9 presentaban tamaños de 4 y 5 kb respectivamente, y que los tamaños de las clonas pBS8.4 y pBS9.3 eran menores al tamaño de estas

señales, se consideró que probablemente los insertos de estas clonas no contuvieran los genes de interés. Sumado a esta razón, a la par de estos análisis, mediante el escrutinio de una biblioteca genómica de la cepa BQ1 (descrita en el siguiente punto), comenzamos a obtener clonas positivas para la hibridación con las sondas de los genes mutados con mayores posibilidades. Por lo tanto, se decidió no continuar con la secuenciación de los plásmidos pBS8.4 y pBS9.3 y, concentrarnos en el análisis de las nuevas clonas obtenidas.

6.4 Escrutinio mediante hibridación en colonia de una genoteca de *Alicyclophilus* sp. BQ1 construida en pUCP24

Adicional a la construcción y escrutinio de mini-bibliotecas, se decidió realizar el escrutinio de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. BQ1 empleando las sondas 8, 9 y 38 sintetizadas y marcadas previamente. Al finalizar el escrutinio de 2,341 clonas, se obtuvieron 15 clonas positivas con la sonda 8, 11 clonas positivas con la sonda 9 y 9 clonas positivas con la sonda 38 (figura 11). Después del análisis de restricción con los plásmidos purificados, el número total de clonas positivas se redujo a dos distintas para la sonda 8, una para la sonda 9 y tres para la sonda 38. Finalmente, una alícuota de cada plásmido fue enviada a secuenciar.

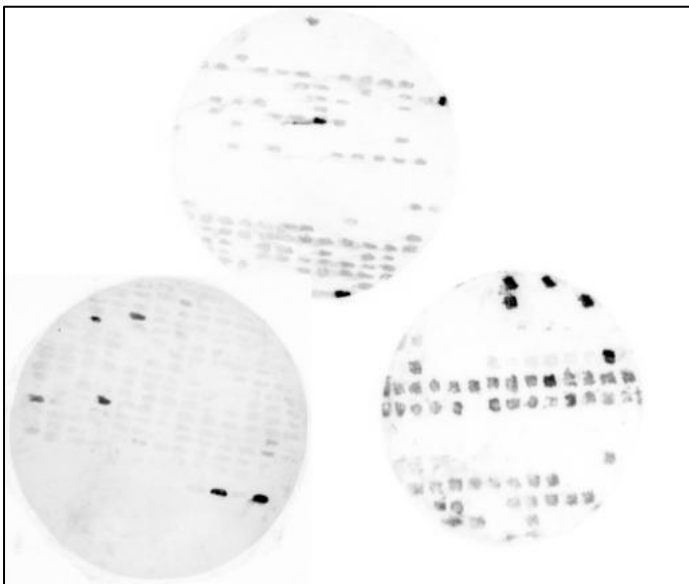


Figura 11. Escrutinio de la genoteca de *Alicyclophilus* sp. BQ1 en pUCP24 mediante hibridación en colonia. Algunas membranas con señales positivas después del escrutinio utilizando las sondas 8, 9 y 38.

6.4.1 Clonas positivas obtenidas con la sonda 8

Mediante la hibridación con esta sonda se obtuvieron las clonas 16 y 17, por lo que se denominaron UCP8.16 y UCP8.17.

UCP8.16

En el patrón de restricción para esta clona, además de la banda correspondiente al vector pUCP24 vacío y lineal (4 kb), se observa una banda intensa con un tamaño alrededor de 3 kb y dos bandas mucho más tenues con tamaños de 1.3 y 0.7 kb, tanto en la digestión con *PstI* como con *EcoRI/PstI*, por lo que el tamaño calculado aproximado del inserto es de 5 kb (figura 12 A). Inicialmente, se obtuvo una secuencia de 1,096 nt utilizando el primer UCP24 forward y el análisis de esta secuencia mostró que 794 nt tenían un 91% de identidad con el gen codificante de una proteína con un dominio de unión a peptidoglicano (PBP, peptidoglycan binding protein) presente en *Acidovorax ebreus* (Dtpsy_0052). La proteína PBP de la cepa BQ1 presentó un marco de lectura abierto de 275 aa y un codón de término, por lo que es probable que se tuviera la secuencia del gen completo. En un inicio consideramos que la proteína PBP tendría relación con la LT codificada en la sonda 8, dado que ambas unen peptidoglicano (PG), sin embargo, el alineamiento de las secuencias completas de ambas proteínas en *A. ebreus* no mostró la presencia de regiones semejantes.

Dado que el inserto clonado era de 5 kb, cabía la posibilidad de que la sonda que codificaba la LT hubiese hibridado con otra región del fragmento clonado, por lo tanto, se decidió determinar la secuencia completa del inserto presente en esta clona. Para ello, se subclonaron en el vector pBS KS los fragmentos resultantes de la digestión del plásmido con *PstI*. Las subclonas fueron nombradas de acuerdo al tamaño del fragmento clonado pBS8.16-3, pBS8.16-1.3 y pBS8.16-0.7. Estos nuevos plásmidos se secuenciaron utilizando los primers M13 y M13 reverse, dirigidos hacia el vector pBS. El análisis de las secuencias obtenidas en las distintas subclonas, permitió identificar los genes presentes en el inserto de la clona UCP8.16, dos de ellos también identificados en el genoma de *A. ebreus* (figura 12 B).

Ninguna de las secuencias que obtuvimos mostró un alineamiento con la secuencia de la sonda 8 y, como vemos, no existe ninguna proteína de tipo LT en esta región dentro de *A. ebreus*, por lo que no tenemos claro la razón de una hibridación positiva con esta clona.

A)

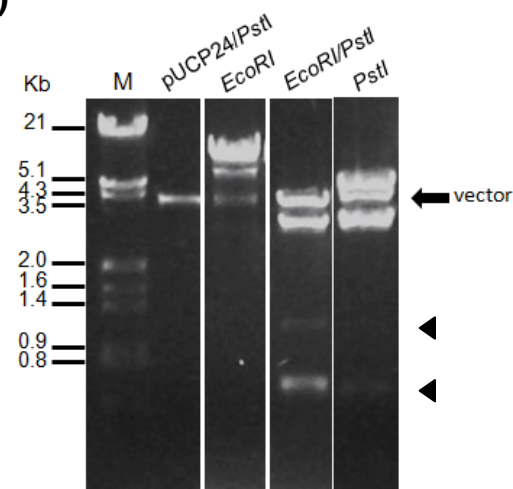
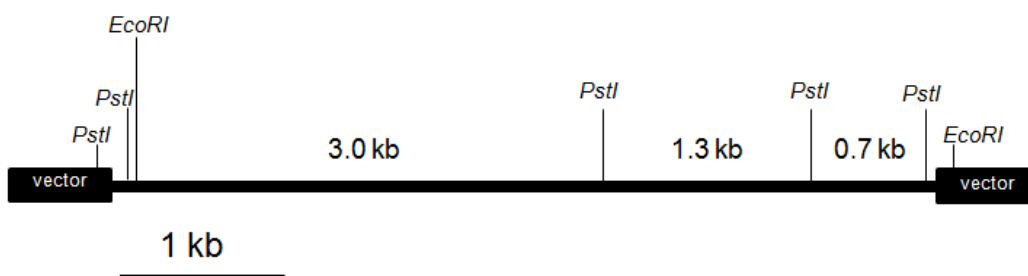
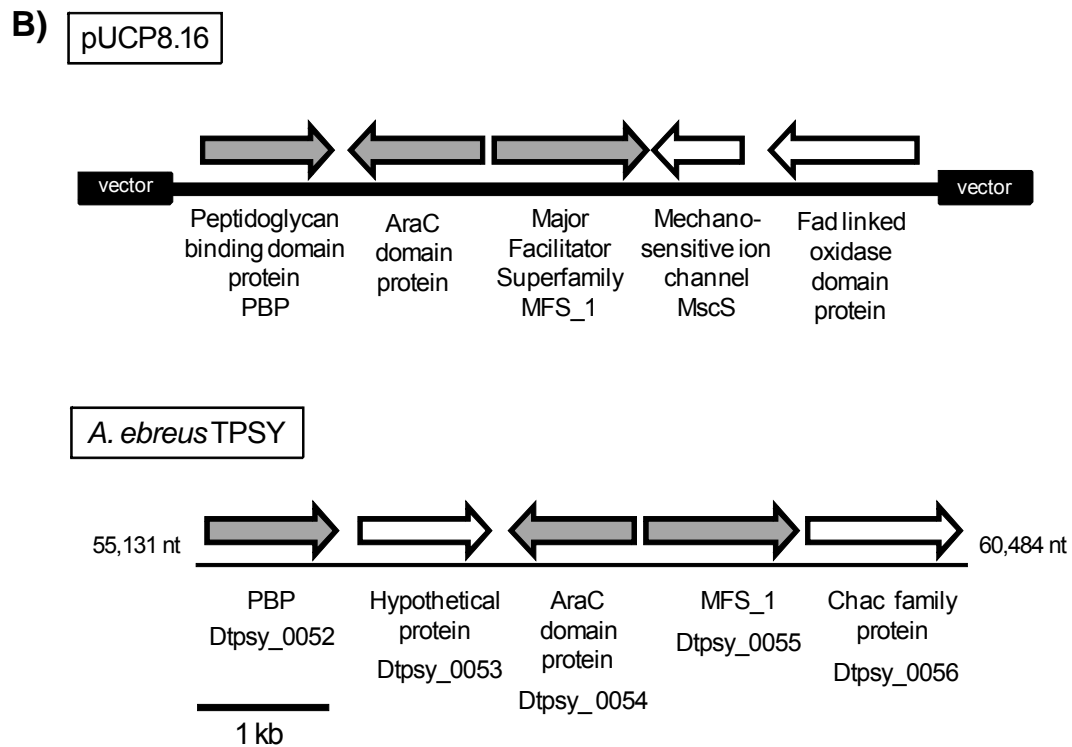


Figura 12. A) Análisis y mapa de restricción de la clona UCP8.16 con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. M: marcador molecular DNA λ digerido con *EcoRI/HindIII*. pUCP24/*PstI*: vector vacío digerido con *PstI*. Las cabezas de flecha indican las bandas correspondientes a los fragmentos de 1.3 y 0.7 kb. **B) Contexto genómico identificado en la clona UCP8.16 (*Alicyclophilus* sp. BQ1) comparado con *A. ebreus*.** Resaltados en gris los genes conservados en ambos genomas.





UCP8.17

En la restricción de este plásmido con las enzimas *EcoRI* y *PstI* se observó, además de la banda correspondiente al vector vacío (4 kb), una banda muy intensa de aproximadamente 3.2 kb y otra un poco más tenue con un tamaño de 0.4 kb por lo que el tamaño aproximado del inserto es de 3.6 kb (figura 13 A).

La secuencia obtenida con el primer UCP24 forward fue de 1,097 nt. El análisis con la base de datos muestra que 848 nt son 99% idénticos a la secuencia de nt de una posible proteína integrasa (b3558) presente en *Escherichia coli* K-12 subcepa MG1655. Al realizar el alineamiento entre esta secuencia y la de la sonda 8 no se encontraron regiones en común. Por otro lado, también se hizo un análisis *in silico* de las secuencias de los genes presentes en la región de 2.5 kb contigua al gen b3558, en el genoma de *E. coli*. No se encontró ningún gen que codificara a una LT (figura 13 B). Dados estos resultados, se decidió no continuar el análisis de esta clona, considerando que la señal que se obtuvo durante el escrutinio de la biblioteca se debió también a una hibridación inespecífica.

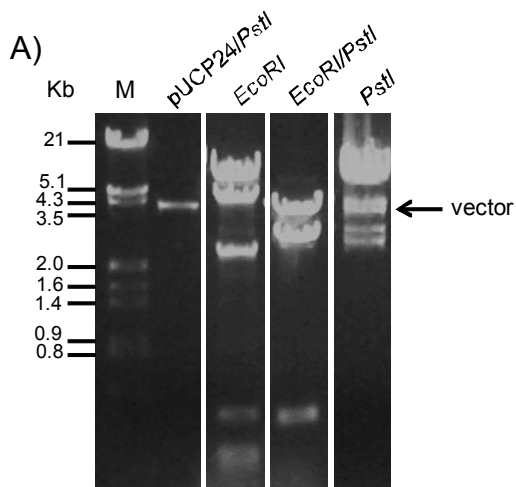
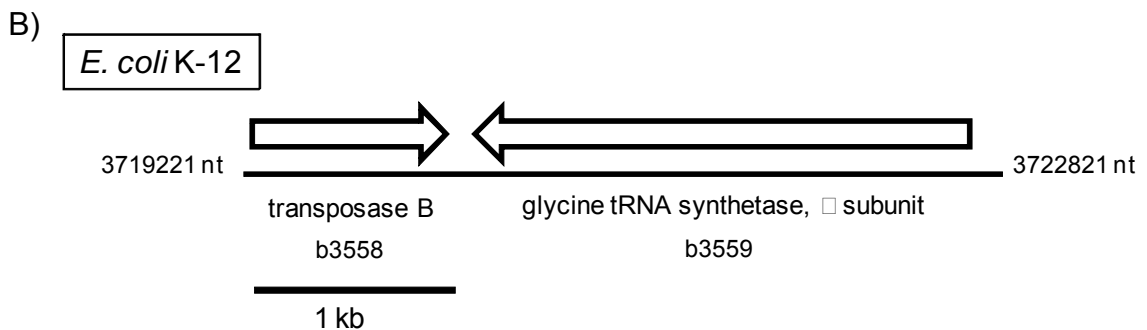


Figura 13. Análisis de la clona UCP8.17. A) Restricción del plásmido con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. M: marcador molecular DNA λ digerido con *EcoRI/HindIII*. pUCP24/*PstI*: vector vacío linerizado con *PstI*. B) Gen b3558 (identificado en esta clona) y análisis del contexto genómico en *E. coli* K-12.



6.4.2 Clona positiva obtenida con la sonda 9

Mediante la hibridación con esta sonda se obtuvo la clona 7 por lo que se ha denominado UCP9.7. El tamaño del inserto presente en esta clona es de aproximadamente 5.0 kb de acuerdo con su patrón de restricción. En la digestión con *EcoRI* se distingue una banda muy intensa con un tamaño aproximado de 6 kb, la cual corresponde al vector pUCP24 (4 kb) unido a un fragmento del inserto (2 kb). Una segunda banda también es claramente observada con un tamaño aproximado de 3 kb (figura 14 A). La secuencia obtenida con el primer UCP24 forward fue de 1,068 bp y la comparación con la base de datos muestra que los primeros 786 nucleótidos alinean con la proteína L-carnitina dehidratasa presente en *Ralstonia metallidurans* Ch34 con 70% de identidad (Rmet_3791). Por otro lado, la secuencia que se obtuvo utilizando el

primer UCP24 reverse fue de 1,142 nucleótidos y el análisis de esta información mostró que 611 nucleótidos alinean con la secuencia de nucleótidos de una proteína hipotética Ajs_3297 presente en *Acidovorax* JS42 con un 82% de identidad.

Debido a que ninguna de las secuencias anteriores presentó un alineamiento con la secuencia de la sonda 9, se decidió subclonar el fragmento de 3 kb en el vector pBS y religar el fragmento de 6 kb, que contenía 2 kb de inserto, denominando a estas nuevas clonas como 9.7-3 y 9.7-2 respectivamente. Alícuotas de cada plásmido purificado se secuenciaron utilizando los primers M13 y M13 reverse.

El análisis de las diferentes subclonas permitió conocer el arreglo genómico completo presente en la clona 9.7 (figura 14 B). Sin embargo, no se encontró una organización génica semejante en los distintos genomas de bacterias filogenéticamente cercanas. A pesar de haber identificado todos los genes presentes en el inserto de esta clona, no se obtuvo algún alineamiento entre las secuencias encontradas y la secuencia presente en la sonda 9. Nuevamente la posibilidad de una hibridación espuria durante el escrutinio explicaría la presencia de una señal positiva con esta clona.

A)

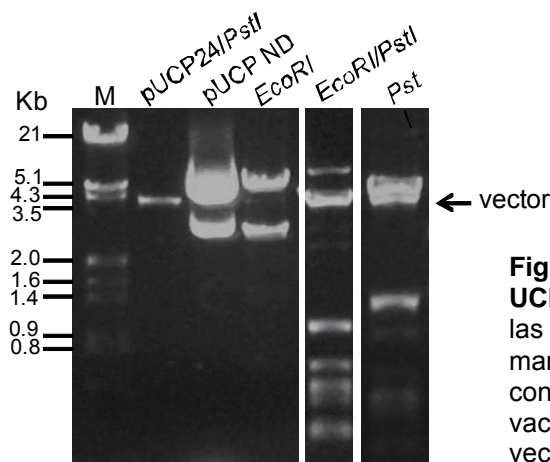
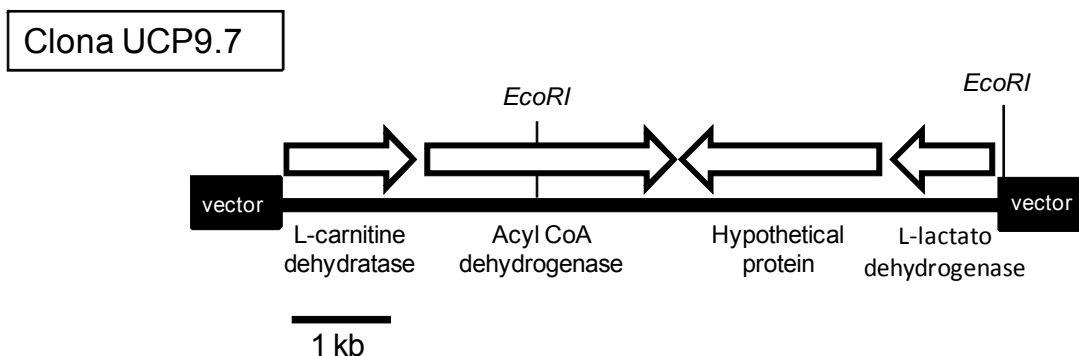


Figura 14. Análisis de la clona UCP9.7. A) Análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. M: marcador molecular DNA λ digerido con *EcoRI/HindIII*; pUCP24/*PstI*: vector vacío digerido con *PstI*; pUCP ND: vector sin digerir. B) Contexto genómico identificado en la clona 9.7.

B)



6.4.3 Clonas positivas obtenida con la sonda 38

Durante la hibridación con esta sonda se obtuvieron tres clonas distintas entre sí (12, 13 y 14), y fueron denominadas, en forma semejante a las anteriores, como UCP38.12, UCP38.13 y UCP38.14. El análisis de estas clonas lo realizó Eduardo Martínez Platón como parte de su proyecto de estancia tutelada durante el semestre 2010-2. Como resultado de su análisis, se encontró un inserto con un tamaño de 3 kb en la clona UCP38.12, otro de 1.5 kb en la clona UCP38.13 y otro con tamaño de 4 kb en la clona UCP38.14. Únicamente la clona 38.12 fue enviada a secuenciar utilizando el oligo UCP24 forward, el análisis de la secuencia obtenida (1,232 nt) mostró que es idéntica en un 85% a la secuencia de un gen de *Acidovorax* sp. JS42, cuyo producto es una proteína que participa en la biogénesis de citocromo C. También en esta ocasión la

falta de alineamiento entre la secuencia de esta clona y la sonda 38 indica una probable hibridación inespecífica.

6.5 Identificación de los genes mutados en el genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1

Con la idea de contar con mayor información, a la par del procedimiento experimental, desde octubre de 2010 se ha iniciado la obtención de la secuencia del genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1. Para ello una muestra del DNA genómico de la cepa BQ1 se envió a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva del DNA (UUSMD) localizada en el IBT-UNAM, a cargo del Dr. Enrique Morett. Empleando la tecnología de Illumina-Solexa se han obtenido 24'099,294 millones de secuencias de 36 bases de las cuales 22'825,363 han sido lecturas buenas y de ellas, 21'870,000 han sido pareadas con lo cual se han podido ensamblar 486 nodos de más de 500 nt, empleando el programa Velvet. Este análisis ha sido realizado por el M. en C. Luis Lozano, del Instituto de Ciencias Genómicas de la UNAM. Empleando esta información se decidió realizar un análisis bioinformático para rastrear los genes afectados en la mutagénesis dentro de los nodos de la cepa BQ1. A partir de esta búsqueda pudimos situar los cuatro genes mutados, incluyendo el de la clona 5 que había revertido, conocer las secuencias génicas completas y logramos además, determinar el contexto genómico en el que se encuentran.

Por otro lado, la versión final del genoma de *Alicyclophilus denitrificans* BC fue liberada a principios de enero de este año. Este acontecimiento, aunado a lo descrito anteriormente, nos permitió realizar una comparación de los contextos genómicos entre las dos cepas. A continuación presento los resultados obtenidos de estos análisis.

6.5.1 Clona mutante 5

La secuencia completa del gen afectado en esta clona se identificó en el nodo 424, el cual tiene un tamaño de 25,957 nt mientras que el tamaño del gen mutado es de 1,050 nt. Utilizando el algoritmo BLASTx, se determinó que la secuencia traducida del gen de la mutante 5 es 96% idéntica a la secuencia de la proteína codificada por el gen *Alide_1725* de *Alicyclophilus denitrificans*. Esta proteína es la subunidad de unión a

sulfonatos perteneciente a un transportador periplásmico de tipo ABC (ABC type transporter periplasmic ligand binding subunit) (figura 15). Como vemos, esta información concuerda con el resultado parcial encontrado por el Dr. Campos al comienzo de este trabajo.

```

Alicyclophilus sp. BQ1 MSPLSVTRRQLGRLGMVSAAALGMPALLRAQSRPGAAMPVRIAVGGQAGLYYLPLTVALE
A. denitrificans BC  MFPLSVTRRQLGRLGILSAAALGVPALLRAQSRPGAAMPVRIAVGGQAGLYYLPLTVALG
* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alicyclophilus sp. BQ1 LGFFRDEGLDVRVMDYPGGGLALLALHGRVADVCCGAFEHVVRQQLRGVAYRSLAVLGRA
A. denitrificans BC  LGFFRDEGLDVRVMDYPGGGLALQALHGRVADVCCGAFEHVVRQQLRGVAYRSLAVLGRA
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alicyclophilus sp. BQ1 PQLALVASARHWPLKDIAGFRGLRVGVTALDSSTQFLASLWLNQSGVPLDAVRFVGVGSG
A. denitrificans BC  PQLALVASARHWPLKDIAGFRGLRVGVTALDSSTQFLASLWLNQSGVPLDTRVRFVGVGSG
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alicyclophilus sp. BQ1 MEALTALRQGRVHALCHSDPLITMLEQRGEVRLLDTRTLKGTVEMFGGAMPGACLYAPQ
A. denitrificans BC  MGALTALRQGRVHALCHSDPLITMLEQRGEVRLLDTRTLKGTVEMFGGAMPGACLYAPQ
* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alicyclophilus sp. BQ1 DYVQNHSAEVQALVNALVHALKWLQTASPTDLARVVPPSYLLGDRARYMAAFYKVRETLS
A. denitrificans BC  DYVQSHPAEVQALVNALVHALKWLQTASPTDLARVVPPSYLLGDRARYMAAFYKVRETLS
****.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alicyclophilus sp. BQ1 PDGLMPEDGPVTAIRAVARLQPE--SAAARVALDKTFSNDWVRKAKQKFQL
A. denitrificans BC  PDGMPEDGPVTAVRAVARLQPESAAAAARVALDKTFSNNWVRKAKQKFQL
***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 15. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 5 (cepa BQ1) y el gen Alide_1725 (*A. denitrificans* BC), idénticas en un 96%. Este gen codifica a la subunidad de unión a sulfonatos perteneciente a un transportador periplásmico de tipo ABC (ABC type transporter periplasmic ligand binding subunit).

Se identificaron los genes aledaños al gen mutado en el genoma de la cepa BQ1. Comparada con *A. denitrificans* BC, aproximadamente 4 kb de la región río abajo se mantiene conservado en ambas cepas. Sin embargo, al comparar los genes presentes río arriba, 84 genes en *A. denitrificans* BC no se encontraron en esa región en BQ1, lo cual sugiere que existió un rearrreglo genético ocasionado quizás por una delección o una translocación intracromosómica de estos genes en *Alicyclophilus* sp. BQ1 (figura 16). En organismos filogenéticamente cercanos, la región río abajo presenta el contexto genómico parcialmente conservado en cepas de *Acidovorax* sp. (Figura 17). Sin embargo, el contexto genómico identificado en la región río arriba no se encontró en ningún otro organismo. Para estos análisis se utilizaron las bases de datos disponibles

en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.com>).

El azufre necesario para los procesos biosintéticos de la célula, se obtiene a través de su forma inorgánica (sulfatos o sulfitos) o mediante compuestos organosulfonados como los sulfonatos ($R-SO_3^-$) y los ésteres de sulfato ($R-OSO_3^-$), los cuales se encuentran normalmente en suelos y sedimentos (Kertesz, 1999). La toma de estos compuestos no puede ocurrir en forma pasiva, por el contrario, es necesaria la acción de un sistema activo de transporte. Todos los transportadores de sulfonatos y ésteres de sulfato identificados en bacterias pertenecen a la superfamilia de los transportadores con cassette de unión al ATP (ABC, ATP binding cassette), donde la energía necesaria para el proceso es obtenida mediante la hidrólisis de ATP. La forma canónica de estos transportadores consiste de tres componentes: una proteína con alta afinidad de unión al sustrato localizada en el periplasma (PB, periplasmic binding protein), una permeasa unida a la membrana presente como un dímero (TMD, transmembrane domain) y, un componente de unión al ATP situado periféricamente sobre la membrana con la cara hacia el citoplasma, también en forma de dímero (NBD, nucleotide binding domain) (figura 18) (Kertesz, 2000).

La especificidad de los transportadores ABC de sulfatos y compuestos organosulfonados es mayormente provista por la PB, por lo que, esta proteína presenta mayor variabilidad dentro del sistema.

El mecanismo completo por el cual estos transportadores funcionan aún no se conoce con claridad. Sin embargo, uno de los modelos propuestos describe que el transporte comienza cuando la PB unida al sustrato interactúa con las regiones extracelulares de la permeasa o TMD, la cual se encuentran en una conformación cerrada. La unión de ATP desencadena un cambio conformacional global en el cual los NBDs se cierran promoviendo la hidrólisis del ATP, mientras que el complejo PB-sustrato se une por completo a la TMD. Tanto la PB como la TMD se abren en la superficie periplásmica de la membrana para facilitar la transferencia del sustrato desde la PB hacia el sitio de unión en la membrana. Finalmente, cuando la hidrólisis del ATP

ocurre, el dímero de NBDs se desestabiliza, el transportador regresa a su estado inicial y el sustrato completa su translocación a través de la membrana (Jones *et al.*, 2007).

En organismos como *E. coli*, *P. putida* y *P. aeruginosa*, los genes que codifican estas tres subunidades se encuentran en un operón (Kertesz, 2000). En BQ1 el gen afectado por la inserción del transposón, cuyo producto es la proteína PB, no es flanqueado por los genes codificantes de las otras subunidades del transportador, por lo que teóricamente este sistema de transporte no es funcional. Tampoco en *A. denitrificans* BC el gen homólogo, Alide_1725, se encuentra en un operón con los genes que corresponderían al sistema de transporte completo (figura 16). Sin embargo, fue posible identificar dos clusters en el genoma de *A. denitrificans* BC (Alide_1223-1225 y Alide_2781-2783) que codifican el sistema completo de transporte ABC de sulfonatos. Por lo que, a diferencia del gen 1725, estos otros dos clusters tienen todos los componentes necesarios para ser funcionales.

Una función inusual en los transportadores tipo ABC involucrados en la toma de sulfatos y compuestos organosulfonados es que, en algunos casos, una aparente duplicación de función es observada para los transportadores completos o en las proteínas de unión al sustrato (Kertesz, 2000).

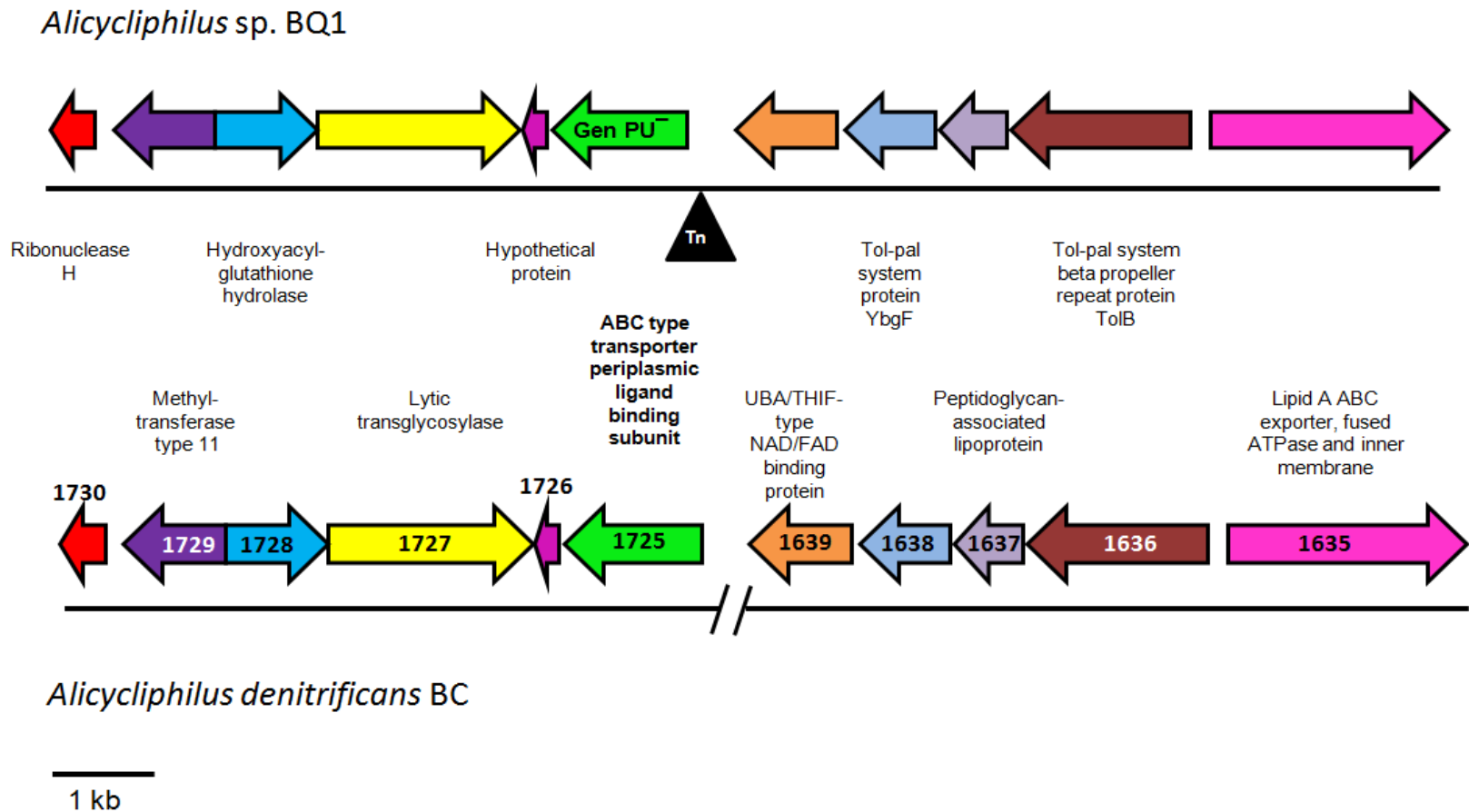


Figura 16. Análisis del contexto genómico de la mutante 5en *Alicyclophilus* sp. BQ1. Se presenta comparado con el de *A. denitrificans* BC. Se indica el sitio de inserción del transposón *Himar1* dentro de la zona regulatoria para este gen (a 159 nt del codón de inicio de la traducción). El corte de la línea en el genoma de *A. denitrificans* representa los 75.5 kb (84genes) que no se encontraron en *Alicyclophilus* BQ1.

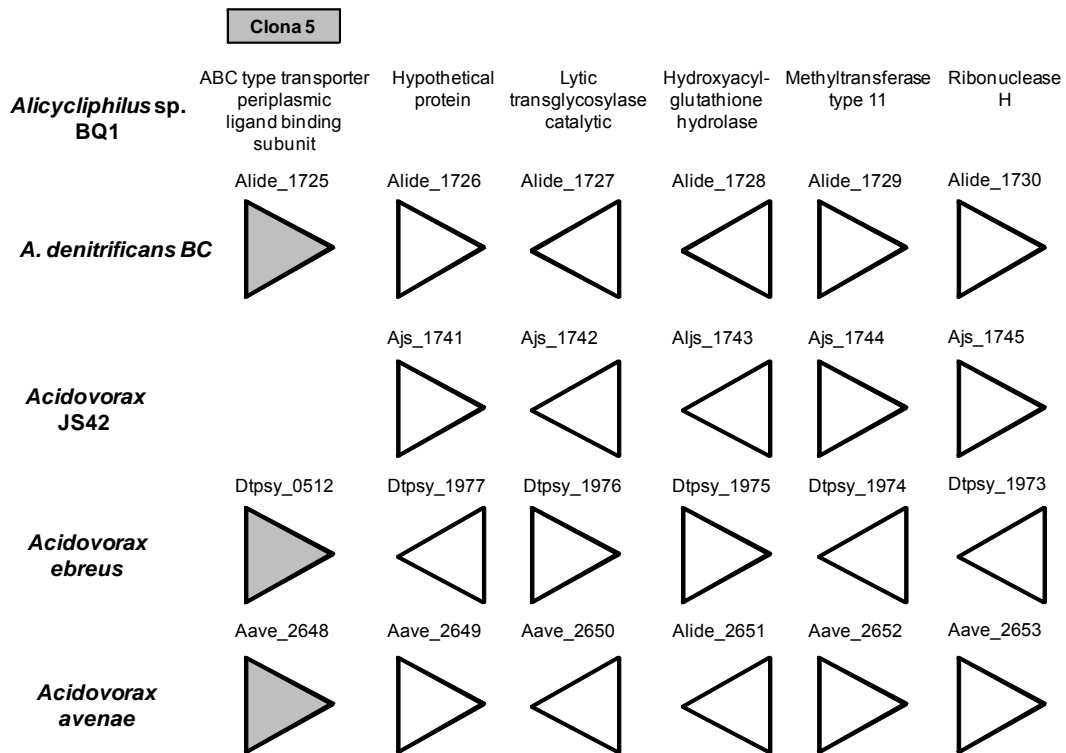


Figura 17. Comparación del arreglo genético identificado en la región río abajo del gen mutado en la clona 5. Un contexto similar fue identificado en *A. denitrificans* BC y en *Acidovorax avenae*. En *Acidovorax* JS42 no existe un gen homólogo al encontrado en la mutante de BQ1, aunque los genes aledaños mantienen su organización. Tomado de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) <http://www.kegg.com> KEGG.

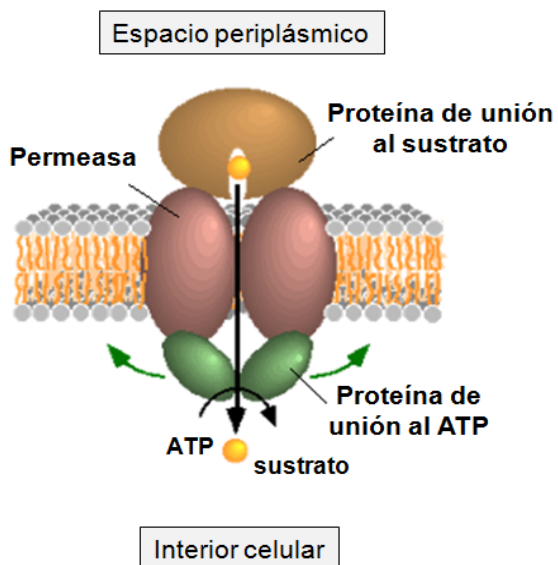


Figura 18. Representación general de los transportadores tipo ABC. Tomado de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) <http://www.kegg.com>.

Dada esta información, es posible sugerir que en *A. denitrificans* la proteína codificada por el gen Alide_1725 pudiera ser capaz de interactuar con alguno o los dos sistemas de transporte de sulfonatos. Es decir, tal vez esta proteína es isofuncional a las codificadas por los genes Alide_1223 y Alide_2783 y se comporte como una proteína “huérfana”, tal y como se ha descrito en otras especies. En el caso de *Alicyclophilus* sp. BQ1, se rastrearon los homólogos a los genes codificantes para los otros sistemas de transporte organizados en clusters génicos y se encontraron en los nodos 523 y 644. Por lo anterior sugerimos que un comportamiento semejante al propuesto para la proteína “huérfana” codificada por el gen Alide_1725 podría estar ocurriendo en BQ1.

En cuanto a la relación directa de este gen con la actividad de BQ1 sobre PU no hemos logrado concretar una idea clara a partir de la información encontrada. Sin embargo, una posibilidad es que la proteína codificada por el gen mutado no sea específica para compuestos orgánicos de azufre. Es decir, en BQ1 esta proteína sería empleada para reconocer compuestos con estructuras similares, generados a partir de la depolimerización de PU. El paso posterior de estos compuestos hacia el interior de la célula, podría ocurrir mediante el uso de los sistemas alternos de transporte para sulfonatos, los cuales también encontramos en *Alicyclophilus* sp. BQ1.

6.5.2 Clona mutante 8

El gen afectado en esta clona se encontró en el nodo 520 el cual tiene 12,113 nt. El gen completo tiene un tamaño de 1,983 nt y codifica una proteína 98% idéntica a una transglicosilasa lítica (LT, lytic transglycosylase) presente en *A. denitrificans* BC (Alide_0611), lo cual concuerda con la identificación preliminar que se hizo para este gen (figura 19).

Se identificaron los genes cercanos al de la LT presentes en la cepa BQ1. La comparación con el contexto genómico presente en *A. denitrificans* BC mostró que este arreglo genético se encuentra conservado en ambas cepas (figura 20).

```

Alicyclophilus sp. BQ1 MHWLKILTPLVAGAALAAAAPWAAAQNRGDDTLLEMQQAFRKGDKSRLTALLPTVRGHAL
A. denitrificans BC  MHWLKILTPLIAGAALAAAAPWAAAQNRGDDTLLEMQQAFRKGDKSRLTALLPTVRGHPL
*****:*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 EPWAAYWELRRLDQAQSDQVNAFLQRFAGTYQEDRLRNDWLLLLGQRRDWDQFAELHPY
A. denitrificans BC  EPWAAYWELRRLDQAQSDQVNAFLQRFAGTYQEDRLRNDWLLLLGQRRDWDQFADLHPY
*****:*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 YRMGDDREVRRCYALAIQIKGTAEDAGAEVLRNRYALRDLDDGCSNAAAEMLAARKIKP
A. denitrificans BC  YRMGDDREVRRCYALAIQIKGTAEDAGAEVLSNRYALRDLDDGCSNAAAEMLAARKIKP
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 LDVWRKARLAAEANRLRMARKAVEIVAPDALAQREALDSPTKYLTGRATARGKERQELV
A. denitrificans BC  LDVWRKARLAAEANRLRMARKAVEIVAPDALAQREALDSPTKYLTGRATARGKERQELV
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 VLALVRMAMSDAGAAAAGLLDNKGVHLSAEERNWLWGLIGKQAALSLSPDALTYFGNVSR
A. denitrificans BC  VLALVRMAMSDAGAAAAGLLDSKGVHLSAEERNWLWGLIGKQAALSLSPDALAYFGNVGR
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 DTDLNDMLAWKVRAALRAGQWKLVGSRIDAMSARARQDSTWVYWKARSLTAGRASEEDR
A. denitrificans BC  DTDLNDMLAWKVRAALRAGQWKLVGSRIDAMSARARQDSTWVYWKARSLTAGRASEEDR
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 AAARQLYERIAAGTSGFYEQLALEELGARVTPAPAPVPLTDAEKAAARANPGLNRALYAIA
A. denitrificans BC  AAARQLYERIAAGTTGFYEQLALEELGARVTPAPAPVPLTDAEKAAARANPGLNRALYAIA
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 LGLRSEGVREWNYTTNLHQGGMSEERDLAALDLACERQVWDRICINTSERTRDVIDVAQR
A. denitrificans BC  LGLRSEGVREWNYTTNLHQGGMSEERELLAALDLACERQVWDRICINTSERTRDVIDVAQR
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 FPMYQTTVVQRARGIGLDPAYVYGLIRQESRFIMDARSGVGASGLMQVMPATARWTARK
A. denitrificans BC  FPMYQATVVQLARGIGLDPAYVYGLIRQESRFIMDARSGVGASGLMQVMPATARWTARK
*****.*

Alicyclophilus sp. BQ1 IGLTGFTPQQINDRDNITIGTAYLKLALDDFDGSMPLAAAAYNAGPGRPRNWRNGPVL
A. denitrificans BC  IGLTGFTPQQINDRDNITIGTAYLKLALDDFDGSMPLAAAAYNAGPGRPRNWRNGPVL
*****.*

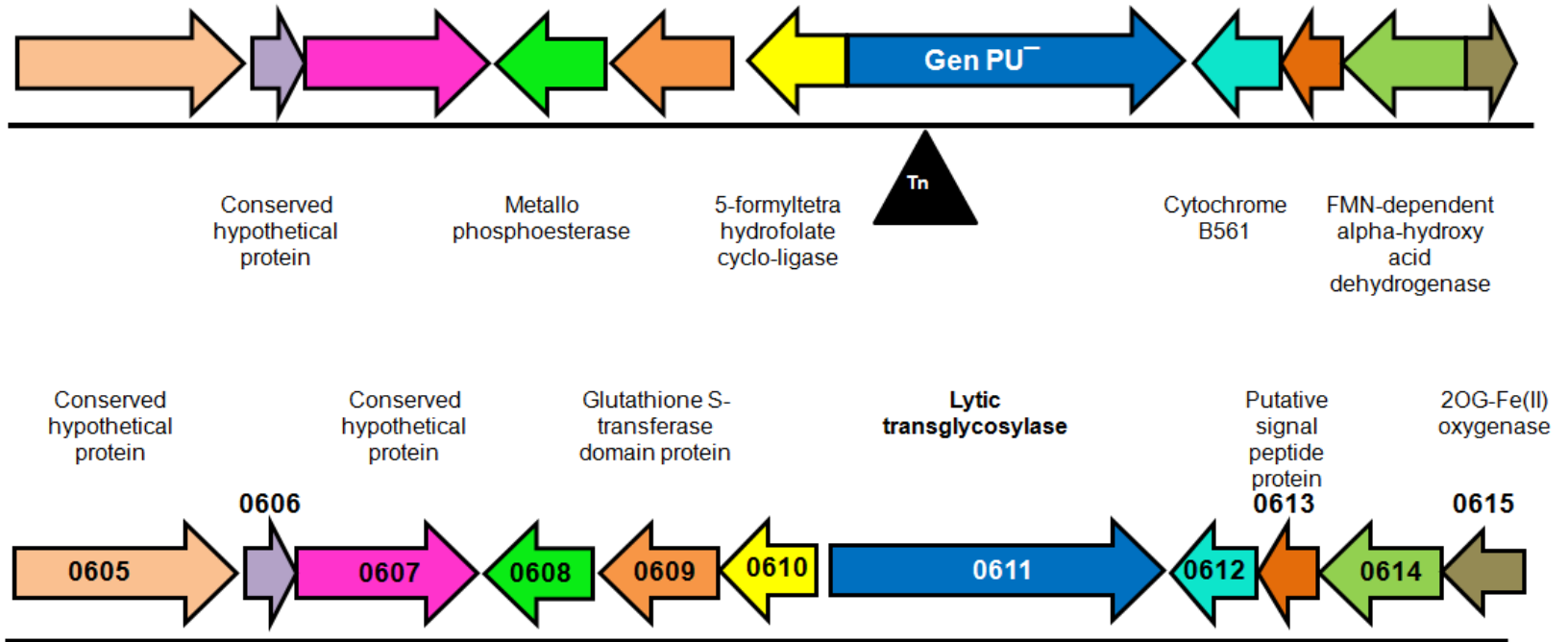
Alicyclophilus sp. BQ1 AAIWAENVFNETRDYVKKVLANTVNYAAILTGQPQSLKSRLGTGPRDAREPEPNKDL
A. denitrificans BC  AAIWAENVFNETRDYVKKVLANTVNYAAILTGQPQSLKSRLGLVGPDRDAREPEPNKDL
*****.*

```

Figura 19. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 8 (cepa BQ1) y el gen Alide_0611 (*A. denitrificans* BC).

De forma interesante, este gen se encuentra orientado en forma contraria a todos sus genes aledaños tanto en *A. denitrificans* BC como en BQ1, así como en las cepas *Acidovorax* JS42 y *A. ebreus*. No fue posible identificar una secuencia promotora ni para el gen de BQ1, ni para su homólogo en la cepa BC, mediante el uso del programa para predicción de promotores BPROM disponible en la red (<http://linux1.softberry.com>).

Alicyclophilus sp. BQ1



Alicyclophilus denitrificans BC

1 kb

Figura 20. Comparación de los contextos genómicos en *Alicyclophilus* sp. BQ1 y *A. denitrificans* BC identificados para el gen de la mutante 8. Indicado también el sitio de inserción del transposón *Himar1*

La pared celular está compuesta principalmente por unidades de peptidoglicano (PG), el cual es una red formada por N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNac). Este heteropolímero es un saco tipo malla que rodea a la célula bacteriana para otorgarle firmeza, soporte y forma, así como resistencia a la presión de turgencia interna. La integridad del saco de PG es importante para la viabilidad celular, sin embargo, este saco no es una estructura estática, por el contrario se extiende y se contrae de manera continua (Höltje, 1996). Por otro lado, la producción de flagelos y la creación de poros que permitan el ensamblaje de complejos mayores, tales como los sistemas de secreción, necesitan también de un reacomodo en la estructura del PG. Para que esto suceda se requiere de la participación de diversas enzimas, organizadas en complejos enzimáticos, que se encuentren coordinadas con los sistemas de síntesis de PG, para garantizar la funcionalidad y viabilidad de la célula (Vollmer y Höltje, 2001).

Entre las enzimas necesarias para estos procesos se encuentran las transglicosilasas líticas, las cuales representan una clase de autolisinas que actúan sobre el PG con la misma especificidad por el sustrato que la lisozima. Sin embargo, las LT rompen el enlace β -1,4 glicosídico presente entre las unidades de MurNac y GlcNAc sin utilizar una molécula de agua, resultando en la formación del compuesto 1,6-anhidromuramílico (Höltje *et al.*, 1975). De acuerdo con las estructuras resueltas para diferentes LTs, se ha propuesto que en el posible mecanismo de esta enzima se necesita la participación de un residuo ácido dentro del sitio catalítico (Blackburn y Clarke, 2001).

Al realizar un alineamiento múltiple de secuencias de distintas LTs en diferentes géneros bacterianos, así como del bacteriófago λ se identificaron cuatro familias de LTs, con base en su similitud y en la presencia de motivos consenso (Blackburn y Clarke, 2001). La primera de éstas es una superfamilia que comprende enzimas cuya secuencia es similar a la LT soluble de *E. coli* (Slit). Esta superfamilia a su vez, se subdividió en cinco subfamilias (denominadas IA-IE). Todos los miembros de esta

superfamilia presentan tres motivos consenso dentro del dominio LT-GEWL (*Lytic transglycosylase/goose egg white lysozyme*). El primer motivo está constituido por glutámico y serina (E-S) y se considera que el residuo de glutámico participa en el mecanismo catalítico de la enzima. El segundo motivo está constituido por la secuencia G-L-M-Q, presente en las subfamilias IA, IC y IE. Esta secuencia cambia por G-L-M-M y G-L/I-W-Q en las enzimas de las subfamilias IB y ID respectivamente. Finalmente, el tercer motivo incluye la secuencia A-Y-N presente en las enzimas de todas las subfamilias con excepción de la familia IE, donde la secuencia es Y-A-N. Las otras familias de LT se agrupan con base en las secuencias MltA (transglicosilasa lítica de membrana A, en *E. coli*) para la familia 2; MltB (transglicosilasa lítica de membrana B, en *E. coli*) para la familia 3, y lisozimas del fago λ , para la familia 4. Tanto las familias 3 y 4 conservaron el residuo de glutámico en el primer motivo de sus secuencias. La presencia invariante de este residuo ácido en todas las LTs analizadas reafirma la idea de la participación de este aminoácido como residuo catalítico necesario para la ruptura del enlace β -glicosídico. En el caso de las secuencias clasificadas en la familia 2 no se encontró el residuo de glutámico, sin embargo, residuos de aspartato en los motivos V y VI son considerados como equivalentes (Blackburn y Clarke, 2001).

La proteína presente en *A. denitrificans* (YP_004125267), codificada por el gen Alide_0611, consta de 660 aminoácidos. Dentro de su secuencia, la región comprendida entre los aminoácidos 550 y 623 corresponde al dominio LT-GEWL mientras que los residuos 510, 530, 564 y 583 conforman el sitio de unión a N-acetil-D-glucosamina. Al comparar la secuencia de la LT identificada en *Alicyclophilus* sp. BQ1, también de 660 aminoácidos, con las diferentes LTs resultantes en el análisis BLASTx, se identificó el dominio GEWL y los tres motivos descritos para la familia IA (figura 21).

La mayoría de las LTs estudiadas hasta ahora están relacionadas con el rearrreglo de PG durante el crecimiento y duplicación celular, sin embargo, recientemente también se han identificado LTs cuyas funciones son distintas a las comúnmente conocidas.

secreción tipo III y IV describen la participación de una proteína que, con base en la comparación de su secuencia, tiene semejanza con LTs especializadas. Sin embargo, todos los ejemplos que describen la participación de LT especializadas en sistemas de secreción están relacionados con mecanismos de infección en bacterias patógenas (Koraimann, 2003) y no se ha descrito ningún caso en el que esta enzima esté involucrada en mecanismos que no sean relacionados con patogenicidad.

Hasta el momento, desconocemos si en *Alicyclophilus* existe algún sistema de secreción que, como en el caso de *P. chlororaphis*, esté involucrado con la actividad sobre PU, ni tampoco podemos explicar la participación de una LT en dicho mecanismo. Sin embargo, dado que esta proteína es de tipo Slt (familia IA) y que la viabilidad de la bacteria no se comprometió con la generación de la mutante, consideramos que quizás se trate de una LT de tipo especializada y, su objetivo dentro de la bacteria no está relacionado con el crecimiento y la duplicación celular. Por el contrario, pudiera ser que la función de esta enzima sea generar un rearrreglo dentro del saco de PG con lo cual se permitiría el ensamblaje de algún sistema más complejo de secreción. La formación de este sistema estaría relacionada entonces con la liberación de enzimas capaces de actuar sobre el PU y facilitar así su uso como fuente de carbono. Por supuesto, ésta es una primera aproximación para intentar explicar la participación de este gen en el metabolismo de PU, y será necesario abordar experimentalmente ciertos aspectos para comprobar que el comportamiento de esta proteína es como lo proponemos.

6.5.3 Clonas mutantes 9 y 38

En el caso de estas clonas, ambas secuencias se encontraron en el nodo 791, es decir, los genes mutados en las clonas 9 y 38 se encuentran en la misma región del genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1, únicamente separados por 877 nt. El tamaño completo de este nodo es de 13,171 nt. El gen afectado en la mutante 9 tiene un tamaño de 417 nt y codifica una proteína hipotética idéntica en un 53% a la proteína de *Rhodospirillum rubrum* codificada por el gen Rru_A3158. Continuo a este gen, en BQ1, y en el mismo marco de lectura, se encuentra otro de 972 nt cuyo producto es una

proteína con plegamiento α/β hidrolasa idéntica en un 76% a la proteína de *Geobacter* sp. FRC-32 codificada por el gen *Geob_0938*. Ambos genes coinciden con las secuencias parciales identificadas previamente por el Dr. Campos en las mutantes. Sin embargo, es importante señalar que ninguno de los dos genes fueron encontrados en el genoma de *A. denitrificans* BC, ni en ningún organismo filogenéticamente más cercano (figura 22).

```

Alicycliphilus sp. BQ1 M--T- NHLDRFVKAQDGI FDNAIEEILAGKKQTHWMETWFI FFPQLRGLGQSENAHFYGI
R. rubrum             MPPTDFPFSLERFVMAQT PLLDTALAE LRQGRKQSHWM--WFVFPQARGLGSSSTARFYGL
                    *  *      *:*:* *  :*:*: *  *:*:*:* *:*:* *:*:* *..*:*:*:

Alicycliphilus sp. BQ1 RTLNEARNYL AHPILGPR LKQATQSVIEAN-VSPQEIFGGIDCQKFASCMTLFGEASPP-
R. rubrum             RSLDEARAYLAHP LLLKARLEQATQTVLALG AIDLHALFGSPDDKKFLSMSLFALASPTT
                    *:*:*:* *:*:*:* * .**:*:*:*:*: . . . :** * :** *:*:* *:.**

Alicycliphilus sp. BQ1 ESVFNQVLRTIS--ITDERTITMLRREE---
R. rubrum             DTPFHQALERW NKG R PDEATLRFLGQPPPTA
                    :: *:*:* . . . ** * :* :

```

Figura 22. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 9 (cepa BQ1) y el gen *Rru_A3158* (*Rhodospirillum rubrum*).

Desafortunadamente, la proteína identificada en *R. rubrum*, al igual que sus homólogas en géneros cercanos, se encuentra sin caracterizar (se reportan como proteínas hipotéticas) por lo que no fue posible hacer una propuesta sobre su participación en el metabolismo de PU. Sin embargo, la proteína codificada por el gen contiguo, tiene un plegamiento α/β presente en proteínas de tipo hidrolasas como las esterasas y lipasas.

Por otro lado, el gen afectado en la mutante 38 tiene un tamaño de 390 nt y codifica una proteína con un dominio común dentro de la superfamilia de metaloenzimas tipo VOC (vicinal oxygen chelate). El análisis con la base de datos mostró que esta proteína es 87% idéntica a la que se encuentra en *A. denitrificans* BC codificada por el gen *Alide_4197* (figura 23). En el caso de esta mutante, el resultado parcial encontrado por el Dr. Campos se refería a una proteína de tipo deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, sin embargo, nuestros resultados mostraron que en realidad el gen afectado por

la inserción del transposón es el que codifica a una metaloenzima tipo VOC el cual precede al gen identificado inicialmente (Ver figura 24).

<i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	MFSHVMLGASNLDKSRKFYDALLGTLGCKPGFTDPKNRTFWRHAGNTFSITAPINGEPAC
<i>A. denitrificans</i> BC	MFSHVMLGASDLLDKSKQFYDAFLGALGCKPGFTDPKNRTFWRHAGNTFAISAPINGEPAC
	*****:*****.:*****:*.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
<i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	HGNGSTIGFAAQSQEADAAHAAGVAAGGVTCEDPPGWRGEGAG-RLYLAYLRDPDGNKL
<i>A. denitrificans</i> BC	HGNGSTTGFAAQSQEVDAHAAGLAAGGVTCEDPPGWRAGASGGPLYLAYLRDPAGNKL
	***** *****.*****:*****:*****. .:* ***** *
<i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	CLLHRPPKAA---
<i>A. denitrificans</i> BC	CLLHRPPKEAKPA
	***** *

Figura 23. Alineamiento entre las secuencias proteicas codificadas por el gen mutado en la clona 38 (cepa BQ1) y el gen Alide_4197 (*A. denitrificans* BC).

Al comparar el contexto de los genes mutados en el genoma de BQ1 y de *A. denitrificans* BC se observan ciertas diferencias interesantes. En *A. denitrificans*, el gen Alide_4197, que corresponde a la mutación en la clona 38, está inmediatamente precedido por un gen codificante de una DNA topoisomerasa III, sin embargo, en BQ1 existe una región de aproximadamente 3,000 nt entre estos genes. Interesantemente, en esta región se encuentran el gen mutado en la clona 9 y, contiguo a éste, el gen de la proteína con plegamiento α/β hidrolasa identificado previamente (figura 24). Al analizar el contexto genómico en otros organismos filogenéticamente cercanos no encontramos este tipo organización en ninguno de ellos. Este resultado indica que, en *Alicyclophilus* sp. BQ1, sucedió un rearrreglo génico en esa zona, ocasionado por la inserción de 3,000 nt, dentro de los cuales, existe al menos un gen relacionado con el crecimiento de la bacteria en PU, la proteína hipotética identificada en la mutante 9.

En la secuencia de la proteína codificada por el gen Alide_4197 en *A. denitrificans* BC, la región comprendida entre los aminoácidos 2 a 121 corresponde al dominio característico de la superfamilia de metaloenzimas de tipo VOC. Esta superfamilia está compuesta de proteínas relacionadas estructuralmente, con un par de motivos $\beta\alpha\beta\beta$, los cuales proporcionan un entorno de coordinación para el metal con dos o tres sitios abiertos o de fácil acceso, para promover así la participación electrofílica directa del ion metálico en la catálisis. Los diferentes tipos de reacciones catalizadas incluyen

isomerización (Glooxalasa I), epimerización (metilmalonil-CoA epimerasa), ruptura oxidativa de los enlaces C-C (estradiol dioxigenasa) y sustituciones nucleofílicas (proteínas de resistencia a fosfomicina) (Armstrong, 2000).

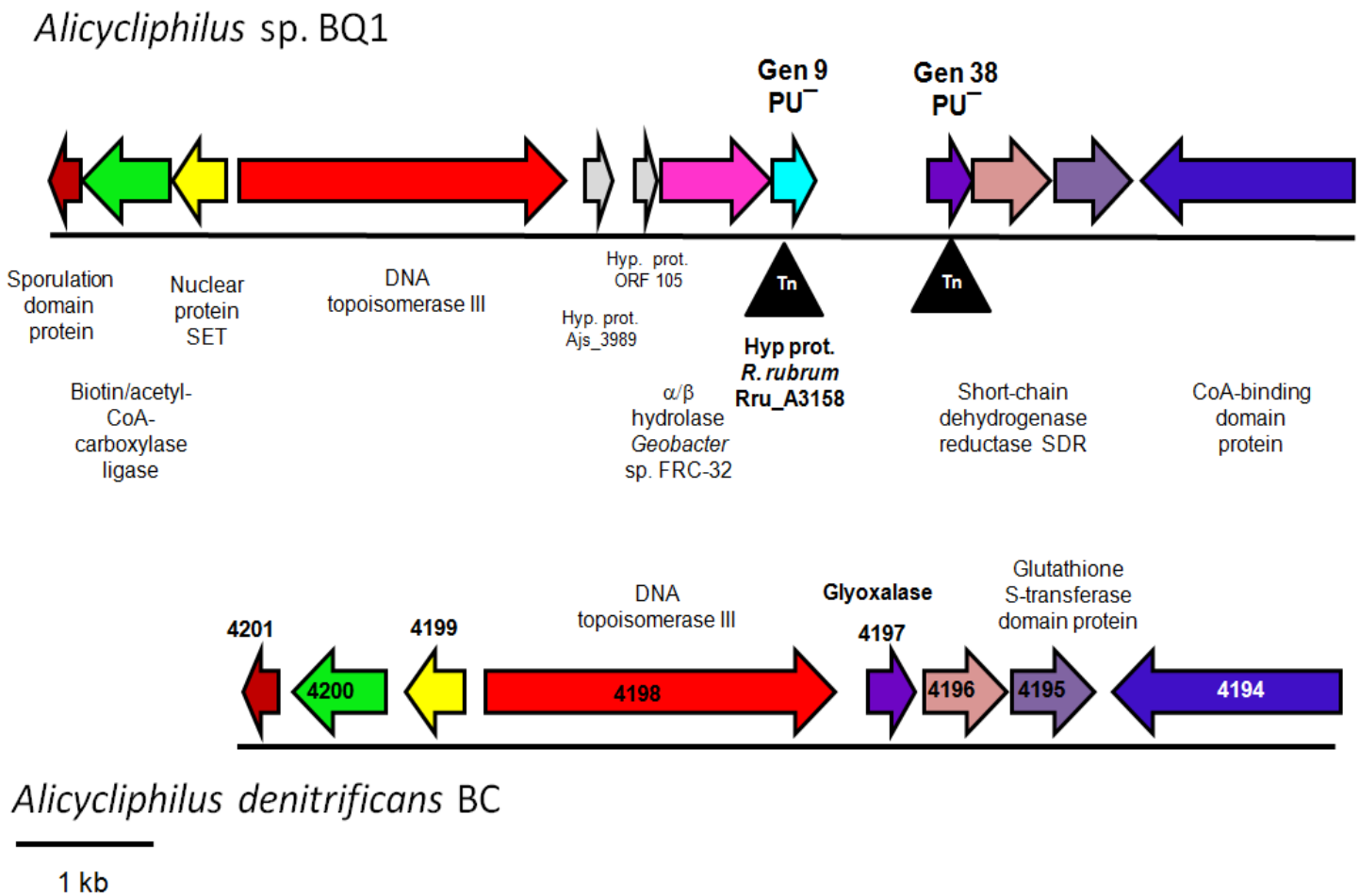


Figura 24. Comparación de los contextos genómicos en *Alicyclophilus* sp. BQ1 y *A. denitrificans* BC identificados para los genes mutados en las clonas 9 y 38. Ambos genes son cercanos en la cepa BQ1, sin embargo, el gen mutado en la clona 9 no se encontró dentro del genoma de *A. denitrificans* BC. Se indican los sitios de inserción del transposón *Himar1* para ambas clonas.

No conocemos con certeza el tipo de enzima ni el posible mecanismo utilizado por la proteína identificada en la mutante 38. Sin embargo, consideramos que una actividad glioxalasa tipo I sería la más probable, debido a que los resultados encontrados en el análisis BLASTx concuerdan con esta actividad y además, la presencia de un gen adyacente codificando una Glutación S- transferasa, la cual podría proveer glutatión reducido (GSH) necesario para la actividad de la glioxalasa. La enzima glioxalasa de tipo I forma parte del sistema glioxalasa presente en el citosol de las células. Este sistema cataliza la conversión de α -oxoaldehídos acíclicos reactivos a sus correspondientes α -hidroxiácidos. La glioxalasa I cataliza la isomerización del hemitioacetal, formado espontáneamente a partir de α -oxoaldehído y GSH, a derivados de 5-2-hidroxiacilglutatión y por lo tanto, disminuye la concentración de α -oxoaldehídos fisiológicos (metilglioxal y glioxal) y las reacciones de glucosilación asociadas (Thornalley, 2003). El metilglioxal es formado principalmente por la degradación de triosas fosfato y también durante el metabolismo de cuerpos cetónicos, degradación de treonina y fragmentación de proteínas glucosiladas. Mientras que el glioxal se forma por la peroxidación de lípidos y también por la fragmentación de proteínas glucosiladas (Thornalley, 2003). El metilglioxal tiene una alta actividad en reacciones de glicación *in vivo* formando AGEs (Advanced glycation end products) de proteínas, nucleótidos y probablemente también fosfolípidos básicos, los cuales están relacionados con envejecimiento celular y citotoxicidad. Por lo tanto, la participación de la glioxalasa I y, en general del sistema completo, sería muy importante al funcionar como un sistema de detoxificación de metilglioxal y sus derivados dentro de la célula (Thornalley, 2003).

Si bien es necesario conocer con más detalle la actividad de la proteína codificada en el gen de la mutante 38 antes de proponer un mecanismo relacionado con la degradación del PU, la información encontrada hasta el momento nos alienta a pensar que la cepa BQ1 podría utilizar un sistema que le permita desintoxicarse de los subproductos derivados del metabolismo de PU. Claro está, serán necesarios mucho más datos experimentales para lograr una idea más concreta.

6.6 Búsqueda del *PUase gene cluster* en el genoma parcial de *Alicyclophilus* sp. BQ1

Valiéndonos de la nueva información disponible, decidimos rastrear todos los genes que conforman el *PUase gene cluster*, relacionado con el crecimiento de *P. chlororaphis* en PU (Howard *et al.*, 2007), dentro del genoma de *A. denitrificans* BC y *Alicyclophilus* sp. BQ1 para conocer si en estos organismos existía algún sistema semejante. Utilizando la secuencia nucleotídica del cluster presente en *P. chlororaphis*, disponible en la base de datos (EF175556), buscamos en los genomas de ambas cepas. Sin embargo, en ningún caso se localizó alguno de los genes que integran este cluster y, por supuesto tampoco se identificó un arreglo génico similar. Por lo tanto, es probable que la capacidad de crecimiento de la cepa BQ1 en PU esté dada por un sistema distinto al encontrado en *P. chlororaphis*.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los genes mutantes se localizaron en tres nodos de la cepa BQ1, utilizando el genoma parcial de *Alicyclophilus* sp. BQ1, obtenido hace algunos meses. Por otro lado, basados en el genoma de *Alicyclophilus denitrificans* BC, liberado por completo en enero de este año, se identificaron las proteínas codificadas por los genes homólogos a las mutantes 5, 8 y 38. En el caso de la clona 9, el gen homólogo con mayor porcentaje de identidad se localizó en *R. rubrum*.

El gen mutado en la clona 5 tiene un tamaño 1,050 nt y codifica una proteína periplásmica de unión a sustrato, la cual forma parte de un transportador tipo ABC de sulfonatos; la mutación en la clona 8 afectó un gen con un tamaño de 1,983 nt, cuyo producto es una transglicosilasa lítica; mientras que el gen identificado en la mutante 9 tiene un tamaño de 417nt y codifica una proteína hipotética sin caracterizar; finalmente, el gen mutado en la clona 38 mide 390 nt y su producto es una proteína con un dominio perteneciente a la superfamilia de metaloproteínas VOC.

El papel que desempeñan estos genes en el metabolismo de la cepa BQ1 sobre PU no es claro aún. Diversas pruebas que permitan recopilar mayor información serán necesarias para lograr establecer una idea mucho más concreta.

Queda por demostrar si los genes identificados en la mutagénesis realmente participan en la actividad de *Alicyclophilus* sobre PU mediante la complementación de las mutantes. Para ello, el siguiente objetivo será la amplificación y clonación de los genes completos a partir de DNA genómico de *Alicyclophilus* sp. BQ1.

Por otro lado, será necesario determinar si los genes afectados en la mutagénesis participan en el metabolismo de PU de manera individual o forman parte de operones. Para ello, pretendemos mutar algunos de los genes contiguos a los ya identificados y, determinar así su posible participación en la actividad sobre PU mediante alteraciones en el crecimiento de la cepa BQ1 en MM-PUh.

Finalmente, se caracterizará los genes y las proteínas de nuestro interés para definir su participación en la capacidad de utilización de PU y plantear un mecanismo probable utilizado por *Alicyclophilus* sp. BQ1.

8. ANEXOS

8.1 Secuencias parciales de los genes afectados por la inserción del transposón Himar::Gm^R identificadas por el Dr. Jesús Campos y Nancy Barajas (IIQB-UMSNH)

Los insertos se encuentran clonados en el sitio *Pst*I del vector pBluescript. Todas las secuencias fueron obtenidas empleando el oligonucleótido marOUT, el cual está dirigido hacia el transposón y nos fueron enviadas en 2007.

Clona mutante 5

```

CCCGGCAGGGTTCACCCTGATGCCGAACCAGGGTCCATGCGGCACGATTGCTGCACTGCAACATGCGG
TGTTTCATTGGTGCTTTTCGAGGATGTCTCCCCTGTCTGTTACCCGTCGCCAGTTGGGCCGGCTTGGCA
TGGTGTCCGCCGCCCTGGGCATGCCTGCCCTGCTGCGCGCGCAGTCGCGCCCCGGGTGCCGCCATG
CCGGTGCGCATTGCCGTGGGTGGGCAGGCGGGGTTGTATTACCTGCCGCTCACGGTGCGCTGGAGCT
GGGGTTCTTCCGTGACGAGGGGCTGGACGTCCGGGTTCATGGACTATCCCGGTGGCGGGCTGGCGCTGC
TGGCGCTGCATGGGAGAGTGGCCGACGTGTGCTGCGGCGCGTTCGAGCATGTCGTGCGCCAGCAGTTG
CGCGGCGTGGCATAACCGCAGCCTGGCCGTGCTCGGGCGGGCGCCGAGCTGGCGCTGGTGGCGTCGGC
CCGCCATTGGCCGCTCAAGGACATTGCCGGCTTTCGCGGCCTGCGCGTGGGCGTGACGGCGCTGGATT
CGTCCACGCAGTTCCCTGGCGAGCCTGTGGCTGAACCAGTCGGGGGTGCCGCTCCGATGCGGTGCGCTT
CGTCGGCGTGGGCAGCGGCATGGAAGCGCTCACGGCGCTCCGGCAGGGGCGGGTGCATGCGCTGTGCC
ATTCCGACCCCTCATCACCATGCTGGAACA

```

Enmarcada en rosa la secuencia correspondiente al gen mutado (proteína de unión al sustrato de un transportador de sulfonatos tipo ABC). Resaltado en negritas el codón de inicio de la traducción.

Clona mutante 8

```

CCCATTTGTTGTCCAGCAGGCCCGCCGCGGCCCGGCGTCTCATGGCCATGCGCACCAGGGCCAGC
ACCACGAGTTCCTGCCGCTCCTTGCCCCGGGCGTGGCGCGGCCGGTGAGGTACTTGGTGGGGGAGTC
CAGCGCCTCGCGCAACTGCGCCAGGGCGTCGGGCGCGACGATCTCCACCGCCTTGCGCGCCATGCGCA
GGCGGTGGCCTCGGCAGCCAGGCGCGCCTTGCGCCACACGTCAGGGGCTTGATCTTCTGGCCGCC
AGCATCTCGGCGGCGGCGTGGAGCAGCCGTCGTCCAGGTCGCGCAACGCGTACCAGTTGCGCAGCAC
CTCGGCGCCGGCGTCTCGGCGGCCGTCCTTGATCTGGTCGATGGCGAGCGCGTAGCAGCGCACCT
CGCGGTCTCGCCCATGCGGTAGTACGGGTGCAGCTCGGCGAACTGGTCCCAGTCGCGGCGCTGGCCC
AGCAGCAGCAGCCAGTCGTTGCGCAGGCGGTCCTCCTGGTAGGTGCCGGCGAAGCGCTGCAGGCATGC
AAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATC
GCCTTGACAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGG
TATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCC
GACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAA
GCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAAGTTTTACCGTCATCACCGAACGCGCGAGACGA
AAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTAATGTCATGATAATAATGGTTC

```

Enmarcado en azul la secuencia correspondiente al gen mutado (transglicosilasa lítica).

En rojo se indica el sitio de restricción para la enzima *PstI*.

Clona mutante 9

```

GATAGTTTCTTGCTTCATTGAGGGTACGAATTCGTTAGAAATGCGCGTTCCTCGCTCTGCCCGAGCCCG
CGAAGTTGCGGGAATATGAACCACATCCAGTGGGTCTGCTTCTTTCCGGCAAGGATCTCTTCAATCGC
GTTGTCAAAGATGCCGTCCTGCGCTTTGACAAAACGGTCTAGATGGTTGGTCATAGGGCCTAACGTTT
AAGGTAAGGGGCGCGCCGCTTGCGGTGCGTCCCCTTGACCGAAATGTTATGCGTTGGTTGTAGCAGG
CGTCCCAATTCTGCAAAAAACTCGTTGCGATAAGACGCGCCATTAGCGTTCAAACGGTGGTCTGCGCT
GGGGTAGACACGGACGATGAGGTTATCCTTGCTGCTTCTTTGAACTTCGTTTCGAGGAAATTTACGG
ACTCGACCGGAACACTCTGATCTTGCTCACCAATGCCGATCAGAACGGGGATGTTCAATTTGAGAAGG
TCAGCAATTGGGTCGATGTCCATGATGTCGGTCCACCAGCGATAAGAGTTGCCGTACCAATTCCTTTC
GATACTGCGAGGATCAGCGGTAATTTCTCCAGCCCAGTTGACATCGAACTGTATAGCGCCCTTTT
GCCTGAGTGTGGCAAGTGATTTGCGCATGAGTAGCCGCGCTGCCGATAATTGCGAGATGGGTGATC
GCTGGAGACAGCCCGGCAACCTTGCTGCGGGCAACGCGCCTTCCGATACCAACCAAGACGACGTT
CTTCGGCTTGGGCGCAATGGAGCTTATTTGCGTGGCAATAAACTCCGAATAGTCGGCAACCCATTGAT
TTGGATTGTTTACTAGATGAAATTCGTGACCGCAGTCGAACAACCCGGTAGAACGGTCAGGTACAAAT
CGCTTGTGAGAACGAAAACGCGAGCATTGACCGTGAGGCCGCTGACGTAGCCAGGCATCACGG

```

Enmarcado en azul la secuencia correspondiente al gen mutado (proteína hipotética) y en verde la secuencia del gen contiguo (α/β hidrolasa). Resaltado en negritas el codón de inicio de la traducción.

Clona mutante 38

```

GACGGCAACAAGCTGTGCCTGCTGCACCGCCCGCCCAAGGCCGCCTGAGGAGCGTCCGCACATGC
AGCTGTCCGAACAATGGGTCTTGGTACGGGCGGTGCCCGGGGGCTGGGCCAGGCCATCACGCGC
GCCCTGGCGCGCGAGGGCGCAGGCGTCGTTCATCAACTACCACCGCAGCGAGGCCGGCGGCCCGCGG
CTCGTCGAGGAACTGGGCCCCGCGCGCCATCGCGCTGCAGTGCAGCACTTGGCGCAGGATCCACG
CTTTGCCACGGTAAAGGATCGTTGCAGCCACATGGATTTAGTGGACGGCACGCTGAGTGAAATCA
CCCCTGGCTACACGAAGGTGGGCCTGTTTCGAGCGTCTGATCCAAAACCGCGTGCCTTGCAGCGCCG
GTGCGCACGCTAGAGGAGGTGGTGAACGATCCGCATCTGCATGCGCGAGGCTCTTTGCAGTGGAT
TGACCATCCCAGTACGGTCGTATCGTGGTGCCTACCACGCCGCTGCGTTTTGGCGGCGAGGACG
CCGCTGTCCCCTATCAGCCCAGTGCAGCGCCTGGGGGAAGACACCGAGGCTATCTTGCAGCGAGCGG
CTGTGCTCAATGACGCACAAGTCGAGGCGTTACGCATGCGGCAGATCCTTTGAGCGAGGTGAAT
ATGAAAAATCTGGAAGGACGCGTGGCGCTAGTGAAGTGGCGCTGGCTCCGGCATCGGCCGGTCCGA
TGCCTTGGTACTGGCGGAGCGTGGCGCGACGGTATCGTCAATGACTTTGACCAGAAAGTGGCCG
GCGCGACTGTGGCGCAGATCGTGGGAGCAGGCGGCCCGCGCCGTGCCCTGCGTTGGGGACGTGGGC
GATGCGACGACTATCACCGAGGCCATAGATGCCGCGCGCCGGCAGGTCGGCGACATCGACATCTT
GGTTAAACAATGCAGGTATCTCCGGCCGTGAGCAGGAGTTTACGCCATTTCC

```

Enmarcado en turquesa la secuencia correspondiente al gen mutado (metaloenzima tipo VOC). En naranja la secuencia del gen identificado por el Dr. Campos (proteína tipo SDR) en el análisis previo a este trabajo. En rojo se indica el sitio de restricción para la enzima *PstI*.

8.2 Secuencias completas de los genes mutados identificadas en este trabajo

Los genes completos fueron identificados mediante el rastreo de las secuencias parciales para cada gen dentro del genoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1. Esto se realizó gracias a la colaboración del M. en C. Luis Lozano y del Dr. Miguel Ángel Cevallos (CCG-UNAM). La secuencia del genoma de la cepa BQ1 se obtuvo mediante la tecnología Illumina en la Unidad de Secuenciación Masiva del DNA, la cual se encuentra bajo la dirección del Dr. Enrique Morett (IBT-UNAM).

Mutante 5 (proteína de unión a sustrato de un transportador de sulfonatos tipo ABC)

Tamaño total: 1,050 nt, identificados en el nodo 424

```

ATGTCTCCCCTGTCTGTTACCCGTCGCCAGTTGGGCCGGCTTGGCATGGTGTCCGCCGCCGCCCTG
GGCATGCCTGCCCTGCTGCGCGCGCAGTCGCGCCCGGGTGCCGCCATGCCGGTGCGCATTGCCGTG
GGTGGGCAGGCGGGGTTGTATTACCTGCCGCTCACGGTGGCGCTGGAGCTGGGGTTCTTCCGTGAC
GAGGGGCTGGACGTCGGGGTCATGGACTATCCCGGTGGCGGGCTGGCGCTGCTGGCGCTGCATGGG
AGAGTGGCCGACGTGTGCTGCGGCGCGTTCGAGCATGTCGTGCGCCAGCAGTTGCGCGGCGTGGCA
TACCGCAGCCTGGCCGTGCTCGGGCGGGCGCCGCGAGCTGGCGCTGGTGGCGTCGGCCCCGCCATTGG
CCGCTCAAGGACATTGCCGGCTTTCGCGGCCTGCGCGTGGGCGTGACGGCGCTGGATTCTGTCCACG
CAGTTCCTGGCGAGCCTGTGGCTGAACCAGTCGGGGGTGCCGCTCGATGCCGGTGCCTTCGTCCGC
GTGGGCAGCGGCATGGAGGCGCTCACGGCGCTCCGGCAGGGGCGGGTGCATGCGCTGTGCCATTCTG
GACCCCTCATCACCATGCTGGAGCAGCGCGGCGAGGTGCGCCTGCTGGCCGACACGCGCACGCTC
AAGGGCACGGTCGAGATGTTTCGGCGGAGCGATGCCCGGCGCCTGCCTGTACGCGCCCCAGGACTAT
GTGCAGAACCATTTCGGCCGAGGTGCAGGCGCTCGTCAACGCCTTGGTGCATGCGCTCAAGTGGCTG
CAGACGGCCAGTCCCACCGATCTGGCGCGCGTGGTGCCCGCTCCTATCTTTTGGGCGACCGCGCG
CGCTACATGGCGGCCCTTCTACAAGGTGCGCGAGACCCTGTGCCCCGATGGCCTGATGCCGGAGGAC
GGCCCCGTGACGGCCATTTCGCGCCGTGGCGCGGCTGCAGCCGGAGTCGGCGGCGGCGCGGGTGGCG
CTGGACAAGACGTTTCAGCAACGATTGGGTGCGCAAGGCCAAGCAGAAATTCCAGCTCTGA

```

Mutante 8 (transglicosilasa lítica)

Tamaño total: 1,983 nt, identificados en el nodo 520

```

ATGCATTGGCTCAAGATTTTGACACCGCTGGTCGCGGGGGCCGCGCTGGCTGCCGCCGCGCCGTGGGCCGCGG
CCCAGAAATCGTGGCGACGATAACCTGCTGGAGATGCAGCAGGCCTTCCGCAAGGGAGACAAGTCAAGACTGAC
CGCGCTGCTGCCACCGTGC GCGGCCATGCGCTGGAACCCTGGGCCGCTACTGGGAGCTGCGCGCGCGGCTG
GACCAGGCCAGAGCGACGAGGTGAACGCCTTCCTGCAGCGCTTCGCCGGCACCTACCAGGAGGACCGCCTGC
GCAACGACTGGCTGCTGCTGGGCCAGCGCCGCGACTGGGACCAGTTGCGCGAGCTGCACCCGTA CTACCG
CATGGGCGACGACCGCGAGGTGCGCTGCTACGCGCTCGCCATCGACCAGATCAAGGGGACGGCCGCCGAGGAC
GCCGGCGCCGAGGTGCTGCGCAACTGGTACGCGTTGCGCGACCTGGACGACGGCTGCTCCAACGCCGCCGCCG
AGATGCTGGCGGCCAGGAAGATCAAGCCCTGGACGTGTGGCGCAAGGCGGCCTGGCTGCCGAGGCCAACCG
CCTGCGCATGGCGCGCAAGGCGGTGGAGATCGTCGCGCCCGACGCCCTGGCGCAGTTGCGCGAGGCGCTGGAC
TCCCCACCAAGTACCTCACCGGCCGCGCCACGGCCCGGGGCAAGGAGCGGCAGGAACTCGTGGTGCTGGCCC
TGGTGCGCATGGCCATGAGCGACGCCGCGCCGCGCGGGCCTGCTGGACAACAAATGGGGCGTACACCTCTC
GGCCGAGGAGCGCAACTGGCTCTGGGGCCTGATCGGCAAGCAGGCCGCGCTGTCGCTGTCGCCCGATGCGCTC
ACCTACTTCGGCAACGTGAGCCGCGACACCGACCTGAACGACGACATGCTGGCCTGGAAGGTGCGCGCCGCGC
TGCGCGCCCGCCAGTGGAAGCTGGTGGGCCGCGAGCATCGACGCCATGAGCGCCGCGCGCGCCAGGACAGCAC
CTGGGTGTACTGGAAGGCCCGCTCGCTCACCGCGGGGCGTGCCAGCGAGGAAGACCGCGCCGCGGCGCGCCAG
CTGTACGAGCGCATCGCCGGTACCTCGGGCTTCTACGAGCAGCTGGCGCTGGAGGAGCTGGGCGCGCGCTCA
CGCCCGCGCCCGCGCCCGTGC CGCTCACCGACGCGGAGAAGGCGCGGCGCGCCAACCCCGCCCTGAACCG
GGCGCTGTACGCCATCGCGCTGGGCCTGCGCAGCGAGGGCGTGCGCGAGTGGA ACTACACCACCAACCTGCAC
CAGCAGGGCGGCATGTCCGAACGCGACCTGCTGGCCGCGGCCGACCTGGCCTGCGAGCGGCAGGTGTGGGACC
GCTGCATCAACACCAGCGAGCGCACGCGGACGTGATCGACGTGGCGCAGCGCTTTC CATGCCGTACCAGAC
CACCGTGGTGCAGCGCGGAGGGGCATAGGCCCTGGACCCTGCCTACGTCTACGGCCCTGATCCGCCAGGAAAGC
CGCTTCATCATGGACGCGCGCTCGGGCGTCGGCGCATCGGGGCTGATGCAGGTCATGCCGGCCACGGCGCGCT
GGACGGCCCGCAAGATCGGCCTGACGGGCTTCACGCCCCAGCAGATCAACGACCGCGACACCAACATCACCAT
CGGCACGGCCTACCTCAAGCTGGCGCTGGACGACTTCGACGGCTCCATGCCCTGGCCGCCCGCCGCTACAAC
GCCGGCCAGGCCGCCCGCGCAACTGGCGCAACGGCCCGGTGCTGGACGCCGCCATCTGGGCCGAGAACGTGC
CCTTCAACGAGACGCGCGACTACGTCAAGAAGGTGCTGGCCAACACCGTGA ACTACGCCGCCATCCTGACCGG
CCAGCCGAGTCGCTCAAGAGCCGCTGGGCACCGTGGGCCCGCGGATGCGCGCGAGCCGGAGCCGAACAAG
GATCTCCCCTGA

```


Mutante 9 (proteína hipotética)

Tamaño total: 417 nt, identificados en el nodo 791

```
ATGACCAACCATCTAGACCGTTTTGTCAAAGCGCAGGACGGCATCTTTGACAACGCGATTGAAG
AGATCCTTGCCGGAAGAAGCAGACCCACTGGATGTGGTTCATATCCCGCAACTTCGCGGGCT
CGGGCAGAGCGAGAACGCGCATTTCTACGGAATTCGTACCCTCAATGAAGCAAGAACTATCTT
GCCATCCTATCCTGGGTCCAAGACTTAAACAGGCCACACAGAGTGTGATCGAGGCTAACGTTT
CGCCTCAGGAGATTTTCGGTGAATCGACTGCCAAAAGTTCGCTTCGTGCATGACGCTTTTCGG
CGAGGCGTCCCCGCCTGAATCTGTGTTCAACCAAGTGCTACGCACAATTTCCATTACTGATGAG
AGAACGATCACAATGCTCAGGAGAGAAGAATGA
```

Mutante 38 (metaloenzima tipo VOC)

Tamaño total: 390 nt, identificados en el nodo 791

```
ATGTTT CAGCCACGTCATGCTGGGAGCCAGCAACCTCGACAAATCCAGGAAGTTCTACGACGCC
TTCTCGGCACCCTGGGCTGCAAGCCGGGCTTCACCGACCCGAAGAACCGCACCTTCTGGCGCCA
CGCCGGCAACACCTTTTCCATCACCGCGCCCATCAACGGCGAGCCGGCCTGCCATGGCAACGGC
AGCACCATCGGCTTTGCGGCCAGTCGCCCCGAGCAGGCCGACGCCGCCATGCCGCTGGCGTGG
CGGCGGGCGGCGTGACCTGCGAGGACCCGCCGGATGGCGCGGGCGAGGGCGCGGGCCGCCTGTA
CCTGGCCTACCTGCGCGACCCCGACGGCAACAAGCTGTGCCTGCTGCACCGCCCGCCCAAGGCC
GCCTGA
```

8.3 Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
marOUT	5' CCGGGGACTTATCAGCCAACC 3'	50
UCP forward	5' GATTAAGTTGGGTAACGCCAG 3'	60
UCP reverse	5' GTGGAATTGTGAGCGGATAAC 3'	60
M13 forward	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	60
M13 reverse	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'	60
8-1 forward (sonda 8)	5' CCCATTTGTTGTCCAGCAGGC 3'	66
8-1 reverse (sonda 8)	5' TGCAGCGCTTCGCCGGCA 3'	66
9-1 forward (sonda 9)	5' AGTTTCTTGCTTCATTGAGGG 3'	60
9-1 reverse (sonda 9)	5' TGCCTGGCTACGTCAGCG 3'	60
38-1 forward (sonda38)	5'GACGGCAACAAGCTGTGCC 3'	62
38-1 reverse (sonda 38)	5' ATGGCGTCAAACCTCCTGCTG 3'	62

8.4 Cepas y plásmidos empleados

***Alicyclophilus* sp. BQ1**

Cepa aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, capaz de crecer en MM-PUh (Oceguera, 2005).

***Alicyclophilus* sp. BQ1 PU⁻**

Mutantes 5, 8, 9 y 38 obtenidas por transposición BQ1Sm^R::*Himar1*:Gm^R (Barajas, 2008).

***Escherichia coli* TOP10/pBS 8, 9 y 38**

Cepa transformada con el vector pBluescript, el cual contiene los fragmentos de genes afectados por la inserción del transposón *Himar1* en el cromosoma de *Alicyclophilus* sp. BQ1

***Escherichia coli* Dh5 α**

supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA

Cepa recombinante que puede ser transformada con plásmidos y los cósmidos *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA*. La mutación (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) permite realizar a-complementación con el amino terminal de la β -galactosidasa en los vectores pUC (Hanahan 1983).

pBluescript KS

Vector de clonación con marcador de selección Amp^R

8.5 Medios de cultivo

Medio mínimo poliuretano (MM-PUh)

(Basado en el medio empleado por Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Composición por litro.

Solución A (10X)

KH_2PO_4 20.0 g

K_2HPO_4 70.0 g

Solución B (100X)

NH_4NO_3 100.0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g

Solución de elementos traza (1000X)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g

$\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g

Nota: omitir el NH_4NO_3 si se prueba PU como única fuente de nitrógeno.

Solución de Hydroform 10X

El Hydroform es un barniz comercial soluble en agua producido por Polyform[®] de México y tiene una concentración de sólidos al 30%, por lo que debe diluirse 1:10 con agua desionizada para obtener una concentración de 0.3%.

Preparación

1. Preparar las soluciones A y B y esterilizar en autoclave a 120°C/15 minutos.

2. Preparar las soluciones de elementos traza y de Hydroform 10X, esterilizar por filtración utilizando membranas con un tamaño de poro de 0.22 y 0.45 μm respectivamente (Millipore).
3. En condiciones asépticas, adicionar a 800 ml de agua estéril 100 ml de solución A, 10 ml de solución B, 1 ml de solución de elementos traza y 100 ml de solución de Hydroform, llevar a volumen final de un litro.
4. Por último, si se preparan placas de agar MM-PUh esterilizar el agua con el equivalente a 1.5 % de concentración final de agar.

Medio Luria-Bertani (LB). Composición por litro

Peptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Agar	16.0 g

Preparación

1. Disolver todos los componente en el orden que se indica en 700 ml de agua desionizada. Cuando la solución esté totalmente cristalina aforar hasta un volumen final de un litro. Ajustar a pH 7. Cuando se preparen placas de LB sólido, el agar se agrega en el volumen final aforado.
2. Esterilizar por autoclave 120°C/15 minutos
3. Las placas de LB sólido se preparan vertiendo el medio ya estéril y caliente sobre cajas petri estériles desechables. Se deja enfriar y solidificar el medio por 20-30 minutos. Este procedimiento se realiza en condiciones de asepsia. Tapar las cajas cuando el medio esté totalmente solidificado y frío.
4. Mantener en refrigeración

Nota: El medio LB convencional fue modificado ya que se adicionó el doble de sal para reducir la probabilidad de contaminación ambiental.

Medio SOC. Composición por litro

Triptona 20.0 g

Extracto de levadura 5.0 g

NaCl 0.5 g

Preparación

1. Disolver en 950 ml de agua desionizada todos los componentes.
2. Añadir 10 ml de solución de KCl 250 mM. Ajustar pH a 7.0 con NaOH 5N y esterilizar por autoclave 120°C/20 minutos.
3. Antes de utilizarla, añadir 5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2M (esterilizada también por autoclave 120°C/20 minutos) y 20 ml de una solución de glucosa 1M (esterilizada por filtración utilizando un poro de 0.22 µm).
4. Finalmente, ajustar el volumen final a 1L con agua desionizada estéril.

8.6 Soluciones y reactivos

8.6.1 Cultivo de cepas

Antibióticos

Los antibióticos empleados como marcadores de selección fueron Gentamicina (Gm), Estreptomycin (Sm) y Ampicilina (Amp). Las soluciones stock para cada antibiótico fueron preparadas a una concentración de 50 mg/ml (Gm) y 100mg/ml (Sm y Amp) en agua desionizada. Todas fueron esterilizadas por filtración (poro 0.22 μ m) y almacenadas a -20°C.

IPTG y X-gal

Los cultivos sólidos de LB fueron suplementados con IPTG y X-gal cuando el sistema de α -complementación se utilizó para diferenciar colonias de E. coli DH5 α conteniendo los plásmidos recombinantes (Maniatis *et al.*,2001).

IPTG (Isopropiltio- β -D-galactósido) 20% p/v, 0.8 M

Disolver 2g de IPTG en 8 ml de agua destilada, ajustar la solución a un volumen final con agua destilada y esterilizar a través de un filtro de 0.22 μ m. Dispensar en alícuotas de 1 ml y almacenar a -20°C.

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-idolis- β -D-galactósido) 2% p/v

Disolver X-gal en dimetilformamida a una concentración de 20 mg/ml. Proteger el tubo de la luz con papel aluminio y almacenar a -20°C. No es necesario esterilizar.

Para preparar las placas con IPTG y X-gal:

1. Colocar en el centro de la placa, la cual contiene el apropiado antibiótico, 40 μ l de x-gal (2%) y 7 μ l de IPTG (20%) y distribuir con una varilla en "L" estéril. Incubar a

37°C hasta que el líquido se haya absorbido completamente. Esto toma 3.-4 h en placas recién preparadas.

2. Posteriormente, inocular la placa con 100 ml de la suspensión bacteriana e incubar a 37°C por 12-19 h.
3. Terminada la incubación, guardar las placas por algunas horas en refrigeración para identificar las colonias con el plásmido recombinantes (blancas).

8.6.2 Aislamiento de DNA genómico

Solución amortiguadora TES

Tris-HCl 10 mM pH= 8.0 1 ml

EDTA 10 mM 2 ml

SDS 1% 10 ml

Colocar las tres soluciones en agua desionizada y aforar a un volumen final de 100 ml.

Tris-HCl 10 mM pH= 8.0

Disolver 121g de Tris base en 800 ml de agua desionizada, ajustar al pH deseado con HCl concentrado. Agitar y aforar a 1L con agua desionizada. Conservar a temperatura ambiente.

CTAB/NaCl (10% de CTAB en NaCl 0.7 M)

Disolver 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua desionizada y agregar lentamente 10 g de CTAB con agitación y calentamiento constante de la solución. Una vez disuelto totalmente el CTAB, ajustar a un volumen final de 100 ml.

Solución de Lisozima (20µg/µl)

1. Preparar una solución Stock de lisozima a una concentración de 50 mg/ml en agua desionizada.

Después de agregar las soluciones llevar a un volumen final de un litro y pH = 8.0.

Solución amortiguadora de carga para geles de agarosa 6X

Azul de bromofenol 0.25% p/v

Xilencianol 0.25% p/v

Glicerol en agua 30.0 % v/v

Preparar la solución de glicerol con agua desionizada estéril y disolver en ella lo necesario de cada colorante. Mezclar bien la solución y mantener en refrigeración a 4°C.

8.6.4 Transferencia de DNA

SSC 20X

Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua desionizada. Ajustar el pH = 7.0 con algunas gotas de una solución de HCl (14N). Ajustar a un volumen final de un litro. Dispensar en alícuotas y esterilizar por autoclave 120°C/15 minutos. Concentración final NaCl (3.0 M) y citrato de sodio (0.3 M).

Solución de desnaturalización

Disolver en 500 ml de agua desionizada 43.87 g de NaCl y 10g de NaOH.

Solución de neutralización. Composición por 100 ml

NaCl (5 M) 30.0 ml

Tris-HCl (1M, pH=7.2) 50.0 ml

Solución de EDTA 0.5 M 0.2 ml

Ajustar a un volumen final de 100 ml.

Solución para fijación de DNA

Preparar una solución de NaOH 0.4M

8.6.5 Hibridación tipo Southern/ hibridación en colonia**Solución de prehibridación/hibridación**

Solución de fosfato de sodio 0.5 M, pH 7.2

Solución de EDTA 1 mM, pH 8.0

Solución de SDS 7% p/v

Solución de albúmina sérica bovina (BSA) 1% p/v

Preparar la solución de acuerdo con las concentraciones finales indicadas para cada componente. Usar BSA grado electroforesis. No es necesario el uso de agentes bloqueadores para este tipo de hibridación.

La solución de hibridación es idéntica pero con las sondas marcadas y desnaturalizadas ya añadidas.

Solución de lavado 1

SSC 2X/ SDS 0.5%

Solución de lavado 2

SSC 2X/ SDS 0.1%

Solución de lavado 3

SSC 0.1X/SDS 0.1%

8.6.6 Purificación de DNA plasmídico (método convencional).

Solución de resuspensión. Composición por 100 ml

Solución de Glucosa 2M	2.5 ml
------------------------	--------

Solución de Tris-HCl (pH=8, 0.25 M	2.0 ml
------------------------------------	--------

Solución de EDTA (pH=8, 0.5 M) 10.0 ml

Solución de lisis. Composición por 150 ml

Solución de NaOH 5M 60.0 ml

Solución de SDS 10% 15.0 ml

Solución de neutralización. Composición por 100 ml

Solución de acetato de potasio 5M 60.0 ml

Solución de ácido acético glacial 11.5 ml

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akutsu Y., T. Nakajima-kambe, N. Nomura y T. Nakahara. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl Environ Microbiol.* 64:62-67.
2. Akutsu Y., T. Nakajima-Kambe, N. Nomura y T. Nakahara. 1999. Purification and properties of culture -broth- secreted esterasa from the polyurethane degrader *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Biosci Bioeng.* 88:484-487.
3. Akutsu Y., Y. Adachi, C. Yamada, K. Toyoshima, N. Nomura, H. Uchiyama y T. Nakajima-Kambe. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70: 422–429
4. Allen A., N. Hilliard y G. T. Howard. 1999. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *Int. Biodet. Biodegr.* 43:37-41.
5. Angkawidjaja C. y S. Kanaya. 2006. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2804–2817.
6. ANIQ (Asociación Nacional de la Industria Química, AC). 2001. Anuario estadístico de la industria química mexicana.
7. Armstrong N. 2000. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry.* 39:13625-13632.
8. Ausubel F.M., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl. 1994. *Current protocols in molecular biology.* New York. John Wiley & Sons. 12-19.
9. Barajas-García N. 2008. Identificación de genes involucrados en la asimilación de poliuretano (Hydroform) en *Comamonas testosteroni* CBQ1. Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH.
10. Baur X., W. Marek, J. Ammon, A. B. Czuppon, B. Marczynski, M. Raulf-Heimsoth, H. Roemmelt y G. Fruhmann. 1994. Respiratory and other hazards of isocyanates. *Int Arch Occup Environ Health.* 66:141-152

11. Blackburn N. T. y Clarke A. J. 2002. Characterization of Soluble and Membrane-Bound Family 3 Lytic Transglycosylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 41:1001-1013.
12. Boutin M. 2004. Identification of the isocyanates generated during the thermal degradation of a polyurethane car paint. *J Anal Appl Pyrolysis*. 71:791-802.
13. Boss W., J.M. Lucht, F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger. 1996. Periplasmic-binding protein dependent ABC transporters in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and molecular biology*. 2da edición. ASM Press. Washington. 1175-1209.
14. Carrillo-García A. 2004. Identificación de una esterasa extracelular cuya actividad está relacionada con el crecimiento de *Acinetobacter sp.* en poliuretano. Tesis de maestría Facultad de Química, UNAM.
15. Casarrubias-Ríos D. 2010. Construcción de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus sp.* Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
16. Cortón E. y A. Viale. 2006. Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Ecosistemas*. 2006/3 (URL:<http://www.revistaecosistemas.net>)
17. Darby R.T. y A.M. Kaplan. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl Microbiol*. 16:900-905.
18. Eichhorn E., J.R. Van der Ploeg. y T. Leisinger. 2000. Deletion analysis of the *Escherichia coli* turine and alkanesulfonate transport systems. *J Bacteriol*. 182: 2687-2695.
19. Höltje J. V. 1996. A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* 142:1911–1918.
20. Höltje J. V. y C. Heidrich. 2001. Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* 83:103-108.
21. Höltje J. V., D. Mirelman, N. Sharon y U. Schwarz. 1975. Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 124:1067–1076.
22. Howard G. T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 49:245–252

23. Howard G.T. y R.C. Blake. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int. Biodetrior. Biodeg.* 42:213-220.
24. Howard G.T., C. Ruiz y N.P. Hilliard. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *Int. Biodetrior. Biodeg.* 43:7-12.
25. Howard G.T., B. Crother y J. Vicknair. 2001. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodetrior Biodeg.* 47:141-149.
26. Howard G.T., R.I. Mackie, I.K.O. Cann, S. Ohene-Adjei, K.S. Aboudehen, B.G. Duos y G.W. Childers. 2007. Effect of insertional mutations in the *pueA* and *pueB* genes encoding two polyurethanases in *Pseudomonas chlororaphis* contained whith a gene cluster. *J Appl Microbiol.* 103:2074–2083.
27. Instituto Nacional de Recicladores, AC (Inare). 2000. Comunicación personal
28. Jones P.M., M.L. O'Mara y A.M. George. 2007. ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences.* 34: 520-531.
29. Kay M.J., R.W. McAcabe y L.G.H. Morton. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int. Biodet. Biodeg.* 31:209-225.
30. Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:135-175.
31. Kertesz M.A. 2000. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* 152:279-290.
32. Koraimann G. 2003. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2371–2388
33. Magdalena C. 2000. Reciclaje: Espumas de Poliuretano. *Isopa Recycling Technical Papers.*
34. Mechichi T., E. Stackebrandt y G. Fuchs. 2003. *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing β -proteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:147-152.

35. Morton L.H.G. y S.B. Surman. 1994. Biofilms in biodeterioration-a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 32:203-221.
36. Nair S. y P. Kumar. 2007. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane. *World J. Microbiol. Biotechnol* 23:1441-1449.
37. Nakajima-Kambe T., F. Onuma, N. Kimpara y T. Nakahara. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS*. 129:39-42.
38. Nakajima-Kambe T., F. Onuma, Y. Akutsu y T. Nakajara. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *J Ferment Bioeng*. 83:456-460.
39. Nakajima-Kambe T., Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, F. Onuma y T. Nakahara. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Minireview Appl Microbiol Biotech*. 51:134-140.
40. Nomura N., Y. Akutsu, T. Nakajima-Kambe y T. Nakahara. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterasa of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Ferment Bioeng*. 86:339-345.
41. Oceguera-Cervantes, A. 2005. Aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio con poliuretano (Hydroform) como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
42. Oceguera, C. A., A. Carrillo G., N. López, N. Bolaños S., M.J. Cruz G., C. Wachter y H. Loza-Tavera. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus sp.* Strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol*. 73:6214 - 6223.
43. Quadroni M., P. James, P. Dainese-Hatt and M.A. Kertesz. 1999. Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcriptase-PCR for characterization of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Eur J Biochem*. 266:986-996.

44. Reznikoff, W.S. y K.M. Winterberg. 2005. Transposon-based strategies for the identification of essential bacterial genes. *Meth in Mol Biol.* 416:13-26.
45. Rowe L. y G.T. Howard. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodetrior Biodeg.* 50:33-40.
46. Ruiz C. y G.T. Howard. 1999. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (*pudA*) from *Pseudomonas fluorescens*. *Int Biodetrior Biodeg.* 44:127-131.
47. Sambrook J. y Russell D.W. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volumen 1, 2 y 3.
48. Sanchez-Tafolla J.L. 2010. Purificación y caracterización de una enzima de tipo esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
49. Solís-González C.J. 2008. Caracterización del crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ5 en poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
50. Stern R.V. y G.T. Howard 2000. The polyester polyurethanase gene (*pudA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol Lett.* 185:163-168.
51. Thornalley, P.J. 2003. Glyoxalase I - structure, function and critical role in the enzymatic defense against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1343-1348.
52. Vega R. E., T. Main y G.T. Howard. 2002. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. *Int Biodeg Biodet.* 43:49-50.
53. Wong, S.M. y J.J. Mekalanos. 2000. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 97:10191-10196.