



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Caracterización de mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 incapaces de crecer en poliéster-poliol, aproximación al conocimiento de la biodegradación del poliéster poliuretano

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Karen Beatriz Valencia González**

**TUTORA PRINCIPAL:** DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM  
**COMITÉ TUTORAL:** DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

MARZO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/129/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wences  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de octubre de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Biología Experimental del (la) alumno(a) VALENCIA GONZÁLEZ KAREN BEATRIZ con número de cuenta 304254826 con la tesis titulada "Caracterización de mutantes de *Alicyclophorus* sp. BQ1 incapaces de crecer en poliéster-poliol, aproximación al conocimiento de la biodegradación del poliéster poliuretano", realizada bajo la dirección del (la) DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA:

Presidente: DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN FLOJERRO  
Secretario: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA  
Suplente: DR. IVÁN MORENO ANDRADE  
Suplente: DRA. ELIDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de febrero de 2018

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MMVA/ASR/gr\*



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Caracterización de mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 incapaces de crecer en poliéster-poliol, aproximación al conocimiento de la biodegradación del poliéster poliuretano

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Karen Beatriz Valencia González**

**TUTORA PRINCIPAL:** DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM  
**COMITÉ TUTORAL:** DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

MARZO, 2018

## **Agradecimientos institucionales**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al financiamiento de los proyectos DGAPA-PAPIIT-UNAM IN222811, IN217114 e IN223317.

A CONACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias Biológicas durante el periodo comprendido de agosto 2013 a julio 2015.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en este proyecto. Por hacerme crecer personalmente y brindarme su apoyo siempre.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Laura Camarena Mejía y la Dra. Guadalupe Espín Ocampo por sus sugerencias al trabajo a lo largo de toda la maestría.

Al Dr. Luis Lozano por su ayuda en la búsqueda de secuencias en el genoma de BQ1.

Finalmente al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, en cuyas instalaciones realicé este trabajo de investigación.

## **Agradecimientos personales**

A mi familia, que sufrió y disfrutó conmigo todo este trayecto. Me siento afortunada de tenerlos conmigo. Siempre aprendo algo nuevo con ustedes, me reinvento, crezco. Hacen que los momentos difíciles sean más fáciles de llevar. Todos me han apoyado de una u otra forma. Los quiero mucho.

Al Dr. Martín Vargas por compartir sus conocimientos y orientarme en el manejo y ubicación del equipo de laboratorio. Sus observaciones y su paciencia me ayudaron muchísimas veces. Siempre un excelente compañero dispuesto a ayudar.

A la M. en C. Julieta Solís, mi vecina de mesa, mi maestra, mi guía. Sus comentarios siempre me hacían cuestionarme nuevas cosas y querer saber más. Gracias por soportar que tomara tus cosas prestadas y luego no las devolviera a su lugar. Me enseñaste muchas técnicas, me diste muchos consejos y me regañaste cuando era necesario; siempre me diste el empujón que necesitaba y me brindaste tu amistad.

Al M. en C. Daniel Ochoa, quien hizo a la par conmigo varias técnicas y me demostró que trabajar en equipo puede ser divertido. Gracias por toda tu ayuda en el desarrollo de las técnicas que compartimos y por tu ayuda en el despeje de dudas en cualquier momento, literalmente. Te ganaste un lugar en lista de personas favoritas.

A mis otros compañeros de laboratorio, Lili, Alba, Joyce, Ricardo, Vianey, Jackie, con quienes reí muchísimos, aprendí, lloré, grité... definitivamente sin ustedes el laboratorio no habría sido lo que fue.

A Paula Ray y Toño, quienes aún en la distancia siempre han sido un apoyo incondicional para mí. No habría llegado hasta aquí sin todas las pláticas eternas que tuvimos.

Finalmente, a Israel, quien entró a mi vida al final de este proceso, y por lo tanto le tocó lo más pesado para mí, gracias por desvelarte conmigo, por ponerme tu hombro

en los malos momentos y soportarme en los peores. Gracias por compartir conmigo esta nueva etapa.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, por formarme como la persona que soy. Por enseñarme que no importa cuántas veces me caiga, siempre tengo que levantarme con la frente en alto. Por mostrarme que existe otra manera de hacer las cosas, que siempre puede haber una mejor forma. Porque pese a nuestras diferencias nuestro amor no decrece, al contrario, se fortalece. Por enseñarme a luchar por lo que quiero y por apoyarme en todos y cada uno de mis proyectos, por más alocados que sean. Por tantos fines de semana juntas dentro del laboratorio, nunca me dejaste ni me dejarás sola, ni yo a ti. A ti te dedico este logro.



## Contenido

Abreviaturas .....	10
1. Abstract.....	13
2. Introducción.....	15
3. Antecedentes.....	20
4. Hipótesis y Objetivos .....	23
4.1. Hipótesis .....	23
4.2 Objetivo general .....	23
4.3 Objetivos particulares.....	23
5. Estrategia experimental .....	24
6. Metodología .....	25
6.1. Cultivos .....	25
6.2. Mutagénesis aleatoria por transposición.....	25
6.2.1 Conjugación.....	25
6.2.2. Escrutinio de las clonas en Rymapol <sup>®</sup> (MM-pp).....	26
6.2.3. Caracterización de las mutantes.....	27
6.3. Confirmación de una sola inserción del transposón en el genoma de BQ1 mediante Southern blot .....	28
6.3.1. Preparación y marcaje de la sonda.....	28
6.3.2. Extracción y digestión del DNA genómico (gDNA) de <i>Alicyclophlus</i> sp. BQ1 .....	29
6.3.3. Resolución del gDNA digerido en gel de agarosa y desnaturalización .....	30
6.3.4. Transferencia de DNA a membrana de nylon (Southern blot).....	31
6.3.5. Prehibridación e hibridación .....	32
6.4. Identificación del sitio de inserción del transposón mediante clonación en pBlueScript .....	32
6.4.1. Preparación de células competentes .....	33
6.4.1.1. Cepa <i>E. coli</i> S-17.....	33
6.4.1.2. Cepa <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	33
6.4.2. Ligación del vector con el gDNA y clonación .....	34
6.4.2.1 <i>Transformación de células competentes</i> .....	34
6.4.2.2. <i>Purificación por lisis alcalina del plásmido con el fragmento clonado</i> .....	35
6.4.2.3 <i>Secuenciación de las muestras</i> .....	36
6.5. Análisis bioinformático.....	36
6.6. RT-PCR.....	37
6.6.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	37
6.7. Complementación .....	40
6.7.1. Amplificación y purificación de las secuencias de los genes mutados .....	40
6.7.2. Conjugación.....	42
6.7.3. Ensayos para verificar la recuperación del fenotipo silvestre. ....	43
7. Resultados y Discusión .....	44

7.1. Generación y selección de mutantes de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 incapaces de crecer en el poliéster polioliol Rymsapol® .....	44
7.2 Confirmación de una única inserción del miniTn5 en el gDNA de las mutantes .....	46
7.3. Identificación del sitio de inserción del transposón en cada mutante .....	47
7.4 Análisis del contexto genómico de las mutantes .....	48
7.5 Análisis de la DAHP sintasa mutada en <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 .....	51
7.6. Análisis de la Corismato mutasa presente en <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 .....	56
7.7. Análisis del regulador transcripcional tipo AsnC presente en <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 .....	62
7.8. Determinación de las unidades transcripcionales de los genes mutados	67
7.9. Ensayos para evaluar la recuperación del fenotipo de las mutantes .....	73
8. Conclusiones .....	80
9. Perspectivas .....	82
Bibliografía .....	83
Anexos .....	89

## Abreviaturas

<b>aa</b>	aminoácidos
<b>BrEt</b>	Bromuro de etidio
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Deoxinucleótido trifosfato
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>IGPS</b>	Indol-3-glicerol fosfato sintasa
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>MM</b>	Medio mínimo
<b>MM-Malato</b>	Medio mínimo con malato
<b>MM-NMP</b>	Medio mínimo con NMP
<b>MM-Poly Lack</b>	Medio mínimo con Poly Lack
<b>MM-pp</b>	Medio mínimo con poliéster polioliol (Rymsapol <sup>®</sup> 200/107, L-38 polioliol)
<b>MM-pp2</b>	Medio mínimo con poliéster polioliol ((Rymsapol <sup>®</sup> ))
<b>MM-PUh</b>	Medio mínimo con PU Hydroform <sup>®</sup>
<b>Nal</b>	Ácido nalidixico
<b>NMP</b>	N-metil-2-pirrolidona
<b>ON</b>	Cultivo celular durante toda la noche (overnight)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE-PU</b>	Poliuretano de tipo poliéter
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PS-PU</b>	Poliuretano de tipo poliéster
<b>PU</b>	Poliuretano
<b>p/v</b>	Relación entre el peso del soluto y el volumen de la solución.
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>RT-PCR</b>	PCR a partir de cDNA
<b>Sm</b>	Estreptomina
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TDI</b>	Diisocianato de tolueno
<b>TE</b>	Tris-ácido etilendiaminotetraacético

## 1. Resumen

Los poliuretanos (PU) son plásticos ampliamente utilizados como materias primas en diversas industrias, pero al igual que la mayoría de los otros plásticos, son resistentes a la biodegradación. Se sintetizan a partir de polioles y diisocianatos que determinan sus características. Varios hongos y bacterias capaces de atacar PU de tipo poliéster (PS) han sido aislados y algunas enzimas hidrolíticas de tipo esterasa involucradas en su degradación han sido identificadas. Sin embargo, la vía para la biodegradación de PU es desconocida y no hay suficiente información sobre los genes implicados en este proceso. Puesto que los PU son polímeros grandes y complejos, además de las esterases, muchas otras enzimas deben estar implicadas en su degradación. En nuestro laboratorio, se estudian microorganismos aislados del ambiente, con capacidad de crecer en medios con barnices de PU como única fuente de carbono; uno de ellos es la  $\beta$ -proteobacteria *Alicyclophilus* sp. BQ1. Para descubrir algunos de los genes implicados en la degradación de PS-PU en esta bacteria, se empleó el transposón miniTn5 para generar una biblioteca de mutantes y se seleccionaron aquellas que no fueran capaces de crecer en el poliéster-poliol Rymsapol<sup>®</sup>. Las mutantes auxótrofas se descartaron debido a su incapacidad para crecer en malato. Cuatro mutantes fueron obtenidas, confirmando por Southern blot una única inserción del transposón en el genoma de cada una de ellas. Se identificaron los genes afectados por el transposón digiriendo y clonando el DNA de cada una de las mutantes en pBS, seleccionando por la resistencia a Km<sup>30</sup> presente en el transposón, seguida de secuenciación empleando un oligonucleótido dirigido al transposón. Las cuatro mutantes fueron afectadas en genes que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo y la regulación de aminoácidos: la mutante H.I.20 resultó afectada en el gen que codifica un regulador de la transcripción tipo AsnC, el cual se ha sugerido que regula la expresión de los genes *dadA* (D-aa deshidrogenasa) y *dadX* (alanina racemasa) que participan en la síntesis y regulación de D-aminoácidos; la mutante E.III.100 fue afectada en el gen que codifica a la 3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato sintasa (EC 4.1.2.15), que cataliza el primero de los siete pasos en la ruta del shikimato cuyo producto final es corismato; y las mutantes D.IV.28 y J.XII.10 fueron afectadas en el gen que

codifica a la corismato mutasa/prefenato deshidratasa (EC 5.4.99.5), enzima bifuncional que actúa sobre el corismato para producir prefenato y luego sobre el prefenato para producir fenilpiruvato que es el precursor de la L-fenilalanina. Todas las mutantes fueron complementadas con sus genes silvestres recobrando la capacidad de crecer en poliéster poliol. También se realizaron análisis de RT-PCR para determinar si estos genes estaban organizados en operones. El papel de estas enzimas en la degradación de los polioles no está claro, pero el hecho de que dos de las mutantes fueron afectadas en el mismo gen y presentaron el mismo fenotipo sugiere fuertemente que la corismato mutasa/prefenato deshidratasa debe desempeñar un papel importante en la capacidad de *Alicyclophilus* sp. BQ1 para degradar el poliéster poliol.

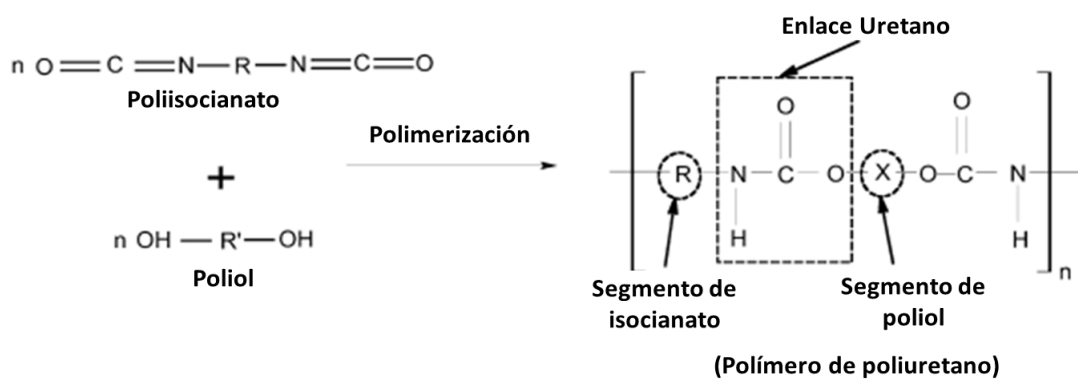
## 1. Abstract

Polyurethanes (PU) are plastics widely used as raw materials in various industries and like some other plastics they are resistant to biodegradation. They are synthesized from polyols and diisocyanates, which determine their characteristics. Several fungi and bacteria able to attack polyester (PS)-PU has been isolated and some hydrolytic enzymes acting in its biodegradation; such as esterases, have been identified. However, the pathway for PU biodegradation is unknown. Since PU are large and complex polymers, not only esterases, but also many others enzymes must be involved in its biodegradation. In our laboratory, environmental microorganisms able to grow in mineral media with PU varnishes as the only carbon source have been isolated; one of them is the  $\beta$ -proteobacteria *Alicyclophilus* sp. BQ1. As a strategy to discover some genes involved in PS-PU degradation in this bacteria, a miniTn5 transposon mutant library was generated, and mutants unable to grow in the poliéster-poliol Rymsapol<sup>®</sup> were selected. Auxotrophic mutants were discarded because of their inability to grow in malate. Four mutants were obtained, and a unique insertion of the miniTn5 in the genome of each mutant was confirmed by Southern blot. The transposon affected genes were identified by digesting and cloning the DNA of each mutant in pBS, selecting by Km<sup>30</sup> resistance, and sequencing by using a primer that targets the transposon. The four mutants were in genes encoding enzymes related to amino acid metabolism and regulation: mutant H.I.20 encodes a transcription regulator type AsnC-like protein that has been suggested to regulate the expression of *dadA* (D-aa dehydrogenase) and *dadX* (alanine racemase), which transform L- amino acid into D-amino acid for synthesis of cell walls; mutant E.III.100 encodes 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (EC 4.1.2.15), which catalyzes the first of seven steps in the shikimate pathway that produces chorismate; and the mutants D.IV.28 and J.XII.10 were affected in a gene coding a chorismate mutase/prephenate dehydratase (EC 5.4.99.5), a bifunctional enzyme that acts on chorismate to produce prephenate and then on prephenate to produce phenylpyruvate which is the precursor of L-phenylalanine. All the mutants were complemented and recovered their ability to grow in polyester poliol. RT-PCR experiments were also performed in order to define

if these genes are expressed as operons. The role of these enzymes in polyol degradation is unknown, but the fact that two different mutants affected the same gene and generate the same phenotype strongly suggests that chorismate mutase/prephenate dehydratase must play an important role in the ability of *Alicyclophilus* sp. BQ1 to degrade polyester polyol.

## 2. Introducción

Los poliuretanos (PUs) son polímeros lineales que tienen un esqueleto molecular que contiene grupos carbamato ( $-\text{NHCO}_2$ ), también llamados uretano, que son producidos por una reacción de adición entre un diisocianato y un poliol (Figura 1) y típicamente también contienen otros grupos funcionales como éteres y ésteres. Son polímeros muy versátiles que se emplean en diversas aplicaciones que van desde espumas y barnices hasta revestimientos para automóviles y aislantes térmicos en las construcciones, entre otras (Howard, 2002).

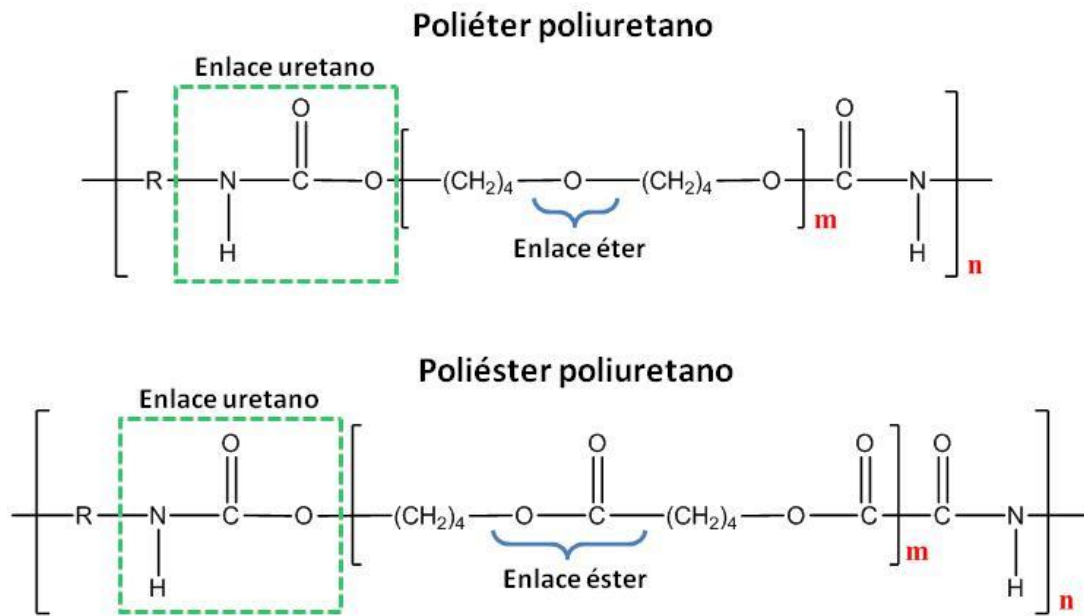


**Figura 1. Reacción de síntesis del PU.** La unión de un poliisocianato y un poliol produciendo enlaces uretano (modificado de Gautam *et al.*, 2007).

Entre los precursores de los PUs, los polioles, que contienen grupos hidroxilo que funcionan como donadores de OH para formar el enlace carbamato, existen en un amplio rango de variedades, sin embargo, se utilizan principalmente resinas de tipo poliéster y poliéter. La estructura de los polioles es un factor muy importante en la determinación de las propiedades de los PUs. Los poliéter-poliol se componen principalmente de homopolímeros de óxido de propileno o de copolímeros aleatorios con óxido de etileno. Presentan una gran resistencia a la hidrólisis, excelente flexibilidad a bajas temperaturas y resistencia a la degradación microbiana (Vipin, 2009). Los poliéster-poliol están basados en ácidos carboxílicos aromáticos o alifáticos saturados, comúnmente ácido adípico y dioles. Comparados con los poliéter-poliol tienen baja estabilidad hidrolítica pero mejor oxidación y estabilidad termal, además de alta resistencia a aceites y sustancias químicas



(Vipin, 2009). Dependiendo el tipo de polirol utilizado, los PUs pueden ser de tipo poliéter (PE-PU) o poliéster (PS-PU) (Urbanski, 1977) (Figura 2).



**Figura 2. Estructuras típicas de un PE-PU y un PS-PU.** Ambos tipos de PUs presentan grupos funcionales tanto éster como éter a lo largo de todo el polímero, independientes del tipo de polirol. Sin embargo, la clasificación del PU está dada por el tipo de polirol que presenten (Gautam *et al.*, 2007) (Modificado por Álvarez-Barragán).

Dada la gran resistencia que presenta este material, su uso se ha incrementado enormemente año tras año, trayendo como consecuencia una gran acumulación de desechos, ya que sólo una fracción muy pequeña del polímero se puede reciclar. En Europa, que es el segundo productor de PU a nivel mundial después de China, la principal demanda es para el sector de empaquetamiento (39.6%), seguida por el sector de construcción (20.3%), automotriz (8.5%) aplicaciones electrónicas y eléctricas (5.6%) aplicaciones a agricultura (4.3%) otras aplicaciones como accesorios, hogar, productos de consumo, mobiliario y servicios médicos (21.7%) (Plastics Europe, 2013). En E.U.A. se produjeron 13,650 toneladas de PU en el 2010 y 17,946 toneladas en el 2016. A nivel mundial, en el 2015 se produjeron 9.6

millones de toneladas de PU y se espera que para el 2020 la cifra se duplicará llegando hasta más de 22 millones de toneladas. En México se producen más de un millón de toneladas anuales de residuos plásticos, de las cuales sólo el 12% es recolectado para su reciclaje. La producción de PU en nuestro país ha aumentado en un 9.6% anual desde el 2010 (<http://www.plastemart.com>).

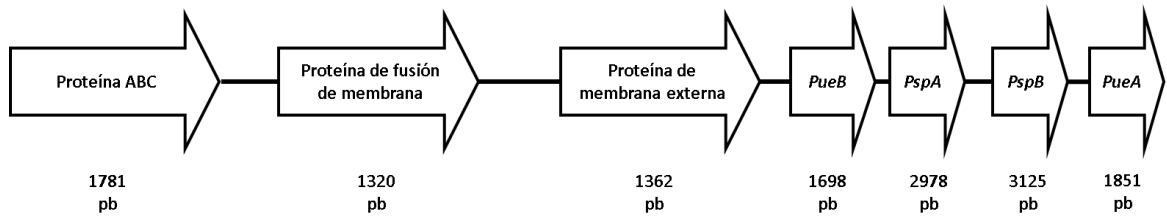
Existen algunos tratamientos para los desechos de PU a nivel industrial. Estos se pueden clasificar en cuatro tipos de reciclaje: mecánico, químico, termoquímico y el reciclaje para recuperación de energía. El reciclaje mecánico implica un tratamiento físico generalmente de compresión para poder utilizar nuevamente el PU en otro producto (prensa adhesiva y moldeo por compresión). El reciclaje químico (hidrólisis, glicólisis y aminólisis) y el termoquímico (pirólisis, gasificación e hidrogenación) implican la destrucción parcial o total del compuesto utilizando sustancias químicas o energía, respectivamente, para volver a formar materia prima. El reciclaje para recuperación de energía consiste en oxidar las moléculas del PU para producir calor o combustibles gaseosos (combustión e incineración) (Mahmood *et al.*, 2007). Sin embargo, los compuestos liberados por estos métodos contaminan el medio ambiente y pueden generar alergias e irritaciones en la piel y ojos en las personas que estén expuestos a ellos (Boutin *et al.*, 2004), lo cual los vuelve peligrosos para la salud y el ambiente, ineficientes y costosos.

Se consideraba que el PU no era biodegradable. Sin embargo, diversos estudios realizados para mostrar la susceptibilidad del PU a la degradación mostraron que ésta es dependiente de la naturaleza de los precursores que forman el PU y que cada parte de la estructura morfológica del PU, tanto la suave (aportada por los polioles) como la rígida (aportada por los poliisocianatos) poseen también una susceptibilidad al ataque bioquímico (Vojtova *et al.*, 2007). Se ha observado que el poliéster poliuretano (PS-PU) parece ser más sensible a la degradación microbiana en condiciones aerobias. Microorganismos tales como hongos y bacterias han mostrado tener esta capacidad (Morton y Surman, 1994). Algunas de las cepas bacterianas reportadas como capaces de degradar PU suplementado con otra fuente de carbono son *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). *Comamonas acidovorans* TB-35 fue reportada como capaz de crecer en PU como única fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). *P. chlororaphis* ATCC 55729, después de ser incubada en PS-PU, realizó cambios en la composición química del polímero, debido a la liberación de dietinglicol, un constituyente de la región del polioliol (Howard, 2002; Gautam, 2007). Esto abrió la expectativa de que, al conocer los procesos biodegradativos llevados a cabo por estos microorganismos, podría ser posible el desarrollo e implementación de técnicas biotecnológicas para el tratamiento de los desechos de PU, que sean más eficientes y más amigables con el ambiente.

Se han identificado algunas de las actividades enzimáticas que poseen los microorganismos capaces de crecer en PU. Las más representadas son las esterases y las lipasas, aunque algunas proteasas (Howard *et al.*, 1998 y 1999), e inclusive una uretano hidrolasa, también se han identificado como posibles agentes de degradación (Akutsu *et al.*, 2006). El primer paso de la degradación del PU es iniciado por la adhesión de enzimas asociadas a membrana a la superficie del PU, seguida por la hidrólisis de distintos enlaces en el polímero (ésteres y uretano) y la liberación de monómeros y otros fragmentos que constituyen el PU (Howard, 2002; Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). 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* que codifica una esterasa asociada a la membrana en *C. acidovorans* TB-35 fue clonado y se expresó en *Escherichia coli* observándose también la presencia de una esterasa extracelular, lo cual indica que las dos formas de la enzima están codificadas por el mismo gen y que la forma extracelular se libera al medio de cultivo, por alguna modificación postraducciona desconocida (Nomura *et al.*, 1998; Akutsu *et al.*, 1999). Por otro lado, en *P. fluorescens* también se reportó una proteína de 48 kDa con actividad esterasa codificada por el gen *pulA*, la cual podría estar implicada en la ruptura de los enlaces éster de compuestos poliuretánicos (Stern y Howard, 2000). Este mismo grupo aisló los genes *pueA* y *pueB* que codifican esterases extracelulares en *P. chlororaphis*, encontrando que en este organismo existe un cassette de degradación de PU, “PUase gene cluster”, que

incluye 7 genes que están implicados en la degradación de PU y en el transporte de “poliuretanasas” (Figura 3) (Howard *et al.*, 2007).



**Figura 3. Cluster de genes de *Pseudomonas chlororaphis* relacionados con la actividad “poliuretanasas” (Modificada de Howard *et al.*, 2007).**

Los primeros tres genes del cassette son proteínas membranales. Los genes *pueB* y *pueA* codifican esterasas del PU y están separados por genes que codifican para serina proteasas. Es muy probable que la función de todas estas proteínas en conjunto sean las que lleven a cabo la vía de degradación de PS-PU en *P. chlororaphis*.

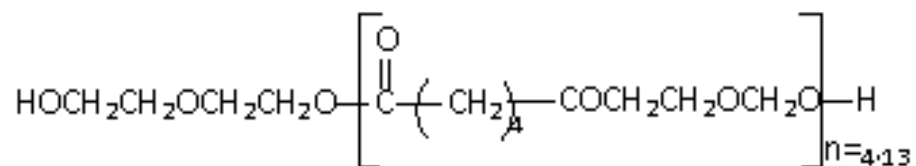
### 3. Antecedentes

Desde el 2004, en nuestro laboratorio se ha trabajado en el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias capaces de crecer en PU. En el 2007, reportaron el aislamiento de algunas cepas bacterianas, a partir de espumas de PU en descomposición recolectadas del basurero Bordo de Xochiaca (Edo de México). Al incubar estas muestras en un medio mínimo (MM) de sales con un barniz comercial de PS-PU (Hydroform<sup>®</sup>) como única fuente de carbono (MM-PUh), se seleccionaron 3 cepas (BQ1, BQ5 y BQ8) que fueron capaces de crecer en estas condiciones. Mediante el análisis de un fragmento del gen que codifica al rRNA16S, determinaron que estas bacterias eran  $\beta$ -proteobacterias, Gram negativas, de la familia Comamonadacea, pertenecientes al género *Alicyclophilus* (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007, Solís-González, 2008). La cepa BQ1 fue la que mostró el mejor crecimiento por lo que se eligió como el organismo para trabajar en nuestro laboratorio. Se analizó la composición exacta del Hydroform<sup>®</sup>, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y resonancia magnética nuclear (RMN), encontrando que el Hydroform<sup>®</sup> estaba constituido por un PU de tipo poliéster, N-metilpirrolidona (NMP) y dos isómeros de dipropilén glicol metil éster. Asimismo, se determinó también que BQ1 era capaz de utilizar la NMP presente en el barniz, así como atacar al PS-PU en los enlaces éster, por lo que se dedujo que la actividad de una esterasa debía estar involucrada en el ataque al PU. Se detectó además, la presencia de una actividad esterasa en el sobrenadante del medio de cultivo de BQ1 y BQ8 (Oceguera *et al.*, 2007).

Dentro del género *Alicyclophilus* únicamente se ha reportado una especie, *A. denitrificans* con dos cepas (BC y K601<sup>T</sup>) que son anaerobias facultativas y son capaces de degradar compuestos alicíclicos y aromáticos. La cepa K601<sup>T</sup> está reportada como capaz de utilizar ciclohexanol como única fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones (Mechichi *et al.*, 2003). BC por su parte, es capaz de degradar benceno y usar clorato como aceptor de electrones. De ambas cepas se cuenta ya con el genoma completamente secuenciado y pese a las diferencias antes mencionadas, las secuencias del gen del 16S ribosomal son

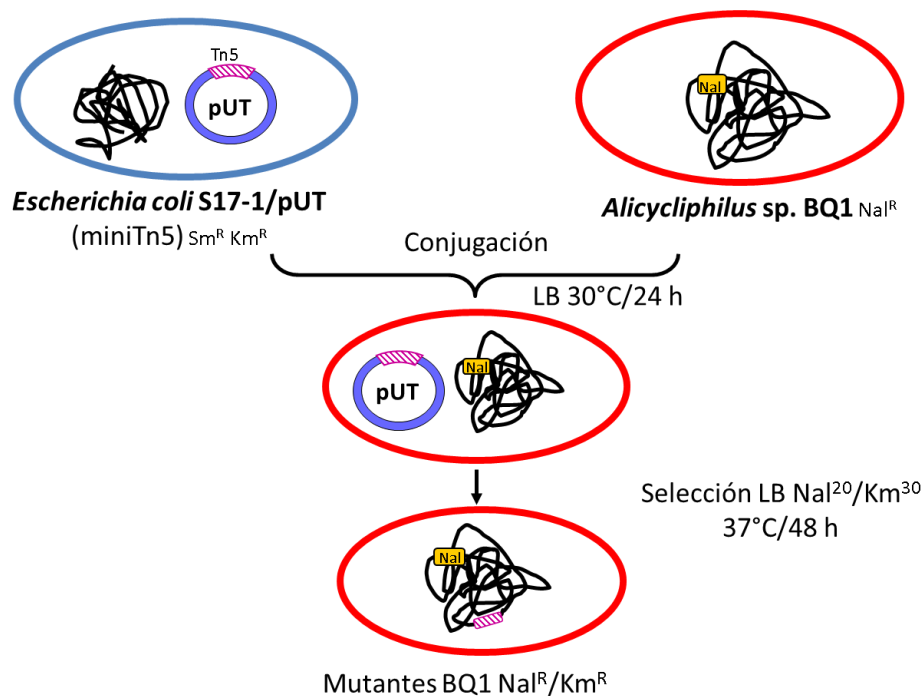
idénticas, por lo que se agrupan como dos cepas dentro de la misma especie (Oosterkamp *et al.*, 2013). En nuestro laboratorio, ambas cepas, que fueron las más relacionadas filogenéticamente con BQ1, fueron retadas a crecer en MM-PUh, sin embargo, fueron incapaces de hacerlo (Moreno-González, 2012).

El PS-PU es sintetizado a partir de polioliol tipo poliéster e isocianato. Como una estrategia para identificar actividades enzimáticas capaces de degradar PS-PU, en nuestro laboratorio se ha implementado un medio de cultivo que contiene un poliéster polioliol (MM-pp) (Rymsapol<sup>®</sup> 200/107, L-38 polioliol), (Resinas y Materiales SA de CV, Rymsa) (Figura 4), sintetizado con ácido adípico y dietilenglicol (poli (adipato de dietilenglicol)), como única fuente de carbono, en el cual la cepa BQ1 es capaz de crecer.



**Figura 4. Estructura del poliéster-polioliol Rymsapol 200/107, L-38 polioliol.** La estructura fue proporcionada por el Dr. Javier Cruz y su equipo (Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, UNAM).

Con el objetivo de identificar algunos genes implicados en la degradación del poliéster polioliol que forma parte del PU, se generó una biblioteca de mutantes de BQ1, mediante mutagénesis por transposición aleatoria empleando el transposón miniTn5 Sm<sup>R</sup>Km<sup>R</sup> usando el plásmido suicida pUT (Figura 5). En una primera aproximación se generaron 1500 mutantes por la M. en C. Julieta Solís González y el Dr. José Alberto Hernández Eligio.



**Figura 5. Esquema de mutagénesis por transposición aleatoria.** (Tomado de Solís-González, 2011).

En este trabajo se incrementó el banco de mutantes y se realizó una selección en medio conteniendo al Rymapol<sup>®</sup>, un poliéster polioliol de estructura conocida, con el propósito de aislar mutantes incapaces de crecer en este precursor de síntesis de PU, para posteriormente identificar los genes interrumpidos y determinar qué proteínas codifican, las cuales estarán implicadas en la degradación del poliéster-polioliol.

Al conocer algunos de los genes y las proteínas implicadas en la degradación del poliéster-polioliol, se intenta proponer la vía metabólica que le permite a *Alicyclophilus* sp. BQ1 utilizar este compuesto como única fuente de carbono y de esta forma tener una aproximación al proceso de biodegradación de PS-PU.

## **4. Hipótesis y Objetivos**

### **4.1. Hipótesis**

Al mutar aleatoriamente el genoma de *Alicycliphilus* sp. BQ1 se obtendrán mutantes que pierdan la habilidad de crecer en poliéster-poliol.

Al caracterizar los genes mutados se identificarán actividades enzimáticas relacionadas con la capacidad de *Alicycliphilus* sp. BQ1 de degradar poliéster-poliol.

### **4.2 Objetivo general**

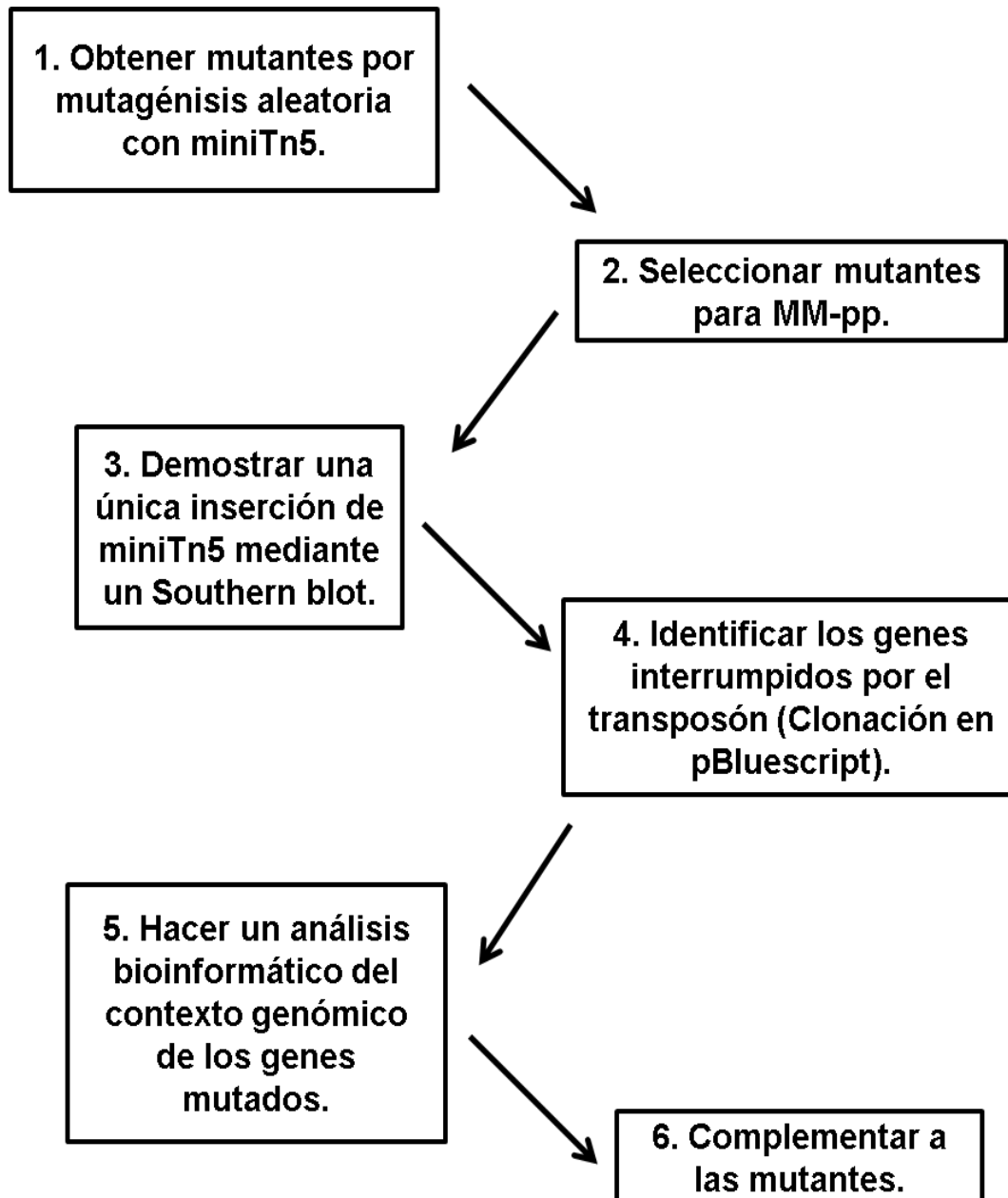
Identificar y caracterizar algunos de los genes relacionados con la actividad biodegradativa de *Alicycliphilus* sp. BQ1 sobre un poliéster poliol.

### **4.3 Objetivos particulares**

1. Realizar mutagénesis aleatoria por transposición, empleando el minitransposón Tn5, para obtener mutantes de *Alicycliphilus* sp. BQ1 incapaces de crecer en poliéster poliol.
2. Identificar algunos de los genes interrumpidos por el transposón en las mutantes incapaces de crecer en poliéster poliol.
3. Analizar bioinformáticamente el contexto genómico de los genes mutados y tratar de correlacionar la actividad de las proteínas codificadas por estos genes con la capacidad de *Alicycliphilus* sp. BQ1 de degradar poliéster poliol.
4. Complementar algunas de las mutantes para comprobar que los genes identificados están involucrados en la degradación de poliéster poliol.



## 5. Estrategia experimental



**Figura 6. Estrategia experimental:** Se muestran los principales pasos a desarrollar en este proyecto para lograr identificar algunos genes involucrados en la asimilación de poliéster-poliol y tratar de dilucidar un posible mecanismo de acción de *Alicyclophilus* sp. BQ1.

## 6. Metodología

### 6.1. Cultivos

Se utilizaron los medios de cultivo LB sólido y líquido con antibiótico (Kanamicina 30 mg/mL, Ácido Nalidíxico 20 mg/mL, Ampicilina 100 mg/mL, Gentamicina 20 mg/mL) (Anexo I) y los medios MM-pp (0.3% p/v), MM-PolyLack (0.3% p/v), MM-malato (10 mM), MM-NMP (2.5 mg/mL) y MM-pp2 (0.3% p/v) sólo se usaron en sólido (Anexo I). La cepa BQ1 fue tomada del almacén que existe en el laboratorio. Posteriormente, distintas colonias aisladas de la cepa fueron cultivadas en MM-pp, y de allí se les adicionó glicerol para almacenarlas a -70 °C. Para producir los cultivos bacterianos se agregaron 5 µL de uno de los medios que contenía las bacterias a -70 °C en un tubo con 5 mL de medio LB con su respectivo antibiótico y se cultivó a 37 °C durante toda la noche (ON). Al día siguiente se tomó una colonia grande y aislada del cultivo y se sembró usando un asa microbiológica en medio LB sólido para obtener nuevas colonias aisladas. Este protocolo se utilizó siempre que fue requerida una colonia aislada para cultivo.

### 6.2. Mutagénesis aleatoria por transposición

La mutagénesis se realizó para obtener inserciones de forma aleatoria del transposón en el genoma de BQ1. De esta forma se pueden seleccionar aquellas mutantes cuya habilidad de crecer en poliéster poliol se haya perdido y posteriormente analizar el gen afectado. La generación de mutantes se realizó mediante conjugación empleando las siguientes cepas:

**Cepa donadora:** *E. coli* S17-1 con el plásmido suicida miniTn5 pUTKm1 (De Lorenzo *et al.*, 1990). Resistente a Km<sup>30</sup>.

**Cepa receptora:** BQ1 resistente a Nal<sup>20</sup>, generada en nuestro laboratorio.

**Cepa con el plásmido auxiliar:** HB101 con el plásmido pRK2013. Resistente a Km<sup>30</sup>.

#### 6.2.1 Conjugación

Para la conjugación se realizó el siguiente procedimiento:

1. Inocular cada una de las cepas participantes en la conjugación, en tubos

individuales con 5 mL de LB conteniendo el respectivo antibiótico. Dejar incubando ON a 37 °C/200 rpm.

2. Transferir los 5 mL de cada cultivo a un matraz conteniendo 45 mL de LB con el antibiótico apropiado e incubar nuevamente a 37 °C/200 rpm hasta que los cultivos alcancen una densidad óptica igual a uno ( $D.O_{600\text{ nm}} = 1.0$ ).
3. Transferir el contenido de cada matraz en un tubo de centrifuga de teflón estéril (25 mL) y centrifugar a 7,000 rpm durante 7 min (rotor JA-20/Beckman J2-21M/E).
4. Desechar el sobrenadante (SN) y lavar cada paquete celular dos veces con 20 mL de  $MgSO_4$  10 mM.
5. Después del último lavado, desechar el SN y resuspender cada pastilla celular en 1 mL de  $MgSO_4$  10 mM.
6. Finalmente, mezclar los tres cultivos en una proporción 3:1:1 (receptora:donadora:auxiliar) sobre una caja de Petri con LB y distribuir con perlas estériles o con una varilla de vidrio flameada al mechero. Es importante cuidar que el volumen total de células no exceda los 300  $\mu$ L. Incubar la caja a 30 °C durante 24 h.
7. Cosechar las células de la caja con 1 mL de  $MgSO_4$  10 mM, empleando una varilla de vidrio flameada al mechero.
8. Plaquear alícuotas de 300  $\mu$ L sobre cajas de LB  $Nal^{20} Km^{30}$  e incubar a 37 °C durante 48 h.
9. Recuperar las colonias ex-conjugantes de BQ1 con palillos estériles y sembrar en una caja nueva de LB  $Nal^{20} Km^{30}$  e incubar a 37 °C durante 48 h.

#### 6.2.2. Escrutinio de las clonas en Rymsapol<sup>®</sup> (MM-pp).

En este punto, las mutantes fueron sembradas varias veces en el medio selectivo (poliéster polioli) para identificar aquellas que en realidad perdieron la capacidad de crecer en éste. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Tomar con un palillo estéril cada una de las colonias ex-conjugantes y sembrarlas en a) MM-pp (0.3%) (Anexo I) y b) una caja réplica de LB  $Nal^{20} Km^{30}$

(Anexo I). Dejar incubando durante 48 h a 37 °C.

2. Con el mismo palillo, almacenar las exconjugantes en tubos eppendorf con 300  $\mu$ L de LB NaI<sup>20</sup> Km<sup>30</sup> adicionados con el 30% de glicerol. Los tubos se mezclaron por inversión y fueron almacenados a -70 °C. Estos tubos constituyen la biblioteca de mutantes totales obtenidas por transposición.
3. Revisar cada caja con cuidado y a detalle, seleccionar aquellas clonas que resulten incapaces de crecer en MM-pp. Probar nuevamente cada una de estas clonas en MM-pp y en MM-malato (10 mM) (Anexo I) para descartar las clonas que resultaran con auxotrofia.
4. Finalmente, si la clona conservó el fenotipo mutante incapaz de crecer en polioliol, tras tres rondas de prueba y no resultó auxótrofa, se consideró que era una mutante para polioliol. De estas clonas se hicieron cultivos ON a partir de los cuales se prepararon medios adicionados con glicerol para almacenarlas a -70 °C y comenzar con la identificación del sitio de inserción del transposón.

#### 6.2.3. Caracterización de las mutantes

Como parte de la caracterización de las mutantes, éstas también fueron probadas en MM-NMP (25 mM) (Anexo I) que es un cosolvente presente con frecuencia en barnices de PU, en MM-PolyLack<sup>®</sup> (0.3% p/v) (Anexo I) que es un barniz comercial de PE-PU (Polylack<sup>®</sup>) y en MM-pp2 (0.3% p/v) (Anexo I), otro poliéster-polioliol, en los cuales también crece la cepa BQ1. Estas pruebas se hicieron para determinar si los genes afectados por el transposón, involucrados en la asimilación de MM-pp también participan en la habilidad de BQ1 para crecer en estos otros medios que se utilizan en nuestro laboratorio.

1. Sembrar 5  $\mu$ L del medio de cultivo adicionado con glicerol que contiene a la clona incapaz de crecer en polioliol en una caja de LB NaI<sup>20</sup> Km<sup>30</sup> y cultivar por 48 h a 37 °C.
2. Tomar una colonia aislada con un asa microbiológica y resembrar en una caja de LB NaI<sup>20</sup> Km<sup>30</sup> y dejar crecer por 48 h a 37 °C.
3. Tomar una colonia aislada con un asa microbiológica e inocular un tubo con 5 mL de LB NaI<sup>20</sup> Km<sup>30</sup>. Dejar crecer ON a 37 °C/200 rpm.

4. Al día siguiente, sumergir el asa microbiológica en el cultivo ON y sembrar por estría lo que se haya quedado en el asa en una caja de medio selectivo MM-NMP, MM-Polylack<sup>®</sup>, MM-pp2, y LB NaI<sup>20</sup> Km<sup>30</sup> simultáneamente. Incubar por 48 h a 37 °C y evaluar el crecimiento.

### **6.3. Confirmación de una sola inserción del transposón en el genoma de BQ1 mediante Southern blot**

Con esta técnica se verificó que las mutantes seleccionadas tuvieran solamente una inserción del transposón en el genoma, ya que esto es necesario para posteriormente intentar los ensayos de complementación. El protocolo seguido fue el siguiente:

#### **6.3.1. Preparación y marcaje de la sonda**

1. Inocular 5 mL de LB Km<sup>30</sup> con una colonia aislada de *E. coli* S-17, que contenga el plásmido miniTn5 pUTKm1. Incubar ON a 37 °C/200 rpm.

Extraer el plásmido realizando una miniprep empleando el kit de extracción de plásmidos (Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Amplificar, por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el transposón utilizando los oligonucleótidos Tn50 y Tn51 (Tabla 1) (6 µL Buffer 10X, 6 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1.2 µL dNTPmix 10 mM, 6 µL Tn50 10 µM, 6 µL Tn51 10 µM, 1.2 µL DNA (100 ng), 1.2 µL *Taq*DNA polimerasa (5 U/µL), 32.4 µL H<sub>2</sub>O; volumen final 60 µL). Las condiciones empleadas para la reacción fueron las siguientes: 95° por 60 seg, 35 ciclos a 95°C por 35 seg, 62 °C por 20 seg y 72° C por 60 seg, finalmente 72 °C por 5 minutos

2. Después de transcurrida la reacción, correrla en un gel de agarosa 1% y purificar el amplicón correspondiente al transposón usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific). Cuantificar el amplicón por nanodrop.
3. Reamplificar la sonda bajo las mismas condiciones de PCR, usando como molde el amplicón generado, sustituyendo el 8% de dCTP por [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP 0.16 nmol/µL (10 mCi/mL, actividad específica 6,000 Ci/mmol) (PerkinElmer, BLU513H100UC).

### 6.3.2. Extracción y digestión del DNA genómico (gDNA) de *Alicyclophlus* sp. BQ1

El protocolo utilizado fue basado en Current Protocols in Molecular Biology y ha sido modificado en nuestro laboratorio para lograr extraer DNA de *Alicyclophlus* sp. BQ1.

1. Inocular una colonia grande de la cepa BQ1 en 5 mL de medio LB en un tubo de ensayo. Tomar una colonia recién sembrada o que tenga menos de una semana de haber sido sembrada. Se ha visto que si se coloca directamente de la primera siembra después de reactivar de glicerol, es muy probable que no crezca, por lo que se sugiere que se pase a una caja nueva antes de iniciar este protocolo. Cultivar ON a 37 °C/200 rpm. Al día siguiente inocular estos 5 mL en 20 mL de medio LB (en un matraz de 250 mL) (D.O.<sub>660nm</sub> aprox. 0.3-0.5). Incubar durante 4 h a 37 °C/200 rpm (D.O.<sub>660nm</sub> aprox.1.7-1.9).
2. Centrifugar el cultivo en 4 tubos eppendorf de 2 mL en una microcentrífuga (2 mL cada vez, tres veces) a 10,000 x *g* a 4 °C durante 5 min cada vez. Drenar el medio de cultivo y resuspender completamente el pellet por vórtex vigoroso antes de agregar 1 mL de buffer TE (Tris 50 mM y EDTA 20 mM, pH 8.0) estéril a cada tubo eppendorf. Mezclar por inversión y centrifugar nuevamente. Drenar completamente el líquido y resuspender el pellet por vórtex vigoroso, hasta que el pellet haya desaparecido.
3. Adicionar 504 µL de TE a cada tubo y volver a revolver con vórtex para incorporar la pastilla celular completamente. Agregar 40 µL de lisozima (50 mg/mL, recién preparada) y 10 µL de RNAsa (libre de DNAsa) (25 mg/mL SIGMA R-4642) e incubar a 37 °C/200 rpm por 60 min. La suspensión celular debe aclararse y volverse viscosa por la acción de la lisozima.
4. Agregar 30 µL de SDS al 10% e incubar a 37 °C/200 rpm por 30 min. Se debe observar la formación de un moco blanco que indica que las células se han lisado.
5. Agregar 6 µL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubar 30 min a 37 °C/200 rpm.
6. Adicionar 100 µL de NaCl 5 M, agitar exhaustivamente por 30 seg o hasta mezclar bien e incubar a 65 °C por 10 min.
7. Agregar 80 µL de la solución CTAB/NaCl (CTAB 10% en NaCl 0.7 M),

pre-calentada a 65 °C, incubar por 20 min, hasta que se observe la formación de un precipitado blanco. Adicionar 1 vol. (780 µL) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Agitar vigorosamente en vórtex (2-5 min). Centrifugar por 10 min en una microcentrífuga a 10,000 x *g* a temperatura ambiente (TA).

8. Tomar el SN cuidadosamente, medirlo y pasarlo a tubos limpios Adicionar 1 volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (aprox. 0.7-0.8 mL). Agitar en vórtex por 5 min, formando una emulsión constante. Centrifugar 5 min a 14,000 x *g* a 4 °C.
9. Tomar el SN sin llevarse la interfase de precipitado de proteína y pasarlo a un tubo limpio, medirlo. Adicionar 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Agitar por 3 min en vórtex, formando una emulsión. Centrifugar 5 min a 14,000 x *g* a 4 °C.
10. Tomar la fase acuosa cuidadosamente y pasarla a un tubo nuevo. Adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol o 1 volumen de etanol frío. Agitar el tubo por inversión (incubar unos minutos a TA). Centrifugar a 10,000 x *g* durante 10 min a TA.
11. Retirar el SN sin perder el pellet. Lavar el pellet 2 veces con 500 µL de etanol al 70% frío. Centrifugar 5 min a 14,000 x *g* a 4 °C y decantar completamente quitando lo más posible el alcohol cada vez. Dejar abierto el tubo e invertirlo sobre un papel absorbente para que se seque. Resuspender en 100 µL de agua inyectable, o agua desionizada estéril.
12. Correr una alícuota en un gel de agarosa al 1% para confirmar la presencia de gDNA y que no tiene RNA. Medir la concentración y pureza en el nanodrop.
13. Una vez que se obtiene el gDNA se debe digerir con la enzima *Pst*I (Thermo Scientific 10 U/µL). Las reacciones se establecen empleando 1 U/µg de DNA y el volumen total se lleva a 20 µL de reacción por 1 µg de gDNA (se digirieron 5 µg). Incubar ON a 37 °C. A la mañana siguiente correr una pequeña muestra de la reacción (5 µL) para verificar que el gDNA esté completamente digerido.

### 6.3.3. Resolución del gDNA digerido en gel de agarosa y desnaturalización

1. Si la reacción de digestión del gDNA se llevó a cabo adecuadamente, preparar

un gel con agarosa al 1% y poner a correr el resto de la reacción (95  $\mu$ L) en una cámara de mayores dimensiones por aproximadamente 6 h a 85 V para que se separen los fragmentos de DNA. Cortar el exceso de agarosa del gel con una navaja y lavar con agua destilada por unos seg.

2. Retirar el agua destilada y agregar la cantidad suficiente de solución desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) para cubrir el gel y dejar agitando suavemente por 30 min. Enjuagar nuevamente con agua destilada.
3. Agregar la cantidad necesaria de solución neutralizante (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris HCl pH 7.2, 1 mM EDTA) para cubrir el gel y dejar agitando por 15 min. Retirar la solución y repetir este paso durante 15 min más.

#### 6.3.4. Transferencia de DNA a membrana de nylon (Southern blot)

1. Montar el sistema para la transferencia hacia la membrana de nylon. Colocar el gel sobre un soporte que estará en un refractario de vidrio conteniendo la solución de transferencia SSC 20X (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio).
2. Colocar entre el soporte y el gel un puente de papel Wathman 3MM humedecido con la solución de transferencia y sobre el gel colocar la membrana de nylon cargada positivamente (Hybond<sup>TM</sup>-N+ de Amersham LIFE SCIENCES) con dimensiones idénticas a las del gel. Encima de la membrana se colocan 3 láminas de papel Whatman 3MM cortadas del mismo tamaño que el gel y previamente humedecidas en la solución de transferencia.
3. Posteriormente colocar una torre de papel periódico de aproximadamente 12 cm de altura, y sobre ésta colocar una placa de vidrio, y encima un peso de alrededor de 700 g. La transferencia se deja ON a TA.
4. Terminada la transferencia, retirar la membrana del sistema, previo a esto realizar un corte en la esquina superior izquierda para saber su orientación, y enjuagar con 50 mL de SSC 2X para eliminar restos de agarosa. Revisar el gel en el transiluminador para comprobar la completa transferencia del DNA a la membrana.
5. Fijar la membrana sobre papel absorbente humedecido completamente con NaOH 0.4 M durante 20 min y enjuagar con 50 mL de SSC 5X por 40 seg.



### 6.3.5. Prehibridación e hibridación

1. Colocar la membrana ya fijada dentro de una botella de hibridación y agregar 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 cm<sup>2</sup> de la membrana y colocar la botella dentro de un horno de hibridación a 60 °C durante 2 h.
2. Calentar la sonda marcada radioactivamente, a 94 °C por 5 min y colocarla en hielo por 5 min más. Agregar la sonda al tubo que contiene la solución de prehibridación para proceder a la hibridación, incubar en el horno de hibridación a 60 °C ON.
3. Retirar el buffer de hibridación con la sonda y almacenarla en un tubo falcon de 50 mL en el congelador dentro de una caja de acrílico.
4. Lavar la membrana con 15 mL de solución de lavado 1 (SSC 2X/SDS 0.5%) durante 20 min a 24 °C dentro del horno de hibridación.
5. Desechar la solución del primer lavado y lavar con solución de lavado 2 (SSC 2X/SDS 0.1%) por 20 min más a 24 °C.
6. Monitorear la cantidad de radiactividad de la membrana pasado este tiempo, empleando un contador Geiger. Si aún es alta, lavar con la solución de lavado 3 (SSC 0.1%/SDS 0.1%) por 20 min más a 60 °C.
7. Una vez que se detecte la presencia de bandas específicas, cubrir la membrana con Kleen Pack y exponerla en una pantalla intensificadora (BioRad), ON. Pasado este tiempo colocar la pantalla en el equipo PhosphorImager (Biorad) utilizando el software QuantityOne y la aplicación Personal FX para visualizar el resultado. Después de exponer la membrana, ésta se almacena en una bolsa de plástico, en refrigeración dentro de una caja de acrílico.

### 6.4. Identificación del sitio de inserción del transposón mediante clonación en pBlueScript

La identificación del sitio de inserción del transposón se realizó digiriendo el gDNA de las mutantes con la enzima de restricción *Pst*I, cuyo sitio diana no se encuentra dentro del transposón, de esta manera, el fragmento de gDNA que contenga la inserción del miniTn5 tendrá la secuencia completa del transposón, con el gen de

resistencia a Km. La clonación de estos fragmentos se realizó usando el sitio de restricción *Pst*I del MCS del vector pBS. Los productos de las ligaciones se transformaron directamente en *E. coli* S-17 y se plaquearon en un medio con Km para recuperar solamente las construcciones que contenían el transposón.

#### 6.4.1. Preparación de células competentes

##### 6.4.1.1. Cepa *E. coli* S-17

La eficiencia esperada de transformación con este protocolo es de  $10^7$  ufc/ $\mu$ g de DNA.

1. Inocular con una colonia de *E. coli* S-17 5 mL de medio SOB con 10 mM de  $MgSO_4$  y cultivar ON a 37 °C/200 rpm.
2. Inocular 50 mL de medio SOB con 10 mM de  $MgSO_4$  con 0.5 mL del cultivo ON e incubar a 37 °C/200 rpm hasta una  $D.O_{550nm} = 0.5$ .
3. Enfriar el cultivo en baño de agua-hielo por 10 min. A partir de este momento las bacterias deben de mantenerse a 4 °C durante todo el proceso y trabajar en condiciones de esterilidad, el material empleado también debe de estar a 4 °C.
4. Centrifugar el cultivo a 4,000 x g por 12 min a 4 °C.
5. Descartar el SN e invertir el tubo sobre papel absorbente para eliminar todo el medio posible.
6. Resuspender suavemente las bacterias en 16 mL de buffer RF1 frío (30 mM acetato de sodio, 100 mM  $KCl_2$ , 10 mM  $CaCl_2$ , 50 mM  $MgCl_2$ , 15% de glicerol pH 5.8) e incubar 15 min en agua-hielo.
7. Centrifugar nuevamente a 4,000 x g por 12 min a 4 °C y resuspender en 4 mL de buffer RF2 frío (10 mM MOPS, 75 mM  $CaCl_2$ , 5% de glicerol, a pH 6.5).
8. Incubar 15 min en baño de agua-hielo.
9. Distribuir en alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos eppendorf de 1.5 mL. Congelar con nitrógeno líquido y almacenar a -70 °C.

##### 6.4.1.2. Cepa *E. coli* DH5 $\alpha$

1. Inocular 5 mL de LB con una colonia aislada de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

2. Después de la incubación, transferir 1 mL del cultivo a un matraz Erlenmeyer con 49 mL de LB fresco. Incubar el nuevo cultivo a 37 °C 200 rpm hasta alcanzar una  $D.O._{660nm} = 0.56$ .
3. Una vez obtenida la D.O. deseada, centrifugar las células a 5000 rpm (rotor JA.20/Beckman J2-21 M/E) durante 10 min a 4 °C y desechar el SN.
4. Resuspender el paquete celular en 25 mL de  $CaCl_2$  50 mM helado e incubar durante 5 min en hielo.
5. Centrifugar las células a 5000 rpm (rotor JA.20/Beckman J2-21 M/E) durante 10 min a 4 °C y desechar el SN.
6. Resuspender el paquete celular en 3.3 mL de  $CaCl_2$  50 mM adicionado con 14% de glicerol helado y repartir la suspensión de alícuotas en 100  $\mu$ L. Almacenar las alícuotas a -70 °C.

#### 6.4.2. Ligación del vector con el gDNA y clonación

Para la ligación de los fragmentos del gDNA de las mutantes, que fueron digeridos con *Pst*I, con el vector, igualmente digerido (el pBS fue purificado por el kit de extracción de plásmidos de ThermoScientific), se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (ThermoScientific 5 U/ $\mu$ L). La cantidad de enzima que se empleó fue de 2.5 U/ $\mu$ g de DNA. Se probaron varias relaciones vector:gDNA, 1:5 y 1:10, basados en la concentración de DNA. El volumen total se llevó a 20  $\mu$ L de reacción. Se dejaron ligando ON a 16 °C o 3-4 h a 22 °C.

##### 6.4.2.1 Transformación de células competentes

Con esta técnica se insertó material genético a través de plásmidos en *Alicyclophilus* sp. BQ1. Este protocolo se utilizó indistintamente con cualquiera de los dos tipos de células competentes.

1. Descongelar una alícuota de células competentes por cada transformación y mantenerlas en agua-hielo.
2. Mezclar los 200  $\mu$ L de bacterias con el DNA a transformar (20  $\mu$ L de mezcla de reacción de ligación).
3. Incubar por 30 min en baño de agua-hielo.
4. Incubar a 42 °C durante 45 seg e inmediatamente transferir a baño de agua-hielo

durante 2 min.

5. Agregar 800  $\mu\text{L}$  de LB e incubar a 37 °C/200 rpm por una h.
6. Centrifugar a 8,000 x  $g$  a 4 °C durante 5 min, eliminar el SN.
7. Resuspender el pellet en 100  $\mu\text{L}$  de LB y sembrar las células en cajas de LB Km<sup>30</sup> e incubar a 37 °C, ON. Para seleccionar mediante coloración causada por  $\alpha$ -complementación agregar 40  $\mu\text{L}$  de X-Gal (20 mg/mL) y 4  $\mu\text{L}$  de IPTG 1M.

Las células transformadas se recuperan de la caja y se resiembran en una nueva caja de LB Km<sup>30</sup>. Incubar de 16-24 h. Para verificar que sean células transformadas, realizar extracción de plásmido por miniprep mediante lisis alcalina.

#### *6.4.2.2. Purificación por lisis alcalina del plásmido con el fragmento clonado*

1. Inocular una colonia aislada de las células transformadas en 5 mL de LB Km<sup>30</sup> e incubar a 37 °C/200 rpm, ON.
2. Centrifugar todo el cultivo en un tubo eppendorff de 1.5 mL a 10,000 x  $g$  a 4 °C durante 2 min (tendrá que centrifugarse varias veces para poder obtener el pellet de los 5 mL).
3. Desechar el SN y resuspender completamente el pellet con vórtex fuerte antes de agregar 100  $\mu\text{L}$  de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) a 4 °C y mezclar con vórtex fuerte.
4. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1% (p/v)) a 4 °C recién preparada y mezclar por inversión.
5. Agregar 150  $\mu\text{L}$  de solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 11.5 %) a 4 °C, mezclar por inversión y dejar incubando en hielo por 5 min.
6. Centrifugar a 14,000 x  $g$  durante 5 min. Recuperar el SN en un tubo eppendorff limpio cuidando no tomar el debris celular (precipitado blanco).
7. Precipitar el DNA agregando un volumen de isopropanol, mezclar por vórtex ligero y dejar incubando por 5 min a TA.
8. Centrifugar a 14,000 x  $g$  durante 5 min, eliminar el SN y lavar pastilla con 1 mL de etanol al 70%.
10. Centrifugar a 14,000 x  $g$  durante 5 min.
11. Decantar el SN con cuidado de no perder el pellet, invertir el tubo sobre una

toalla de papel y dejar secar la pastilla de 5-10 min a TA.

12. Resuspender el pellet en 50  $\mu$ L de TE (pH 8.0) con 20  $\mu$ g/mL RNAsa libre de DNAsa. Mezclar gentilmente con vórtex la solución unos segundos y almacenar el DNA a -20 °C.
13. Se corre una pequeña alícuota del plásmido con el fragmento de interés en un gel de agarosa 1% para verificar que la extracción fue exitosa y entonces se digiere con *Pst*I (1 U/ $\mu$ g de DNA). Después de la digestión se corre nuevamente una alícuota en un gel de agarosa 1% para determinar el tamaño del inserto.
14. Si la muestra es para enviar a secuenciar, la extracción del plásmido es realizada usando el kit de extracción de plásmidos (Thermo Scientific).

#### 6.4.2.3 Secuenciación de las muestras

Las muestras de DNA plasmídico con el inserto de interés se secuenciaron en la Unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, empleando el oligonucleótido Tn51 (Tabla 1) que amplifica a partir de una región interna del miniTn5 hacia la región externa del mismo.

### 6.5. Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron transformadas a formato FASTA y analizadas usando el programa A plasmid Editor (ApE). Con este programa se ubicaron los sitios de corte para *Pst*I y la región del gDNA donde se insertó el transposón. La identificación de los genes afectados por el transposón se realizó mediante un BLAST contra la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Posteriormente se mandó la secuencia al Dr. Luis Lozano del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM, quien alineó la secuencia con el contig correspondiente del genoma de BQ1, que está siendo secuenciado en nuestro laboratorio en colaboración con investigadores del CCG. El contig dentro del cual se encontró la secuencia fue identificado y se analizó el contexto genómico del gen mutado realizando análisis de los ORFs en el programa A Plamid Editor (ApE) ([biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/](http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/)). Se buscó la función enzimática y la ruta metabólica de las proteínas codificadas por los genes mutados en la base de datos del KEGG ([www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)). Los alineamientos entre proteínas se

realizaron usando el programa CLUSTALW2 de EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). El análisis de posibles promotores se realizó usando los programas Neural Network Promoter Prediction ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org)) y BROM ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) y para el análisis de terminadores se usaron los programas ARNold finding terminators ([rna.igmors.u-psud.fr](http://rna.igmors.u-psud.fr)) y FindTerm ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)). El análisis de posibles operones se realizó usando el programa Prokaryotic Operon DataBase (ProOpDB) del IBT ([operons.ibt.unam.mx](http://operons.ibt.unam.mx)) así como el programa Predicted Protein-Protein Interactions en STRING ([string-db.org](http://string-db.org)).

## 6.6. RT-PCR

Para definir la región de DNA que se amplificaría para llevar a cabo la complementación de las mutantes E.III.100, D.IV.28 y J.XII.10 primero se realizaron ensayos de RT-PCR, con los cual se determinó si los genes afectados por el transposón se expresan policistricamente y así poder considerar la posibilidad de que la mutación pudiera tener un efecto polar. El protocolo seguido fue el siguiente:

### 6.6.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

1. Reactivar las bacterias de un glicerol de BQ1 en una caja de LB. Sembrar por estría e incubar a 37 °C durante 48 h.
2. Inocular una colonia aislada grande de BQ1 en 5 mL de LB e incubar a 37 °C/200 rpm, ON. A la mañana siguiente, verificar que tenga una D.O.600 nm > 1.0. Tomar 500 µL del cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 mL, lavar con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, mezclar por inversión y centrifugar a 6000 x g durante 5 min. Desechar el SN y resuspender en 300 µL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y sembrar con perlas de vidrio en una caja de MM-pp. Incubar 48 h a 37 °C.
3. Cosechar las células en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Centrifugar nuevamente y resuspender por pipeteo en 1 mL de TRIzol (Thermo Scientific). Dejar incubar por 5 min a 15-30 °C.
4. Adicionar 200 µL de cloroformo y mezclar por agitación manual durante 15 s e incubar 3 min a 15-30 °C.
5. Centrifugar a 12,000 x g 15 min a 2-8 °C. Se formarán dos fases. Una en la parte superior sin color, la fase acuosa, una interfase de fenol-cloroformo, y la

fase inferior de color rojo.

6. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
7. Agregar 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico e incubar 10 min a 15-30 °C.
8. Centrifugar a 12,000 x g 15 min a 2-8 °C.
9. Lavar el pellet de RNA con 1 mL de etanol al 75%, mezclar con vórtex suave y centrifugar a 7,000 x g 5 min a 2-8 °C. Resuspender en 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas.
10. Verificar la calidad del RNA en un gel de agarosa (pesar 350 mg de agarosa y disolver en 25.2 mL de agua. Adicionar 3.5 mL de MOPS 10X (200 mM MOPS, 20 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7.0) y esperar a que esté a una temperatura de 60 °C. Agregar 6.3 mL de formaldehído en la campana y depositar en la cámara) y cuantificar en nanodrop.
11. Tratar el RNA con DNAsa RQ1 RNase-Free (Promega 1U/  $\mu$ L), usando 1 U de enzima por cada  $\mu$ g de RNA con un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L. Incubar 30 min a 37 °C.
12. Verificar por PCR que el RNA quedó libre de DNA usando los oligonucleótidos I2 e I3 (Tabla 1), que amplifican los genes que codifican para una Antranilato fosforribosil transferasa y una proteína hipotética adyacente dentro de BQ1. Estos genes se usaron como control positivo porque mostraron su expresión en análisis de RT-PCR usando RNA extraído de células de BQ1 crecidas en MM-PolyLack 0.3% y LB 20% (Ochoa, 2017).

La síntesis de cDNA se realizó usando kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, 200 U/ $\mu$ L) usando random hexamer primers, 250 ng de RNA como molde y siguiendo las recomendaciones para secuencias de RNA con alto contenido de GC que se mencionan en el instructivo.

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo**

Símbolo	Gen que amplifican	Secuencia	nt	Tm °C
G	<i>gyrA</i>	Fwd: AAGACGCAGCTTGCCGAGTT	20	63
S	<i>serC</i>	Fwd: GCTGGTGGTCGATTTCTCGTCG	22	64
P	<i>pheA</i>	Fwd: AAGGACTGCACCAGCCTCATCA Rev: ACTCGAAGCGGGTCATGGACA	22 21	64 64
T	<i>tyrA</i>	Rev: GTGATGAGGTCTTCCAGGGGCT	22	63
A	<i>aroA</i>	Fwd: CACATCACTTTGGCCCTGCTCG Rev: GCCTTCAGGGCTTGCTGCTATT	22 22	64 63
R	<i>rpsA</i>	Rev: TTCCGAAGGATGACGCACGC	20	63
I	<i>ihfB</i>	Rev: CGAGAAACTGCCAAAGCCACGG	22	65
R	<i>rodA</i>	Fwd: TGGGCGTGATCGGCATAGGG	20	64
D	<i>dahp</i>	Fwd: AGACCAGCCAGACCGACGAC Rev: CGCGTACCGGAGATCAGCGA	20 20	64 64
H	<i>prot hip</i>	Rev: AACTGAGACGACCAGGCGGG	20	64
DAHP	<i>dahp</i>	Fwd: AAAAAAGCTTAAGCGGGGCTCTATGCCACCAACTTCGGC Rev: AAAGGATCCGCGACCAATCCTCTGCATGAGCAACGG	39 37	68 66
AsnC	<i>asnC</i>	Fwd: AAAACTCGAGGCCAGGCCAAGTACGATGACTTTCACGT Rev: AAAAAAGCTTATCCACATCAGCGCCACCTCCGTT	38 35	62 64
CM	<i>pheA</i>	Fwd: GCGAAGCTTCGCAACGAGGGCGTTCCTGG Rev: GCGCGAGCTCAGCCGATCAGGCCGAGTTGT	28 30	64 64
Tn50	<i>miniTn5</i>	Fwd: GGCCGCACCTGTGTATAAG	19	62
Tn51	<i>miniTn5</i>	Rev: GGCCAGATCTGATCAAGAG	19	62
I2	<i>igps2</i>	Fwd: GAGCACCGCGAGATATCCAT	21	56
I3	<i>igps3</i>	Rev: GGAAAAATACGCCGACTCGC	20	58

Se verificó la calidad de la muestra mediante amplificación por PCR (100 ng de cDNA) usando los oligonucleótidos I2 e I3 (Tabla 1). Para hacer los análisis del cDNA se emplearon distintos oligonucleótidos internos a algunos genes para las mutantes E.III.100 y J.XII.10/D.IV.28 (Tabla 1) que fueron probados sobre gDNA de BQ1 mediante ensayo de PCR. (1.5 µL Buffer 10X, 1.5 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.3 µL dNTPmix 10 mM, 1.5 µL oligo Fwd 10 µM, 1.5 µL oligo Rev 10 µM, 0.5 µL DNA (250 ng), 1.8 µL de DMSO, 0.6 µL *Taq*DNA polimerasa (5 U/µL), 6.2 µL H<sub>2</sub>O; volumen final 15 µL). Las reacciones fueron corridas bajo las siguientes condiciones: 95° por 2 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 60-68 °C por 15 seg-3 min y 72° C por 2 min, finalmente 72 °C por 5 minutos. Los tiempos de extensión y las temperaturas de



alineamiento se modificaron de acuerdo con el tamaño del fragmento a amplificar (Tabla 2).

**Tabla 2. Tamaños y condiciones de los distintos fragmentos amplificados para el ensayo**

Mutante	Amplicón	Genes que amplifica	Oligonucl eótidos usados	Tamaño (kb)	Temperatura de alineamiento (°C)	Tiempo de extensión (min)
E.III.100	D	<i>dahp</i>	D-Fwd D-Rev	0.121	64	0:15
	DH	<i>dahp-hyp prot</i>	D-Fwd H-Rev	1.3	68	2:00
	RD	<i>rodA-dahp</i>	R-Fwd D-Rev	2.4	66	2:00
D.IV.28/ J.XII.10	P	<i>pheA</i>	P-Fwd P-Rev	0.106	64	0:15
	SP	<i>serC-pheA</i>	S-Fwd P-Rev	1.6	66	2:00
	PT	<i>pheA-tyrA</i>	P-Fwd T-Rev	1.08	66	2:00
	AR	<i>aroA-rodA</i>	A-Fwd R-Rev	2.2	66	2:00
	PA	<i>pheA-aroA</i>	P-Fwd A-Rev	1.9	66	2:00
	AI	<i>aroA-ihfB</i>	A-Fwd A-Rev	3.5	62	3:00
	GP	<i>gyrA-pheA</i>	G-Fwd P-Rev	2.8	64	3:00
Control	C+	<i>igps2-igps3</i>	I2-Fwd I3-Rev	2.2	60	2:00

## 6.7. Complementación

Para comprobar que los genes identificados en realidad codifican enzimas involucradas en la capacidad de *Alicyclophilus* sp. BQ1 de crecer en poliéster polioliol, se realizaron ensayos de complementación con este compuesto.

### 6.7.1. Amplificación y purificación de las secuencias de los genes mutados

Posterior al análisis de las secuencias de DNA por RT-PCR se determinaron las

regiones que se clonarían en el vector para los ensayos de complementación de cada una de las mutantes. Los oligonucleótidos fueron sintetizados con los sitios blanco de enzimas de restricción que se requerían para realizar las construcciones; además se agregaron el número de pares de bases que Promega® (<https://worldwide.promega.com>) recomienda que contengan los fragmentos obtenidos por PCR para poderse digerir correctamente. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (Tabla 3).

**Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para los ensayos de complementación**

Clona	Oligo	Tm °C	Nt	Enzima de restricción	Secuencias	Tamaño producto
E.III.10 0	DAHP fwd DAHP rev	68 66	39 37	<i>HindIII</i> <i>BamHI</i>	5'-AAAAAGCTTAAGCGGGGCTCTATGCCACCAACTTCGGC-3' 5'-AAAGGATCCGCGACACATCCTCTGCATGAGCAACGG-3'	2191 pb
H.I.20	AsnC fwd AsnC rev	62 64	38 35	<i>HindIII</i> <i>XhoI</i>	5'-AAAACTCGAGGCCAGAGCCAAGTACGATGACTTTCACGT-3' 5'-AAAAAGCTTATCCACATCACGCGCCACCTCCGTT-3'	955 pb
D.IV.28/ J.XII.1 0	CM fwd CM rev	64 64	28 30	<i>HindIII</i> <i>XhoI</i>	5'-GCGAAGCTTCGCAACGAGGCGTTCTGG-3' 5'-GCGCGAGCTCAGCCGATCAGGCCGAGTTGT-3'	1423 pb

Las reacciones de PCR usando gDNA (12 µL Buffer GC 5X, 3 µL, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.2 µL dNTPmix 10 mM, 6 µL oligo Fwd 10 µM, 6 µL oligo Rev 10 µM, 2 µL DNA (100 ng), 0.6 µL Pushion High Fidelity DNA polimerasa (5 U/µL), 1.8 µL DMSO, 27.4 µL H<sub>2</sub>O; volumen final 60 µL). fueron corridas bajo las siguientes condiciones: 98° por 60 seg, 35 ciclos a 98°C por 30 seg, 64 °C (AsnC) y 66 °C (DAHP) por 45 seg o 68 °C (CM) por 30 seg y 72° C por 2 min, finalmente 72 °C por 5 minutos.

Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo empleando la Phusion High Fidelity DNA polimerasa (Thermo Scientific 10 U/µL) la cual fue utilizada con el buffer GC, que contiene 7.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, el cual es específico para mejorar el funcionamiento de la DNA polimerasa en secuencias con alto contenido de GC, como es el caso del genoma de BQ1.

Los fragmentos nombrados AsnC (H.I.20) y DAHP (E.III.100) amplificados fueron purificados de la reacción de PCR empleando el GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific), mientras que el fragmento CM (D.IV.28/J.XII.10) fue purificado de un gel de agarosa empleando el GeneJET Gel Purification Kit (Thermo

Scientific). Los fragmentos fueron doblemente digeridos con las enzimas de restricción *XhoI/HindIII* (Thermo Scientific, 10 U/ $\mu$ L) para las mutantes H.I.20 y J.XII.10, y *HindIII/BamHI* (Thermo Scientific, 10 U/ $\mu$ L) para la mutante E.III.100. De igual forma se realizaron cada una de las dobles digestiones para el vector pBBR1MCS-5. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en 20  $\mu$ L conteniendo 2  $\mu$ L de buffer 10X y 0.5  $\mu$ L de cada una de las enzimas para digerir 500 ng de DNA. Las digestiones se realizaron durante 5 h a una temperatura de 37 °C primero con una enzima y ON con la segunda enzima. Una vez digeridos, los fragmentos se ligaron en el vector de la misma forma que previamente se describió (Sección 6.4.2. Ligación del vector con el gDNA y clonación) y se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . A las clonas recombinantes, seleccionadas por el cambio de coloración de las colonias, como resultado de  $\alpha$ -complementación, en medio LB con Gentamicina (Gm<sup>20</sup>), X-Gal (20 mg/mL) e IPTG 1M, se les extrajo el plásmido por lisis alcalina y se determinó mediante análisis por PCR con los oligonucleótidos específicos a los genes que se clonaron, que contuvieran el inserto, además, fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción para liberar el inserto, verificando su tamaño. Se extrajeron los plásmidos de las bacterias transformadas, por medio de kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), se cuantificaron por nanodrop y se emplearon para transformar *E. coli* S17-1.

#### 6.7.2. Conjugación

Se empleó el protocolo previamente descrito para la generación de la biblioteca de mutantes (Sección 6.2.1), pero no se empleó la cepa auxiliar y para la recuperación de ex-conjugantes se incubó a 30 °C en lugar de a 37 °C. Los tiempos de crecimiento después de la cosecha también se modificaron a 96 h en lugar de 48 h. Las cepas empleadas fueron:

**Cepa donadora:** *E. coli* S17-1 con el plásmido recombinante pBBR1MCS-5. Resistente a Gm<sup>20</sup>.

**Cepa receptora:** Mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 incapaces de crecer en Rymopol: pp<sup>-</sup> E.III.100, H.I.20 y J.XII.10. Resistentes a Km<sup>30</sup> NaI<sup>20</sup>.

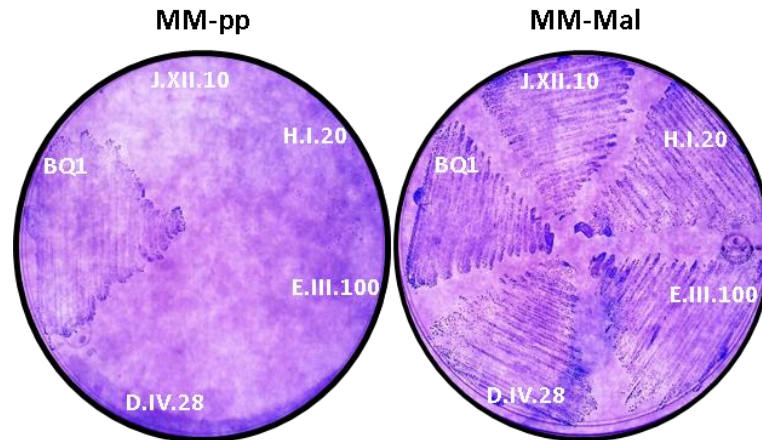
### 6.7.3. Ensayos para verificar la recuperación del fenotipo silvestre.

1. La siembra de las exconjugantes (también BQ1 y las mutantes en todas los ensayos, con sus respectivos antibióticos) partieron de la reactivación de células congeladas en glicerol hacia cajas de LB Nal20Gm20, se dejaron crecer a 37 °C durante 48 h y se tomaron colonias aisladas para inocular 5 mL de LB Gm20 y se dejaron crecer ON a 37 °C/200 rpm, en donde todas alcanzaron una D.O.660nm>1.0. Ajustar todos los cultivos a una D.O.660nm=0.6. y colocar 1 mL de este cultivo en tubos eppendorf. Centrifugar a 6000 x g en una microcentrífuga durante 3:30 min y desechar el SN.
2. Lavar el pellet con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Volver a centrifugar a 6000 x g durante 3:30 min y desechar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 500 µL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, mezclar perfectamente por inversión e inocular 2 µL de cada cultivo en las cajas de MM-pp y LB y sembrar por estría. Dejar crecer por 48 h a 37 °C.
4. Revisar cada caja con cuidado. Para observar el crecimiento, teñir con azul de Coomassie 0.3%, lo suficiente para que cubra el medio de la caja, aproximadamente 20 mL, dejar actuar por 15 min y lavar 2 veces, cubriendo completamente los medios, con solución desteñidora (0.150 g de azul de Coomassie, 150 mL de metanol, 30 mL ácido acético glacial, 120 mL agua destilada).

## 7. Resultados y Discusión

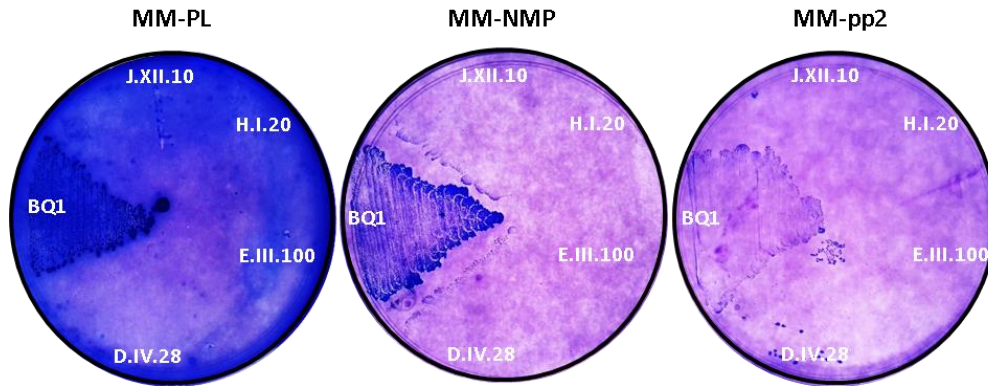
### 7.1. Generación y selección de mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1 incapaces de crecer en el poliéster polioliol Rymsapol<sup>®</sup>

Con el propósito de identificar algunos genes que codifiquen proteínas involucradas en la capacidad de *Alicyclophilus* sp. BQ1 de crecer en el poliéster polioliol Rymsapol<sup>®</sup>, generamos una biblioteca de 7132 mutantes empleando el transposón miniTn5. Para realizar la selección de mutantes incapaces de crecer en Rymsapol<sup>®</sup>, primero fue necesario estandarizar las condiciones de las pruebas para confirmar el fenotipo, antes de empezar a trabajar en su caracterización. El MM-pp es muy difícil de trabajar en líquido ya que el Rymsapol<sup>®</sup> no se logra mantener como una emulsión estable, por lo que fue necesario trabajar en la estandarización de un protocolo en medio sólido. Posteriormente se tuvo que ajustar el método de sembrado, las concentraciones del Rymsapol<sup>®</sup> y el modo de preparación del medio, con el fin de lograr que el crecimiento fuera claramente visible y que no hubiera lugar a dudas en el análisis de los resultados. Los protocolos finales para todos estos procedimientos están descritos en Materiales y Métodos. Los escrutinios de la biblioteca de mutantes se realizaron en MM-pp sólido. Se identificaron 4 mutantes no auxótrofos (probadas en medio mínimo adicionado con malato (MM-Mal)) incapaces de crecer en MM-pp (D.IV.28, E.III.100, H.I.20 y J.XII.10) (Figura 7).



**Figura 7. Confirmación de mutantes incapaces de crecer en MM-pp.** Se observa del lado izquierdo las mutantes sembradas en MM-pp; del lado derecho sembradas en MM-Mal. Cajas teñidas con azul de Coomassie 0.3%.

Con el objetivo de caracterizar las mutantes obtenidas, se determinó su habilidad de crecer en otro tipo de PU o en compuestos relacionados con la síntesis de PU, como única fuente de carbono. Por lo que cada una de las clonas mutantes fue sembrada en los medios sólidos: a) medio mínimo adicionado con barniz de tipo PE-PU PolyLack<sup>®</sup>, (MM-PL), b) medio mínimo con N-metilpirrolidona (NMP) (MM-NMP), que es un cosolvente presente en algunos barnices de PU y en c) medio mínimo con otro poliéster polioliol, MM-pp2 (Rymsapol<sup>®</sup> L-1660, sintetizado a partir de ácido adípico, monoetilenglicol y dietilenglicol) (Figura 8, Tabla 4). Todas las mutantes seleccionadas además de perder su capacidad de crecer el poliéster polioliol Rymsapol<sup>®</sup> también perdieron su capacidad de crecer en el barniz PolyLack<sup>®</sup>, en NMP y en el medio con el otro poliéster polioliol (MM-pp2). El hecho de que las mutantes que seleccionamos también hayan perdido la capacidad de crecer en los otros medios mencionados, nos sugiere que los genes que participan en la capacidad de crecer en MM-pp están también implicados en la capacidad de crecer en los otros compuestos relacionados con la síntesis de PU.



**Figura 8. Caracterización de las mutantes.** Las mutantes fueron sembradas de izquierda a derecha en MM-PL, MM-NMP y en MM-pp2. Las cajas fueron teñidas con azul de Coomassie 0.3 %. n=3.

**Tabla 4. Fenotipo de *Alicyclophilus* sp. BQ1 silvestre y de las mutantes**

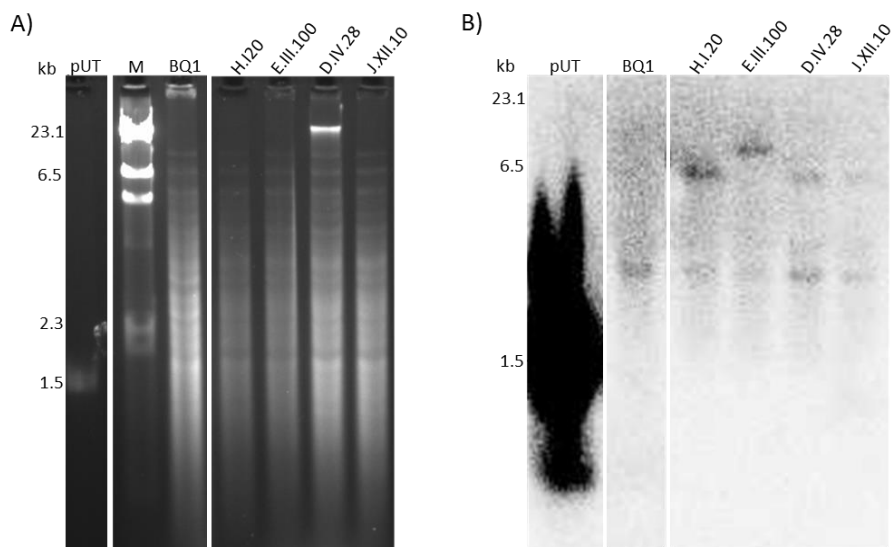
Cepa	MM-pp	MM-Mal	MM-PL	MM-NMP	MM-pp2
<b>BQ1</b>	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
<b>E.III.100</b>	NO	SÍ	NO	NO	NO
<b>H.I.20</b>	NO	SÍ	NO	NO	NO
<b>D.IV.28</b>	NO	SÍ	NO	NO	NO

Crecimiento de BQ1 y de las mutantes en los diferentes medios selectivos. MM-pp Rymasapol®, MM-Mal, malato; MM-NMP, N-metil-2-pirrolidona, MM-PL, PolyLack®, MM-pp2, poliéster poliol Rymasapol® L-1660. SÍ indica crecimiento, NO indica ausencia de crecimiento.

## 7.2 Confirmación de una única inserción del miniTn5 en el gDNA de las mutantes

Con la finalidad de confirmar que el miniTn5 se insertó en un solo sitio en el genoma de las mutantes y de esta manera poder continuar con su análisis de una manera confiable, se utilizó la técnica de hibridación Southern Blot específica para el transposón. Se digirió cada uno de los gDNA de las clonas, se resolvió en un gel de agarosa (Figura 9A) y se transfirió a una membrana de nylon para realizar la hibridación y posteriormente revelarlo por autoradiografía (Figura 9B). En todas las

mutantes el transposón se insertó en un sitio único en su genoma, lo cual nos permitió continuar con su caracterización de una manera confiable.



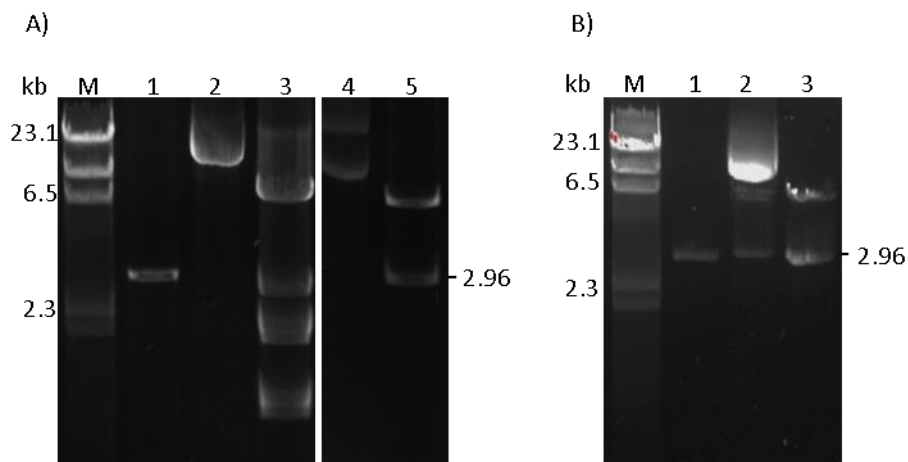
**Figura 9. Identificación de una única inserción del miniTn5.** A) Digestión de gDNA de las mutantes con *Pst*I. Gel de agarosa 1% teñido con BrEt. M, Marcador DNA de Lambda digerido con *Hind*III. pUT 100 ng, muestras 7 µg por carril. B) Membrana hibridada usando la técnica Southern blot. Marcador DNA de Lambda digerido con *Hind*III. pUT 100 ng. Muestras 7 µg de gDNA. La señal de hibridación inferior corresponde a una hibridación inespecífica.

### 7.3. Identificación del sitio de inserción del transposón en cada mutante

Con el objetivo de identificar el sitio de inserción del miniTn5 en el genoma de las mutantes, el gDNA de las mutantes se digirió con la enzima de restricción *Pst*I, se clonó en el vector pBluescript (pBS) SK y se transformó en *E. coli*. La selección de las colonias transformadas fue por resistencia a kanamicina ( $Km^{30}$ ), gen presente en el transposón. Para cada plásmido conteniendo la región del genoma que porta el transposón obtenido de cada mutante y digerido con *Pst*I, se observa una banda de 2.96 kb correspondiente al plásmido linearizado y al menos otra banda en la que está insertado el transposón. En aquellas preparaciones en las que se observan más de dos bandas puede deberse a la formación de quimeras causadas por la unión de más de un fragmento de DNA. No obstante, se pudieron descartar aquellas bandas menores a 1.8 kb, que es el tamaño del miniTn5 (Figura 10). Para



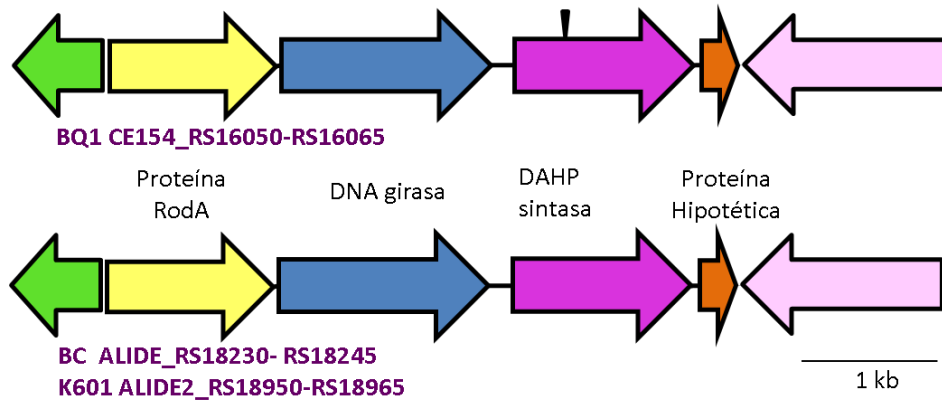
secuenciar se utilizó el oligonucleótido Tn51, el cual alinea dentro de la región del miniTn5 y está dirigido hacia el exterior del mismo. La secuencia que se obtiene corresponde al gDNA en donde se insertó el transposón, aunque la construcción hubiera sido una quimera.



**Figura 10. Clonación del gDNA que contiene el transposón, en las distintas mutantes.** Colonias transformantes resistentes a Km fueron seleccionadas y el plásmido con el transposón obtenido. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa 1% teñido con BrEt. Marcador DNA de Lambda digerido con *Hind*III. **A)** **1**, pBS digerido con *Pst*I; **2**, pBS(E.III.100); **3**, pBS(E.III.100) digerido con *Pst*I; **4**, pBS(J.XII.10); **5**, pBS(J.XII.10) digerido con *Pst*I. **B)** **1**, pBS digerido con *Pst*I; **2**, pBS(D.IV.28); **3**, pBS(D.IV.28) digerido con *Pst*I.

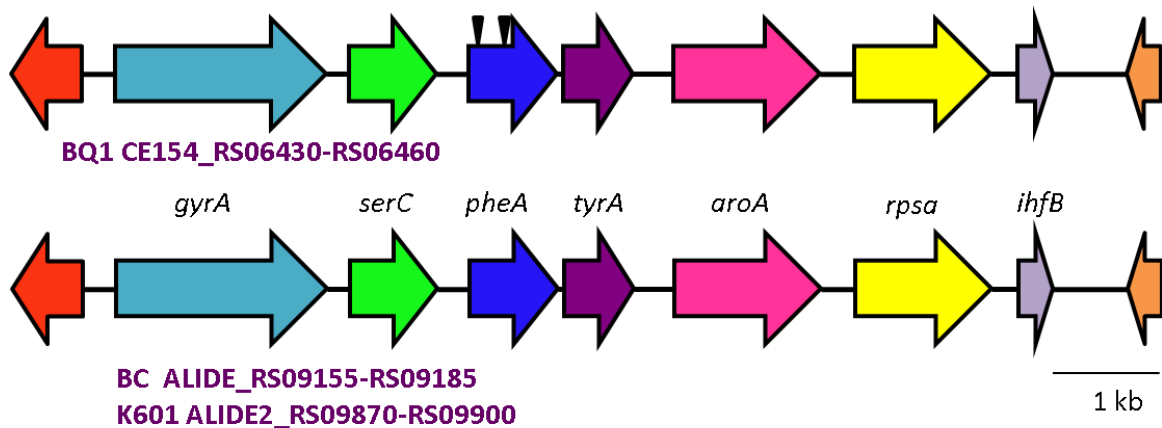
#### 7.4 Análisis del contexto genómico de las mutantes

El estudio bioinformático de las secuencias aledañas al sitio de inserción del transposón, permitió conocer el gen mutado y el contexto genómico del mismo en cada mutante. En la mutante E.III.100, el transposón se insertó en el gen que codifica a la 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHP sintasa) (EC 2.5.1.54) con el número de gen CE154\_16060. Este gen se encuentra también en los genomas de las cepas BC y K601<sup>T</sup>, identificados como ALIDE\_RS18240 y ALIDE2\_RS18960, respectivamente (Figura 11). El arreglo genómico que se presenta en BQ1 es idéntico a la organización genómica de las cepas BC y K601<sup>T</sup>.



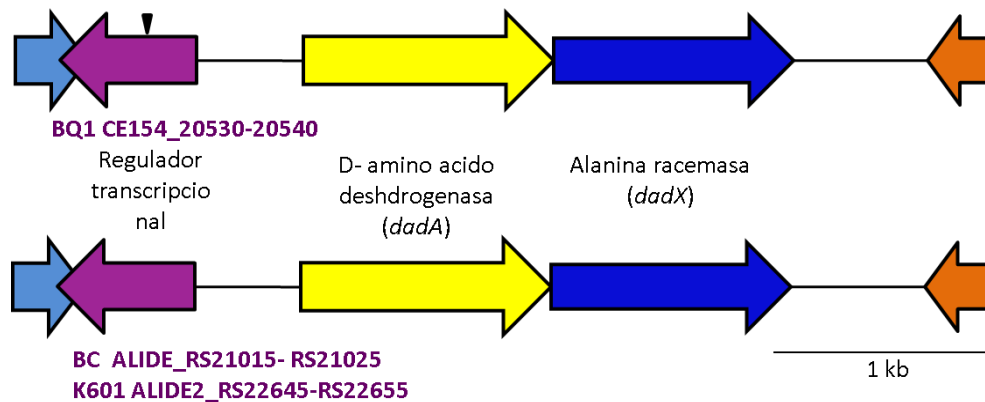
**Figura 11. Región de inserción del miniTn5 en la mutante E.III.100.** En la parte superior se muestra el contexto genómico de BQ1, en la parte inferior el de BC y K601<sup>T</sup>. Se indica con un triángulo el sitio de inserción del transposón.

En las mutantes J.XII.10 y D.IV.28 el transposón se insertó en dos sitios distintos a 774 pares de bases (pb) de distancia entre las inserciones en el gen que codifica la corismato mutasa (CM) (EC 5.4.99.5) con el número CE154\_06450. Encontrar dos mutaciones por transposición independiente que cayeron en el mismo gen y que generan el mismo fenotipo, en este caso la pérdida de la capacidad de BQ1 de crecer en poliéster polioliol, es una evidencia muy importante de que la enzima codificada por este gen está participando en dotar a BQ1 con la capacidad de crecer en este compuesto. Este gen se encuentra también en las cepas BC y K601<sup>T</sup> con los números de genes ALIDE\_RS09175 y ALIDE2\_RS09890 respectivamente (Figura 12).



**Figura 12. Región de inserción del miniTn5 en las mutantes D.IV.28/J.XII.10.** Arriba. Contexto genómico de BQ1. Abajo. Contexto genómico en BC y K601<sup>T</sup>. Triángulos negros, sitios de inserción del transposón. *gyrA*, DNA girasa subunidad A; *serC*, Fosfoserina amino transferasa; *pheA*, Corismato mutasa/prefenato deshidratasa; *tyrA*, Prefenato deshidrogenasa; *aroA*, 3-fosfoshikimato-1- carboxivinil transferasa; *rpsa*, proteína ribosomal S1; *ihfB*, factor de integración al hospedero subunidad β.

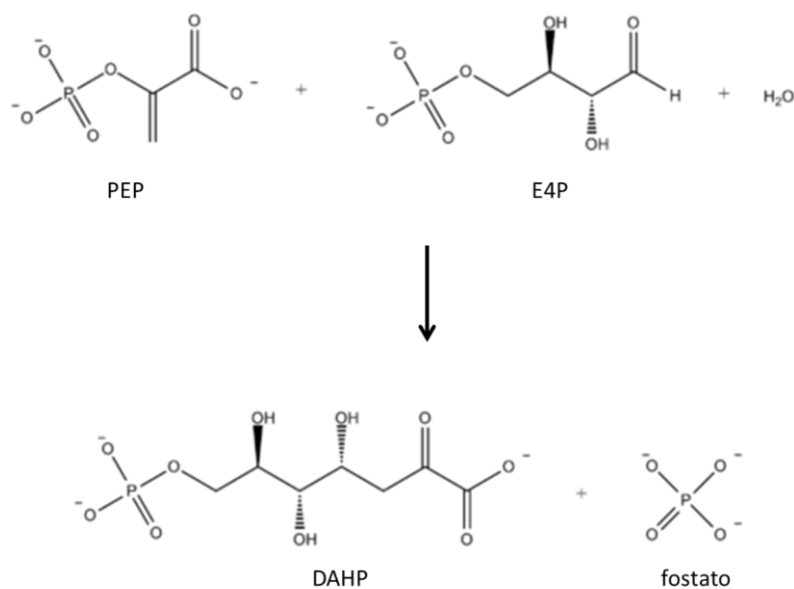
Finalmente, en la mutante H.I.20, el transposón se insertó en un gen que codifica a un regulador transcripcional con el número de gen CE154\_20540. Este gen se encuentra también en el genoma de las cepas BC y K601<sup>T</sup>, en el ALIDE\_RS21025 y ALIDE2\_RS22655 respectivamente (Figura 13).



**Figura 13. Región de inserción del miniTn5 en la mutante H.I.20.** En la parte superior se muestra el contexto genómico de BQ1, en la parte inferior el de BC y K601<sup>T</sup>. Se marca con un triángulo negro el sitio de inserción del transposón.

## 7.5 Análisis de la DAHP sintasa mutada en *Alicyclophilus* sp. BQ1

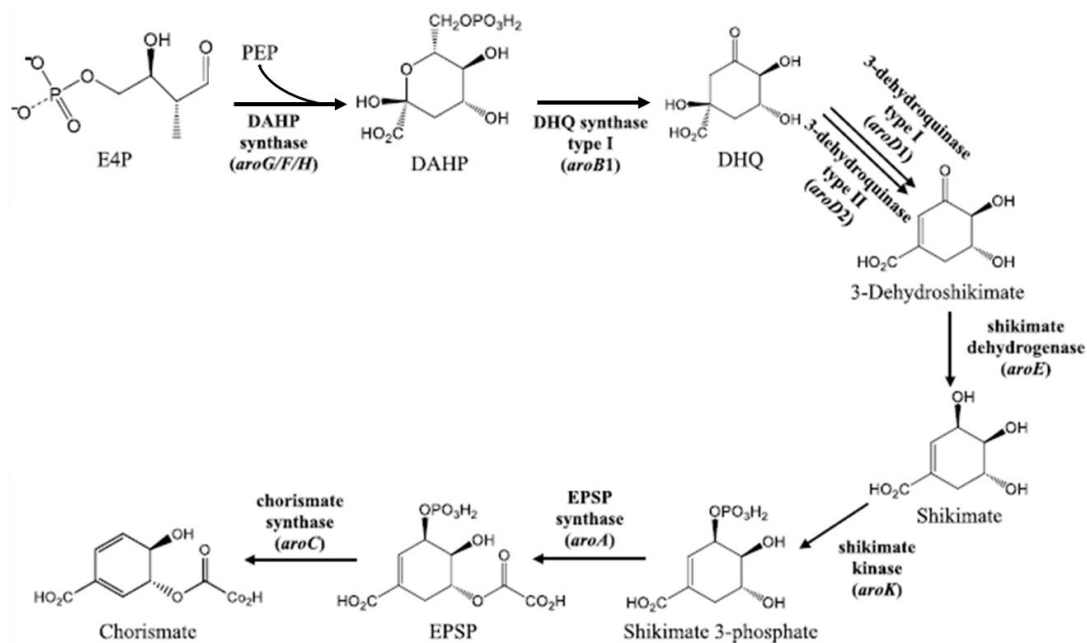
La DAHP sintasa (EC: 2.5.1.54) pertenece a la clase de las transferasas, transfiere grupos arilo o metilo, produciendo 3-deoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato (DAHP) y fosfato, a partir de fosfoenolpiruvato (PEP), D-eritrosa-4-fosfato (E4P) y agua (<http://www.genome.jp/kegg/>) (Figura 14). Esta reacción corresponde al primero de siete pasos de la vía del shikimato, en la que se obtiene como producto final corismato (Figura 15). El corismato puede canalizarse hacia la síntesis de triptófano por un lado o hacia la síntesis de tirosina y fenilalanina por otro. Además de ser el precursor de los aminoácidos (aa) aromáticos, el corismato, también lo es de la vitamina C, ácido fólico, ubiquinona y otros metabolitos secundarios (Hermann *et al.*, 1999).



**Figura 14. Reacción realizada por la DAHP sintasa.** La DAHP sintasa transfiere el grupo vinil de PEP a E4P y se desprende un fosfato del PEP mediante hidrólisis (<http://www.genome.jp/kegg/>).

La vía del shikimato, está presente en bacterias, hongos, algas y plantas y la actividad de la DAHP sintasa es el principal punto de regulación de la cantidad de carbono que entra en esta ruta. En bacterias esta regulación puede llevarse a cabo

por dos mecanismos, la inhibición por retroalimentación (feedback) y por control transcripcional (Hermann et al., 2001).



**Figura 15. Enzimas e intermediarios de la ruta del shikimate.** El primer paso es catalizado por la 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) synthase (EC 4.1.2.15; codificada por *aroG/F/H* de acuerdo con la nomenclatura de *Escherichia coli*). El Segundo paso lo realiza la type I 3-dehidroquinato (DHQ) synthase (EC 4.6.1.3; codificada por *aroB1*). El tercer paso lo cataliza la 3-dehidroquinasa (EC 4.2.1.10; codificada por *aroD*). El cuarto paso es catalizado por shikimate deshidrogenasa (EC 1.1.1.25; codificada por *aroE*). El quinto paso es catalizado por shikimate quinasa (EC 2.7.1.71; codificada por *aroK*). El sexto paso es catalizado por 5-enolpiruvil-shikimate 3-fosfato (EPSP) synthase (EC 2.5.1.19; codificado por *aroA*). El paso final es catalizado por chorismate synthase (EC 4.6.1.4; codificada por *aroC*). (Modificado de Xiao-Yang, *et al.*, 2014).

En *E. coli* se han identificado tres isoenzimas de la DAHP sintasa, cada una de las cuales es regulada por uno de los tres aa aromáticos. Estas tres isoenzimas son codificadas por tres distintos genes: *aroG* para la DAHP sintasa regulada por fenilalanina (Phe), *aroF* para la DAHP sintasa regulada por tirosina (Tyr) y *aroH* para la DAHP sintasa regulada por triptófano (Trp) (Craig y Klau, 1984). Con excepción de *aroF* que forma parte del operón de tirosina, estos genes se encuentran distribuidos en distintos sitios del genoma de *E. coli* y son expresados

como mRNAs monocistrónicos (Davies y Davidson, 1982; Grove y Gunsalus, 1897). Sin embargo, en otros organismos sólo existen dos isoformas de DAHP sintasas, tal es el caso de la actinobacteria *Corynebacterium glutamicum*, en donde una de las DAHP sintasas (*aroF*) es inhibida en mayor medida por retroalimentación de Tyr y en menor medida por Phe y Trp; mientras que la segunda DAHP sintasa (*aroG*) es ligeramente inhibida por retroalimentación sólo por Trp (Liao *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008). Finalmente existen otros organismos como *Bacillus subtilis* en donde sólo existe una DAHP sintasa que no es inhibida por retroalimentación por ninguno de los aa aromáticos, sino que es regulada por prefenato y corismato, que son intermediarios de la vía del shikimato. (Wu *et al.*, 2005). Con base en análisis de secuencia, de requerimientos de cationes y de regulación, se ha definido que las DAHP sintasas se clasifican en dos tipos: las DAHP sintasas tipo I, con secuencias semejantes a las de *E. coli*, con un tamaño de alrededor de 39 kDa y las DAHP sintasas tipo II, que tienen secuencias parecidas a las de plantas, con un tamaño de alrededor de 52 kDa.

En el genoma de BQ1 se encuentran dos DAHP sintasas, una de 373 aa (41 kDa) en cuyo gen cayó el transposón, a la que llamaremos DAHP1 (CE154\_16060) y otra en otra región del genoma de 368 aa (40 kDa) nombrada DAHP2 (CE154\_21600). Genes homólogos están presentes en las cepas BC y K601<sup>T</sup>. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de BC y K601<sup>T</sup> con las tres isoformas caracterizadas de *E. coli* (DAHP sintasas clase I) (Figura 16). Se observó que ambas DAHP sintasas de BQ1 son de tipo I y éstas a su vez muestran una mayor relación con sus respectivas homólogas presentes en las cepas BC y K601<sup>T</sup> y guardan una relación filogenética más cercana con el gen *aroG* en *E. coli*. Esto nos permite sugerir que la DAHP sintasa en cuyo gen se insertó el transposón, pudiera estar regulada por fenilalanina (Figura 17). También se incluyó otra secuencia de DAHP sintasa clase I de *Saccharomyces cerevisiae* y tres de DAHP sintasas clase II (dos de *Neurospora crassa* y la única de *Mycobacterium tuberculosis*), cuyos resultados no presentaron una identidad mayor con respecto a los mostrados (Datos no mostrados).

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

T.mar.DAHP1      MIVVLPKPGSTEEDIRKVVKLAESYNLKHCHISKGQERTVIGIGDDRVVYVADKFEISLDCVE
aroF.Ecoli      -----MQLDALNNVHI-----TDEQVLMTPPE
aroH.Ecoli      -----MNRDLELRT-----ARIESLVTPE
DAH2.K601       ---HTLDRPHPTPSTHDTTRIDDLRI-----KAVRPLITPA
DAH2.BC         ---HTLDRPHPTPSTHDTTRIDDLRI-----KAVRPLITPA
DAH2.BQ1       ---HTLDRPHPTPSTHDTTRIDDLRI-----KAVRPLITPA
aroG.Ecoli      -----HNYQMDLRI-----KEIKELPPV
DAH1.BQ1       --MTATVSSSDAWYRNVDKTSQTDDQRI-----EDITVLPPE
DAH1.BC        --MTATVSSSDAWYRNVDKTSQTDDQRI-----EDITVLPPE
DAH1.K601      --MTATVSSSDAWYRNVDKTSQTDDQRI-----EDITVLPPE
                : : :
                * * *

T.mar.DAHP1      SVVRVLPKPKLVSRFHFEDTVIDLGDVKIG-NGYFTIIAGPCSVGRENLMETAHFLSE
aroF.Ecoli      QLKAAF-PLSL-QEQAQIADSRKSIDIIAGDPRLLVVCPCSIHDPETALEYARRFKA
aroH.Ecoli      ELALRY-PVTP-GVATHVDSRRRIKILNGDKRLVVIIGPCSIHDLTAAMEYATRLQS
DAH2.K601       ILEEWL-PASD-AAQALVEESRLQISRVLHGQDRLIVVVVPCSIHDDHQAMEYARQLLA
DAH2.BC        ILEEWL-PASD-AAQALVEESRLQISRVLHGQDRLIVVVVPCSIHDDHQAMEYARQLLA
DAH2.BQ1       ILEEWL-PASD-AAQALVEESRLQISRVLHGQDRLIVVVVPCSIHDDHQAMEYARQLLA
aroG.Ecoli      ALLEKF-PATE-NAANTVAHARKAIHKILKGNDRLLVVIIGPCSIHDPVAAKEYATRLLA
DAH1.BQ1       HLIRFF-PIRGTEVESLISSTRSIRQIMNGEDDRLLVVIIGPCSIHNPVAALEYAQRLLV
DAH1.BC        HLIRFF-PIRGTEVESLISSTRSIRQIMNGEDDRLLVVIIGPCSIHNPVAALEYAQRLLV
DAH1.K601      HLIRFF-PIRGTEVESLISSTRSIRQIMNGEDDRLLVVIIGPCSIHNPVAALEYAQRLLV
                : : :
                * * *

T.mar.DAHP1      LGVK-----VLRGGAYKPRTPSPYSFQGL-----GEKGLYLEPE---AADRYG
aroF.Ecoli      LAAEVSDSLVYMRVYFEKPRIT-VGWRGLINDPHDGSFDVEAGLIARQLLELVNMG
aroH.Ecoli      LHNQYQSRLEIVMRVYFEKPRITV-VGWRGLISDPLNGSYRVNHGLELARKLLQVNEIG
DAH2.K601       QARALAQDLLIVMRVYFEKPRIT-VGWRGYINDPHDGSFAINEGLEPARALLDIALG
DAH2.BC        QARALAQDLLIVMRVYFEKPRIT-VGWRGYINDPHDGSFAINEGLEPARALLDIALG
DAH2.BQ1       QARALAQDLLIVMRVYFEKPRIT-VGWRGYINDPHDGSFAINEGLEPARALLDIALG
aroG.Ecoli      LEEELKDELEIVMRVYFEKPRIT-VGWRGLINDPHDGSFQINDGLRIARQLLINDSG
DAH1.BQ1       VREQYKQLEVVMRVYFEKPRIT-VGWRGLINDPYLDGSYRIDEGLRIARQLLIDINRLG
DAH1.BC        VREQYKQLEVVMRVYFEKPRIT-VGWRGLINDPYLDGSYRIDEGLRIARQLLIDINRLG
DAH1.K601      VREQYKQLEVVMRVYFEKPRIT-VGWRGLINDPYLDGSYRIDEGLRIARQLLIDINRLG
                : : *
                * * *

T.mar.DAHP1      MYVTEALGEDDLPKVAEYADIIQIGARNAQNFRLLSKAGSYNKPVLLKRGFFMTIE---
aroF.Ecoli      LPLATEALDPSNPQYLDLFSWSAIGARTTESQTHEEMASGLSMPVGFNGDGLSLATAI
aroH.Ecoli      VPTATEFLDMVTGGQFADLISWGAIGARTTESQTHEEMASGLSMPVGFNGDGMTRIAV
DAH2.K601       LPVGTFLDLLSPQFISDLVSWGAIGARTTESQSHRQLASGLSCPVGFGNGDGGVAVAA
DAH2.BC        LPVGTFLDLLSPQFISDLVSWGAIGARTTESQSHRQLASGLSCPVGFGNGDGGVAVAA
DAH2.BQ1       LPVGTFLDLLSPQFISDLVSWGAIGARTTESQSHRQLASGLSCPVGFGNGDGGVAVAA
aroG.Ecoli      LPAAGEFLDMITPQYLDLNSWGAIGARTTESQVHRELASGLSCPVGFGNGDGTIRVAI
DAH1.BQ1       VPAGEFLDVISPQYICDLISWGAIGARTTESQVHRELASGLSAPIGFGNGDGMIRIAT
DAH1.BC        VPAASEFLDVISPQYICDLISWGAIGARTTESQVHRELASGLSAPIGFGNGDGMIRIAT
DAH1.K601      VPAASEFLDVISPQYICDLISWGAIGARTTESQVHRELASGLSAPIGFGNGDGMIRIAT
                : : *
                * * *

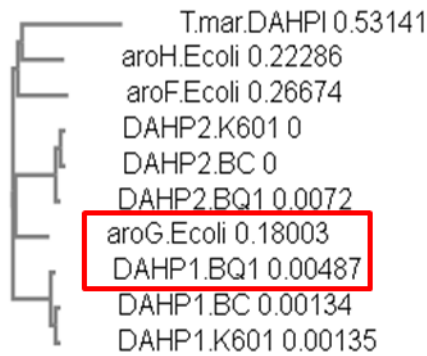
T.mar.DAHP1      EFLLSAE---YIANSQNTKIIL-----CERGIPTFEKATNTLDSAVPIIRNESH
aroF.Ecoli      NAMFAAAAPHFVFGINQAGVALLQTQGNPDGHVILRGGKAPNYSADVAQCEKEMEQAQ
aroH.Ecoli      DAIFAARASHNFLSPDNGQNTIYVTSNCPYCHIIMRGGKPNYHADIAACDTHLEDF
DAH2.K601       DAIQAAQAPAFHNGHTKNGQAAIFETRGNRDCHVILRGGKAPNYGAADVQAACDLEKAG
DAH2.BC        DAIQAAQAPAFHNGHTKNGQAAIFETRGNRDCHVILRGGKAPNYGAADVQAACDLEKAG
DAH2.BQ1       DAIQAAQAPAFHNGHTKNGQAAIFETRGNRDCHVILRGGKAPNYGAADVQAACELEKAG
aroG.Ecoli      DAINAAGAPHCFLSVTKWGSVAIVNTSGNDCCHIILRGGKPNYSAKHVAEYKGLNKAQ
DAH1.BQ1       DAIQASRGGHFLSVHNGQVAIVRTSGNDCHVILRGGKAPNYDAASVAACADLEKAG
DAH1.BC        DAIQASRGGHFLSVHNGQVAIVRTSGNDCHVILRGGKAPNYDAASVAACADLEKAG
DAH1.K601      DAIQASRGGHFLSVHNGQVAIVRTSGNDCHVILRGGKAPNYDAASVAACADLEKAG
                : : *
                * * *

T.mar.DAHP1      LP--ILVDPSSHGGRRDLVPLSPAA-----IAVGAH--GIIVEVHPEK-----
aroF.Ecoli      LRPFLMVDCSHGNSNDYRQPAVAESVVAQIKDGNPSIIGLMIESNIHEGNSSEQR-
aroH.Ecoli      LPEHLVYDFSHGNCQKRRQLEVEDICQIQINGSTAIAGIMAESFLREGTQKIVGSGQ-
DAH2.K601       QRAQVMIDLSHANSSKQHQARQITVAAEVARQIAAGDARITGVMIESHLEEGRDIVPQG-
DAH2.BC        QRAQVMIDLSHANSSKQHQARQITVAAEVARQIAAGDARITGVMIESHLEEGRDIVPQG-
DAH2.BQ1       QRAQVMIDLSHANSSKQHQARQITVAAEVASQIAAGDARITGVMIESHLEEGRDIVPQG-
aroG.Ecoli      LPAQVMIDLFSHANSSKQFKQMDVCAVVCQIAGGKAIIGVHVESHLVEGNSLESCE-
DAH1.BQ1       LPAFLMVDCSHANSSKQHERQDVFANDIAAQIAGGSRVFGVMIEGHLQPGAQKFTPGD
DAH1.BC        LPAFLMVDCSHANSSKQHERQDVFANDIAAQIAGGSRVFGVMIEGHLQPGAQKFTPGD
DAH1.K601      LPAFLMVDCSHANSSKQHERQDVFANDIAAQIAGGSRVFGVMIEGHLQPGAQKFTPGD
                : : *
                * * *

T.mar.DAHP1      ---ALSDGKQSLDFEL-FNELVQEMKLDALGVK-VN---
aroF.Ecoli      --SEMIGVSVTDACISVEMTDALLEIHQDLNGQLTARVA
aroH.Ecoli      ---PLTYGQSIITDPLGVEDTERLVEKLSAVDTN-F---
DAH2.K601       ---ALPHGVSVTDACISFAQTVPVLEQLAAAVRAR-FAAAS
DAH2.BC        ---ALPHGVSVTDACISFAQTVPVLEQLAAAVRAR-FAAAS
DAH2.BQ1       ---ALPHGVSVTDACISFAQTVPVLEQLAAAVRAR-FAAAS
aroG.Ecoli      ---FLAYGKSIITDACLGVDDTALLRQLANAVKAR-FG---
DAH1.BQ1       DPAALEYGKSIITDACLGVDDSVACLAE LASAVQAR-FAR--
DAH1.BC        DPAALEYGKSIITDACLGVDDSVACLAE LASAVQAR-FAR--
DAH1.K601      DPAALEYGKSIITDACLGVDDSVACLAE LASAVQAR-FAR--
                : : *
                * * *

```

**Figura 16. Alineamiento de las DAHP sintasas de BQ1 con otras DAHP sintasas.** DAHP1.BQ1, DAHP sintasa mutada; DAHP2.BQ1 otra DAHP sintasa encontrada en el genoma de BQ1; DAHP1 y DAHP2.BC/K601 son homólogas a DAHP1 y DAHP2 de BQ1, respectivamente. AroF, aroG y aroH.Ecoli corresponden a DAHP sintasas clase I de *E. coli* cepa K. T.mar.DAHP1, DAHP sintasa clase 1 de *Thermotoga maritima* como grupo externo (Clustal ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)))



**Figura 17. Árbol filogenético de DAHP sintasas de BQ1 y otras DAHP sintasas de *Escherichia coli*.** El recuadro rojo marca la ubicación de la DAHP sintasa de *Alicyclophilus* sp BQ1 donde cayó el transposón. BC y K601, *Alicyclophilus denitrificans* cepa BC y K601, respectivamente. AroF, AroG y aroH DAHP sintasas clase I de *E. coli* (ClustalW2 ([www.ebiac.uk](http://www.ebiac.uk))).

Como ya se mencionó anteriormente, en *E. coli* el gen *aroG*, que codifica la isoforma de DAHP sintasa regulada por fenilalanina, se expresa como un transcrito monocistrónico. La DAHP sintasa mutada de BQ1 presenta una mayor identidad con esta isoforma que con las otras dos DAHP sintasas presentes en *E. coli*. A razón de conocer si el gen que codifica la DAHP sintasa mutada de BQ1 pudiera ser expresado monocistrónicamente de la misma forma que lo es en *E. coli*, o si por el contrario se encuentra organizado en un operón, se realizó primeramente un análisis bioinformático de posibles operones ([operons.ibt.unam.mx](http://operons.ibt.unam.mx)) para este gen en las betaproteobacterias y se encontró que el arreglo génico reportado en *E. coli* se encuentra conservado en algunas betaproteobacterias, o bien, como en el caso de BQ1, se encuentran con un gen río abajo que codifica enzimas no caracterizadas o de función desconocida (Figura 18).



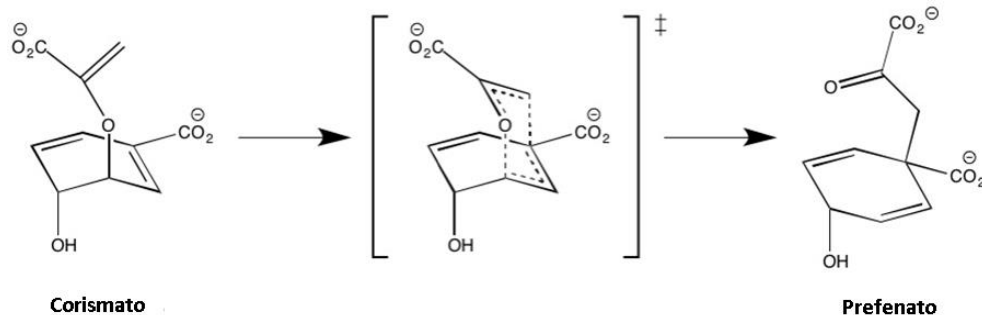
**Figura 18. Arreglo génico para la isoforma de DAHP sintasa regulada por triptófano en algunas betaproteobacterias.** Se representa en color amarillo al gen *aroH* que codifica para DAHP sintasa; el resto de los genes mostrados codifican para enzimas no caracterizadas o de función desconocida ([operons.ibt.unam.mx](http://operons.ibt.unam.mx)).



En BQ1 se encontraron dos genes que codifican DAHP sintasas, lo cual podría significar que la regulación de alguna o de ambas, podría estar dada por más de un aa aromático, como en el caso de *C. glutamicum*. Dado que la DAHP sintasa es el principal punto de regulación de la entrada de carbono hacia la vía del shikimato, la cual es vital para las bacterias, el hecho de que uno de los dos genes que codifican para estas enzimas esté mutado por el transposón, sugiere que con sólo una de las dos enzimas es suficiente para suministrar el carbono necesario para esta vía y de esta forma se explicaría porque la mutante no es auxótrofa.

### 7.6. Análisis de la Corismato mutasa presente en *Alicyclophilus sp.* BQ1

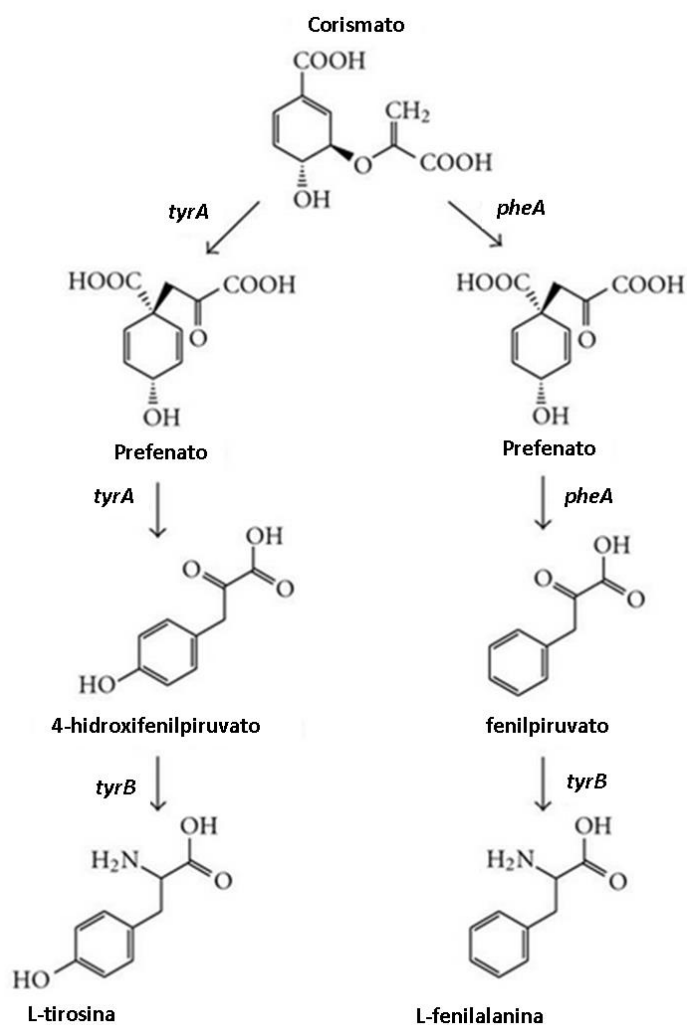
La corismato mutasa (CM) (EC 5.4.99.5.) es una enzima que actúa sobre el corismato, producto final de la vía del shikimato, para producir prefenato a través de la formación de un intermediario inestable (Figura 19) y su actividad constituye el primer paso en la vía de síntesis de tirosina y fenilalanina.



**Figura 19. Reacción catalizada por la corismato mutasa.** Mediante un rearrreglo sigmatrópico entre los enlaces C-C (rearrreglo Claisen) se provoca un estado de transición momentáneo del corismato antes de convertirse a prefenato (Gray y Knowles, 1994).

En el segundo paso, el prefenato puede ser descarboxilado por dos distintas enzimas, la prefenato deshidrogenasa (PDH) o la prefenato deshidratasa (PDT) produciendo 4-hidroxifenilpiruvato y fenilpiruvato, precursores directos de tirosina y fenilalanina respectivamente. En *E. coli*, las CMs están fusionadas con alguna de estas dos actividades enzimáticas (enzimas tipo AroQ), es decir, son enzimas

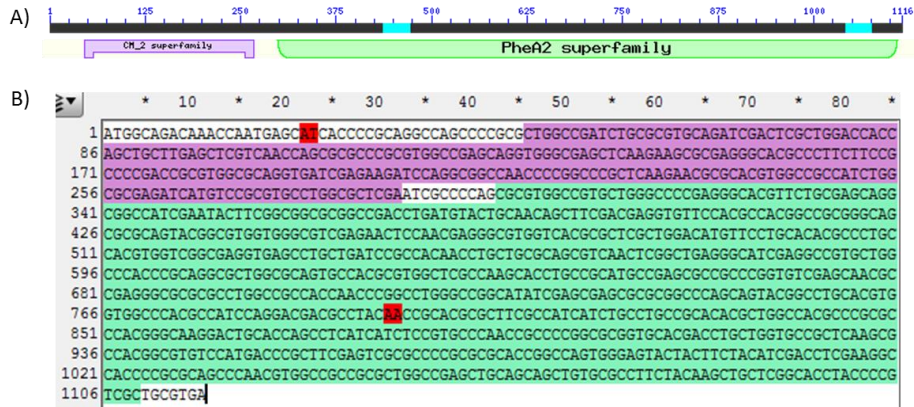
bifuncionales que realizan ambos pasos sucesivos (Figura 20), aunque en otros organismos estos pasos son catalizados por dos enzimas distintas. Con base en esto, las CMs pueden ser agrupadas en dos clases, AroH y AroQ.



**Figura 20. Biosíntesis de tirosina y fenilalanina en *E. coli*.** El gen *tyrA* codifica una enzima bifuncional con actividades CM y PDH; *pheA* codifica una enzima bifuncional con actividades CM/PDT; *tyrB*, codifica la tirosina aminotransferasa (Prabhu y Hudson, 2010).

Las **AroH** son enzimas monofuncionales que forman una estructura de barril  $\alpha/\beta$ . Están presentes principalmente en firmicutes y cianobacterias y pueden encontrarse

o no agrupadas en operones con otras enzimas de las rutas del corismato. El nombre de esta clase no debe confundirse con el nombre anteriormente mencionado para la clasificación de las tres isoformas de la DAHP sintasa reportadas en *E. coli*, ya que aunque son dos actividades catalíticas distintas, ambas son reportadas con el mismo nombre en el GenBank. Las **AroQ** son proteínas con enrollamiento  $\alpha$ -hélice que pueden presentar otro dominio catalítico diferente además de la actividad CM (Dosselaere y Vanderleyden, 2001). Esta clase presenta cinco tipos distintos de organización estructural y catalítica: las enzimas **AroQp** tienen el dominio CM fusionado a un dominio PDT, las **AroQt** tienen el dominio CM fusionado al dominio PDH, las enzimas **AroQd** presentan el dominio CM fusionado a uno de DAHP sintasa. Por otro lado, los arreglos **AroQf** son CMs monofuncionales que no son reguladas alostéricamente, mientras que los arreglos **AroQr** son CMs monofuncionales que sí están reguladas por los productos finales de la biosíntesis de aa aromáticos (Lim et al., 2009). De acuerdo con esta clasificación, la CM de BQ1 afectada por el transposón presenta un arreglo tipo AroQp, ya que además de presentar el dominio CM se identificó también un dominio PDT, lo que sugiere que es una enzima bifuncional CM/PDT (Figura 21).



C) chorismate mutase [*Alicyclophilus denitrificans*]  
 Sequence ID: WP\_013518700.1 Length: 366 Number of Matches: 1  
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 366 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
676 bits(1744)	0.0	Compositional matrix adjust.	358/366(98%)	363/366(99%)	0/366(0%)	+1
Query 16	MSITPQASPALADLRVQIDSLDHQLLELVNQRARVAEQVGLKKREGTPFFRPDRVAQVI				195	
MS	TPQASPALADLRVQIDSLDHQLL+LVNQRARVAEQVGLKKREGTPFFRPDRVAQVI					
Sbjct 1	MSTTPQASPALADLRVQIDSLDHQLLQLVNQRARVAEQVGLKKREGTPFFRPDRVAQVI				60	
Query 196	EKIQAANPGPLKNAHVAAIMREIMSACLESPQRVAVLGPEGTFCQAAIEYFGGAADL				375	
EKIQ ANPGPLKNAHVAAIMREIMSACLESPQRVAVLGPEGTFCQAAIEYFGGAADL						
Sbjct 61	EKIQAANPGPLKNAHVAAIMREIMSACLESPQRVAVLGPEGTFCQAAIEYFGGAADL				120	
Query 376	MYCNSFDEVFHATAAGSAQYGVVGVENSMEGVVTRSLDMFLHTPCHVVGEVSLIRHMLL				555	
MYCNSFDEVFHATAAGSAQYGVVGVENSMEGVVTRSLDMFLHTPCHVVGEVSLIRHMLL						
Sbjct 121	MYCNSFDEVFHATAAGSAQYGVVGVENSMEGVVTRSLDMFLHTPCHVVGEVSLIRHMLL				180	
Query 556	RSVNSAEGIEAVLAHPQALAQCHAWLAKHLPHAEPRVSSNAEGARLAATNPWAGISSE				735	
RSVNSAEGIEAVLAHPQALAQCHAWLAKHLPHAEPRVSSN+EGARLAATNPWAGISSE						
Sbjct 181	RSVNSAEGIEAVLAHPQALAQCHAWLAKHLPHAEPRVSSNSEGARLAATNPWAGISSE				240	
Query 736	RAAQYGLHVVAHAIQDDAYNRTRFAIICLPHTLATPAPTGRDCTSLIISVPMRPGAVHD				915	
RAAQYGLHVVAHAIQDDAYNRTRFAIICLPHTLATPAPTGRDCTSLIISVPMRPGAVHD						
Sbjct 241	RAAQYGLHVVAHAIQDDAYNRTRFAIICLPHTLATPAPTGRDCTSLIISVPMRPGAVHD				300	
Query 916	LLVPLKRHGVSMTRFESRTPARTGQWEYFYIDLEGHPAQPNVaaalaelqqlcaFYKLLG				1095	
LLVPLK+HGVSMTRFESRTPARTGQWEYFYIDLEGHPA+ NVAAAAELAQQLCAFYKLLG						
Sbjct 301	LLVPLKRHGVSMTRFESRTPARTGQWEYFYIDLEGHPAEANVAAAAELAQQLCAFYKLLG				360	
Query 1096	TYPVAA 1113					
TYPVAA						
Sbjct 361	TYPVAA 366					

**Figura 21. Dominios presentes en la secuencia del gen afectado por el miniTn5 en las mutantes D.IV.28/J.XII.10.** A) Dominio de la superfamilia CM<sub>2</sub> (Corismato mutasa) (46-288 pb); dominio de la superfamilia PheA2 (Prenato deshidratasa) (298-1110 pb). Umbral de valor E específico del dominio (E-value) de  $8.44 \times 10^{-12}$  y  $4.12 \times 10^{-61}$ , respectivamente. B) Nucleótidos del gen que codifica para la CM/PDT. En rojo se marcan los sitios de inserción del miniTn5; en morado se muestra el dominio CM y en verde el dominio PDT. C) Secuencia de aa traducida a partir de los nucleótidos del gen CM/PDT de BQ1; BLAST realizado contra *Alicyclophilus denitrificans* BC ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

En *E. coli*, los genes *aroF* (DAHP sintasa regulada por tirosina) y *tyrA* conforman el operón de tirosina, en donde *tyrA* codifica la enzima bifuncional corismato mutasa/prenato deshidrogenasa (CM/PDH) o proteína T (Camakaris y Pittard,

1983). Esta proteína (arreglo AroQ<sub>t</sub>) está implicada en la biosíntesis de tirosina (Koch *et al.*, 1971) y es inhibida alostéricamente por ésta (Hudson *et al.*, 1983). Por otro lado, la corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM/PDT), también llamada proteína P (arreglo AroQ<sub>p</sub>), está implicada en la biosíntesis de fenilalanina. Esta enzima bifuncional lleva a cabo una reacción muy semejante a la CM/PDT pero es codificada por un gen que se expresa monocistronicamente y es inhibida alostéricamente por fenilalanina (Gething *et al.*, 1976). En otros organismos, en vez de existir enzimas bifuncionales como las descritas anteriormente, cada una de las reacciones es catalizada por dos polipéptidos distintos (Koch *et al.*, 1971; Schnappauf *et al.*, 1998), o bien, presentan una combinación que consiste en una de las proteínas bifuncionales (P o T) y otras proteínas monofuncionales. La proteína P bifuncional está ampliamente distribuida en bacterias Gram negativas, mientras que en otras bacterias se encuentra como enzimas monofuncionales. Por otro lado, la proteína T bifuncional está restringida a un clúster filogenéticamente estrecho de bacterias entéricas y unas pocas especies cercanamente relacionadas, mientras que la generalidad es que estas actividades se presenten como enzimas monofuncionales (Ahmad y Jensen, 1986).

En el genoma de BQ1 además del gen que codifica a la enzima bifuncional CM/PDT, la cual fue mutada por el transposón que teóricamente participa en la síntesis de fenilalanina, se encontró un gen que codifica una CM monofuncional (CE154\_18705) y un gen que codifica una PDH (Figura 12) las cuales podemos predecir participarían en la síntesis de tirosina. El gen PDH se localizó río abajo del gen de la CM/PDT mutado. Sin embargo, no se encontró ningún gen que codifique una CM/PDH bifuncional o una PDT monofuncional. Lo mismo se observó en los genomas de las cepas BC y K601<sup>T</sup>. Esto sugiere que la enzima CM/PDT, codificada por el gen mutado por el transposón, estaría realizando la conversión de corismato a prefenato y de prefenato a fenilpiruvato, para la síntesis de fenilalanina; mientras que la CM monofuncional y la PDH monofuncional podrían estar suministrando el prefenato para la síntesis de tirosina y transformando el hidroxifenipiruvato a tirosina respectivamente. Al mutarse el gen que codifica la enzima bifuncional CM/PDT, la mutación debería ser auxótrofa, sin embargo, no lo fue. Una explicación para este

resultado podría ser que la CM monofuncional suministre el prefenato necesario para la síntesis de ambos aa, pero sería necesaria una actividad que transforme prefenato a fenilpiruvato, para continuar con la síntesis de fenilalanina. Una posibilidad que podemos sugerir es que el gen de la PDH monofuncional encontrado río abajo del gen CM/PDT pueda estar llevando a cabo la descarboxilación del prefenato hacia ambos intermediarios: 4-hidroxifenilpiruvato y fenilpiruvato, para la síntesis de tirosina y fenilalanina respectivamente, para así tener el suministro de ambos aa aromáticos. Otra posibilidad es que exista en el genoma de BQ1 otro gen que no identificamos y que puede llevar a cabo esta reacción para la síntesis de la fenilalanina. Esto implicaría que el gen mutado en este trabajo y que generó una mutante incapaz de crecer en polioliol, debe ser específico para alguna reacción necesaria para la utilización del polioliol como fuente de carbono por la bacteria.

En un análisis de posibles operones de los aa aromáticos en *Bordetella bronchiseptica*, se reportó que en el arreglo génico donde se encuentra la proteína P (CM/PDT) se identificaron dos promotores putativos a 169 y 144 pb río arriba del codón de inicio del gen *gyrA* y secuencias repetidas invertidas de un terminador a 41 pb río abajo del codón de paro del gen *ihfB*, sugiriendo que el operón completo podría incluir todos los genes intermedios entre esas dos secuencias (McArthur *et al.*, 2003). Una organización muy similar se ha visto en *Pseudomonas sp.* (Xie *et al.*, 1999). Esto sugería que los genes contiguos a la CM/PDT de BQ1, organizados de manera semejante a *B. bronchiseptica*, y que codifican proteínas de la vía del shikimato, podrían también constituir un operón. Para analizar esto, primero se hizo un análisis bioinformático de los arreglos genómicos alrededor del gen que codifica a la CM/PDT en distintas betaproteobacterias usando el programa Prokaryotic Operon Predictor (ProOpDB) ([operons.ibt.unam.mx](http://operons.ibt.unam.mx)), encontrándose que el arreglo génico presente en BQ1 está conservado en otras betaproteobacterias. Particularmente el arreglo presente en *Acidovorax JS42* es muy similar al que presenta BQ1, a excepción del gen que codifica la citidilato kinasa que no está presente en BQ1 (Figura 22). Esto apoya la observación previa de que los seis

genes contiguos al gen que codifica a la proteína P podrían estar organizados como un operón.

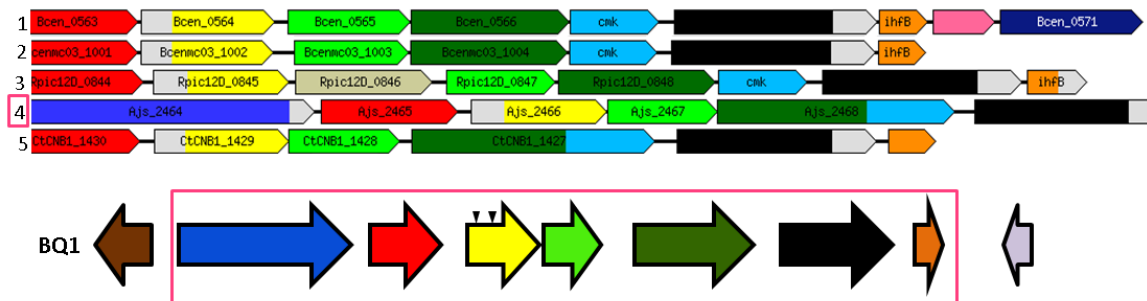


Figura 22. Arreglo genico de posibles operones para CM/PDT en algunas betaproteobacterias y BQ1. Arriba algunas especies de betaproteobacterias, abajo BQ1. En BQ1 se enmarcan los genes conservados con las betaproteobacterias. **■** L Type IIA Topoisomerasa (DNA gyrase/topo II/topoisomerase IV) A subunit; **■** phosphoserine aminotransferase; **■** chorismate mutase/prephenate dehydratase (CM/PDT); **■** prephenate dehydrogenase (PDH); **■** 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSP sintasa); **■** ribosomal protein S1; **■** citidylate kinase; **■** L-bacterial nucleoid DNA binding protein; **■** uncharacterized integral membrane protein; **■** G predicted N-acetylglucosaminyl transferase; **■** E Histidinol phosphate/ aromatic aminotransferase and cobyrinic acid decarboxylase. 1 y 2, *Burkholderia sp.*; 3, *Ralstonia picketti*; 4, *Acidovorax JS42*; 5, *Comamonas testosteroni*. Los genes que presentan dos colores, corresponden a proteínas con dos actividades catalíticas.

## 7.7. Análisis del regulador transcripcional tipo AsnC presente en *Alicyclyphilus sp.* BQ1

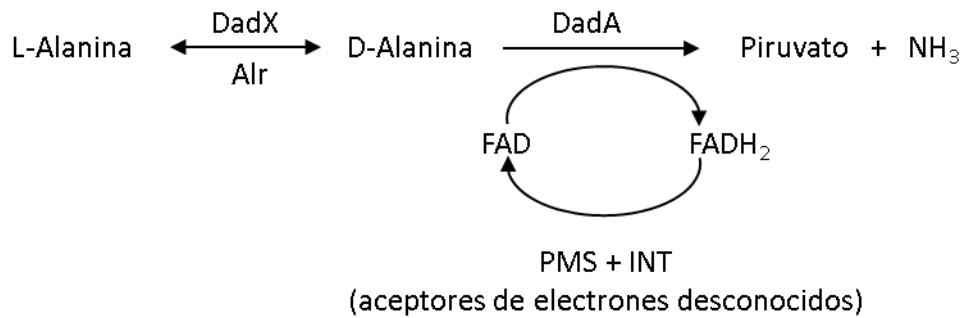
La proteína parecida al regulador transcripcional tipo AsnC (PF01037) contiene un dominio de unión al DNA, HTH tipo AsnC que está presente en los reguladores de transcripción de la familia AsnC/Lrp. Esta familia lleva el nombre por la proteína reguladora AsnC y la proteína reguladora en respuesta a leucina (Lrp), las cuales regulan la síntesis de asparagina y la regulación global de varios operones, respectivamente (Willins *et al.*, 1991). Estos reguladores se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias y arqueas (Charlier *et al.*, 1997; Napoli *et al.*, 1999). Además del dominio de unión al DNA HTH variable en el N-terminal presentan un dominio de unión efector característico en el C-terminal. Los miembros de esta familia influyen el metabolismo celular de forma global (Lrp) o específica (AsnC), frecuentemente en respuesta a aa exógenos efectores. Tienen una masa molecular de alrededor de 15 kDa y a la fecha no se han confirmado homólogos en

genomas eucarióticos, indicando que la familia está probablemente restringida a procariontes (Brinkman *et al.*, 2003).

El miembro mejor caracterizado de la familia es el regulador Lrp de *E. coli*, el cual controla un regulón global que abarca al menos el 10% de todos los genes de *E. coli* (Tani *et al.*, 2002). Los genes que pertenecen a este regulón codifican proteínas que están involucradas en transporte, degradación y biosíntesis de aa, así como un número pequeño de proteínas involucradas en la producción de pili, porinas, transportadores de azúcar y nucleótido transdeshidrogenasas (Calvo y Matthews, 1994; Newman y Lin, 1995). En contraste con Lrp, AsnC ha mostrado ejercer sólo control específico de *asnA* (asparagina sintasa A) (Colling *et al.*, 1985) y de su propio gen, regulando su propia expresión de una manera independiente de asparagina (Thaw *et al.*, 2006). Otro regulador transcripcional de *E. coli* recientemente caracterizado que pertenece a esta familia es YbaO, también conocido como decR (regulator of detoxification of cysteine), el cual regula al operón *yhaOM* que se encarga de la detoxificación de cisteína. Este operón se encuentra alejado del lugar en donde se encuentra el gen que codifica a YbaO, mientras que homólogos a este regulador en *Salmonella entérica* y *Pantoea ananatis* regulan al gen adyacente que codifica a la cisteína desulfhidrasa que controla la detoxificación de L-cisteína (Shimada *et al.*, 2016)

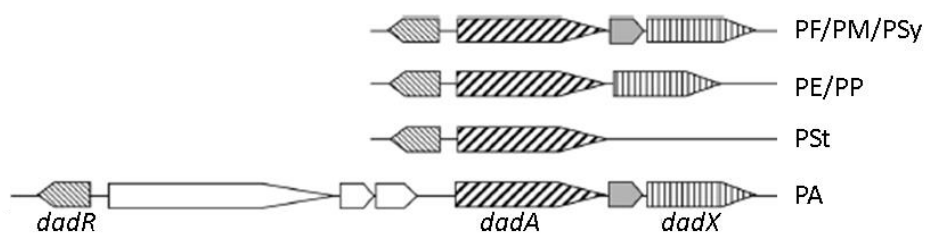
El arreglo génico que flanquea el gen en el que se insertó el transposón en BQ1 (Figura 12), es idéntico al operón *dadAX* en *E. coli*. En este operón se agrupan el gen *dadA*, que codifica la D-aminoácido deshidrogenasa y el gen *dadX*, que codifica la isoenzima degradativa alanina racemasa (Wild *et al.*, 1985). La racemasa convierte L-alanina en el isómero D, el cual es después oxidado a piruvato y amonio por la deshidrogenasa (Franklin and Venables, 1976) (Figura 23). Aunque en el caso de BQ1 el gen regulador fue identificado como AsnC y no como *dadR*, con base en la organización de los genes, es probable que este regulador AsnC pudiera estar regulando la expresión de los genes adyacentes de igual forma que lo hace Lrp (*dadR*) en *E. coli*. Lrp es un represor de *dadAX* (Mathew *et al.*, 1996) que es requerido para que *E. coli* pueda crecer usando alanina como única fuente de carbono y energía (Wild y Klopotoski, 1981).





**Figura 23. Funciones propuestas para DadA, DadX y Alr en el catabolismo de alanina.** DadA D-aminoácido deshidrogenasa, DadX y Alr alanina racemasas. PMS e INT aceptores de electrones desconocidos propuestos. (Modificado de Weiqing *et al.*, 2011).

El catabolismo de alanina también es mediado por este operón en otras bacterias Gram negativas. Además, se ha determinado la presencia de otra alanina racemasa (Alr) en una *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, que también está presente en *E. coli* (Wasserman *et al.*, 1983). En *Pseudomonas aeruginosa* la expresión de *dadAX* requiere DadR (Boulette *et al.*, 2009) que es un activador transcripcional de la familia Lrp (Brinkmann *et al.*, 2003). La organización de los genes en el locus *dadRAX* está altamente conservada en *Pseudomonas* excepto que existen tres genes adicionales insertados dentro de la región intergénica entre *dadA* y *dadX* que codifican proteínas hipotéticas en *P. aeruginosa* (Figura 24).



**Figura 24. Organización de genes del locus *dadRAX* en *Pseudomonas*.** Ortólogos de *dadRAX* están marcados igual. PA *Pseudomonas aeruginosa*, PE *P. entomophila*, PF *P. fluorescens*, PM *P. mendocina*, PP *P. putida*, PSt *P. stutzeri*, PSy *P. syringe*. (Weiqing *et al.*, 2011).

Con el objetivo de determinar la similitud entre distintas secuencias de este regulador tipo AsnC, se realizó un alineamiento múltiple con secuencias homólogas a este gen presentes en BC y K601<sup>T</sup>, distintos reguladores *dadR* (Lrp) de

*Pseudomonas* y los reguladores Lrp, AsnC e YbaO de *E. coli* (Figura 25A). Con base en este alineamiento se construyó un árbol filogenético (Figura 25B) en el que se muestra que el regulador transcripcional AsnC de BQ1 está más relacionado con sus homólogos presentes en BC y K601<sup>T</sup> y con respecto al resto de las secuencias está más relacionado con el regulador transcripcional dadR (Lrp) de *P. aeruginosa*, lo cual sugiere que podría estar regulando la expresión de los genes adyacentes que sirven para la conversión de L-alanina en D-alanina, es necesario hacer otro tipo de ensayos para verificar esto.

A)

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

cper.Lrp/AsnC      -----MEEILEVLEKNSRYTDQELAVMTGKTVEEVREAIRDYEEERSIIAG
eco.AsnC           -----HENYLIDNLDRGILEALHGNARTAYAEALAKQFGVSPGTIHVVRVEKHKQAGIITG
eco.Ybao           -----MLDKIDRKLALLQDDCTLSLQALAEAVNLTTTPCWKRLKREDDGILIG
eco.Lrp            MVDKSRKRPKGLDRIDRNILNELQDGRISNVELSKRVGLSPTPCLERVRRLEKQGFIQG
BQ1               -----MSELDSDLRILDLQDGRLLTHTELGERVGLSTSPCSQRVRRLEAQGVITG
BC                -----MSELDSDLRILDLQDGRLLTHTELGERVGLSTSPCSQRVRRLEAQGVITG
K601              -----MSELDSDLRILDLQDGRLLTHTELGERVGLSTSPCSQRVRRLEAQGVITG
pstu              -MRTQHQRRELDKIDRHILRLQAEGRLPFTELGERVGLSTTPCTERVRRLEREGIING
ppt               -MRTQHQRRELDKIDRNILRLQNDGRISFTELGERVGLSTTPCTERVRRLEREGIING
pau               -MRTQHQRRELDKIDRNILRLQEEGRISFTELGERVGLSTTPCTERVRRLEREGIING
                  : * * : . : . : : : : : : : : : *

cper.Lrp/AsnC      YTTLINWENTGREYVTALIEVQITPQRGVGFDKVAERIYKFPQVKACYLMSSGGFDLTVI
eco.AsnC           ARIDVSPKQLGY-DVGCFIGIIL--KSAKDYPSALAKLESLEDEVEAYTT-TGHYSIFIK
eco.Ybao           KVALLDPEKIGL-GLTAFVLIKQHHSSWYCRFVTVVTEMPEVLGFWRM-AGEYDYLNR
eco.Lrp            YTALLNPHYLDA-SLLVFVEITLNRGAPDVFQFNTAVQKLEEQECHLV-SGDFDYLLK
BQ1               YHARVSPAALGK-NLLVFVEITLAQKSEQIFKQVRDELQNMPEVLECHLI-SGSFDYLVK
BC                YHARVSPAALGK-NLLVFVEITLAQKSEQIFKQVRDELQNMPEVLECHLI-SGSFDYLVK
K601              YHARVSPAALGK-NLLVFVEITLAQKSEQIFKQVRDELQNMPEVLECHLI-SGSFDYLVK
pstu              YSARLNPQHLKA-GLLVFVEISLAYKSGDIFEEFRAVLKLPHVLECHLV-SGDFDYLVK
ppt               YNARLNPQHLKG-SLLVFVEISLDYKSGDTFEEFRAVLKLPHVLECHLV-SGDFDYLVK
pau               YHARLNPQHLKA-SLLVFVEISLDYKSGDTFEEFRAVLKLPHVLECHLV-SGHFDYLVK
                  : . : : : : : : : : : : : : : : : * : . :

cper.Lrp/AsnC      VEGKTMKEVAMFVSDKLSIQEYVTGTATHFVLKQYKDHGTIFREK-KTDDREMLFI----
eco.AsnC           VMCRSIDALQHVLIINKIQTIDEIQSTETLIVLQNPIMRTIKP-----
eco.Ybao           VQVADMKRYDEFYKRLVNSVPGLSVTSFAMEQIKYITTSLPLE-----
eco.Lrp            TRVPDMASRYRKLGETLLRPLPGVNDTRYVVMEEVKQSNRLVIKTR-----
BQ1               ARLAGMSEYRHLLGSILQMPVPAQNSYVVMEEVKESFVVPVDRGRGRARGAGAGQPLA
BC                ARLAGMSEYRHLLGSILQMPVPAQNSYVVMEEVKESFVVPVDRGRGRARGAGAGQPLA
K601              ARLAGMSEYRHLLGSILQMPVPAQNSYVVMEEVKESFVVPVDRGRGRARGAGAGQPLA
pstu              ARISEMASYRKLGDILLKLPHVRESKSYIVMEEVKEISLDLPVPD-----
ppt               ARISEMASYRKLGDILLKLPHVRESKSYIVMEEVKEISLDLPVPD-----
pau               ARISEMASYRKLGDILLKLPHVRESKSYIVMEEVKEISLDLPVPD-----
                  . : . : : : : : : : : : : : : : : :

```

B)

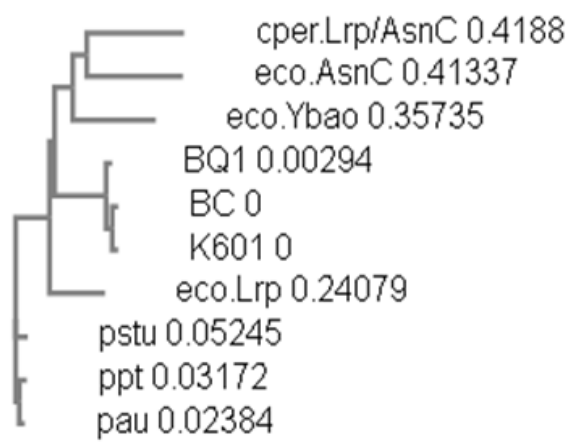
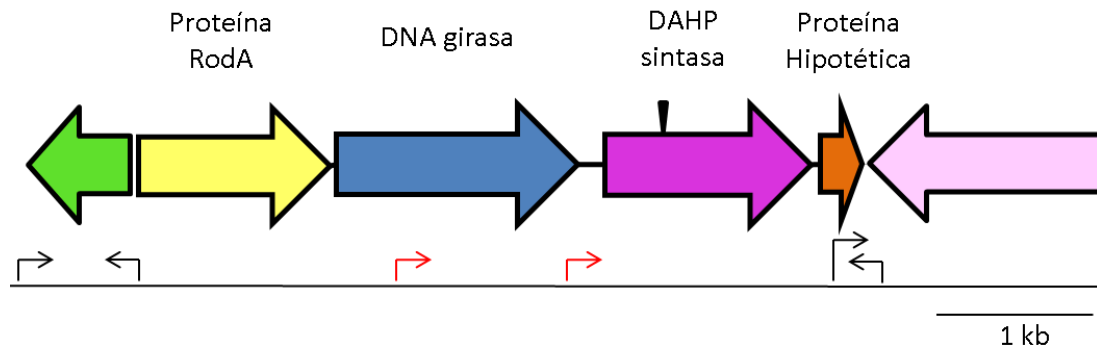


Figura 25. Relación filogenética de reguladores transcripcionales AsnC/Lrp de distintos organismos. A) Alineamiento de secuencias. BC y K601, *Alicyclophilus denitrificans* cepa BC y K601, respectivamente; ppt, *Pseudomonas putida*; pau, *P. aeruginosa*; pstu, *P. stutzeri*; eco, *E. coli*; cper, regulador transcripcional de la familia Lrp/AsnC de *Clostridium perfringens* usado como grupo externo. B). Árbol filogenético resultado de alineamiento de las secuencias. (Multiple Sequence Alignment ([www.ebiac.uk](http://www.ebiac.uk))).

## 7.8. Determinación de las unidades transcripcionales de los genes mutados

Se hicieron análisis bioinformáticos para determinar la presencia de posibles operones en los arreglos génicos de las mutantes. Para esto se identificaron posibles promotores, empleando los programas Neural Network Promoter Prediction ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org)) y BPROM ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)), y terminadores de la transcripción, empleando el programa ARNold finding terminators ([rna.igmors.u-psud.fr](http://rna.igmors.u-psud.fr)).

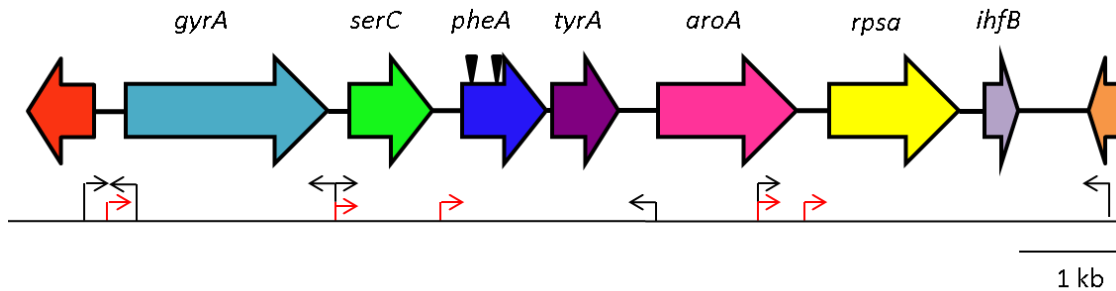
En la mutante E.III.100 (DAHPSintasa) al usar el programa en busca de promotores con el rigor marcado predeterminadamente ( $\geq 0.8$ ), no se detectaron promotores en la región río arriba del gen mutado. Sin embargo, cuando se empleó un valor de rigor de 0.6 se encontró un promotor río arriba del gen, a 165 pb del AUG y otro en la región codificadora en el gen precedente, a 1323 pb río arriba del AUG. Esto sugiere que el promotor más probable sería el que se localizó a 165 pb río arriba del AUG, sugiriendo que este gen se podría expresar de manera dicistrónica, incluyendo al gen que codifica a la proteína hipotética, localizado río abajo. No se encontraron terminadores (Figura 26).



**Figura 26. Análisis de promotores para la mutante E.III.100.** Las flechas en negro muestran promotores con un rigor  $\geq 0.8$ . Las flechas en rojo muestran los promotores detectados bajando el valor del rigor ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org)).

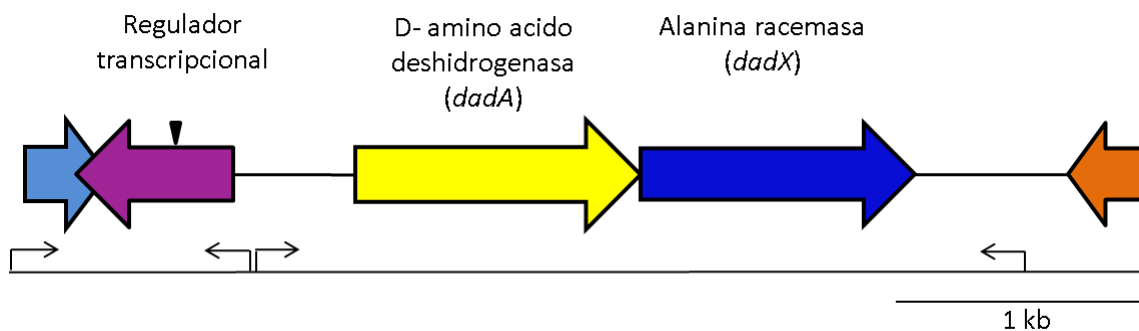
Para las mutantes D.IV.28/J.XII.10 (CM/PDT) se encontraron varios promotores identificados por los dos programas, pero no se detectaron secuencias terminadoras. Los promotores más probables podrían ser, uno localizado río arriba de *pheA*, el cual podría regular la transcripción a partir de *pheA*, u otro río arriba de

*serC*, que podría estar regulando la expresión a partir de ese gen. Debido a la distancia entre los genes *tyrA* y *aroA*, existe la posibilidad de que exista un promotor que el programa no haya detectado, lo cual implicaría que el promotor encontrado río arriba de *pheA* podría funcionar sólo para los genes *pheA* y *tyrA* (Figura 27).



**Figura 27. Análisis de promotores y terminadores dentro de las mutantes D.IV.28/J.X.II.10.** Las flechas en negro muestran promotores encontrados con Neural Network Promoter Prediction ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org)). Las flechas en rojo muestran los promotores detectados usando BROM ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)).

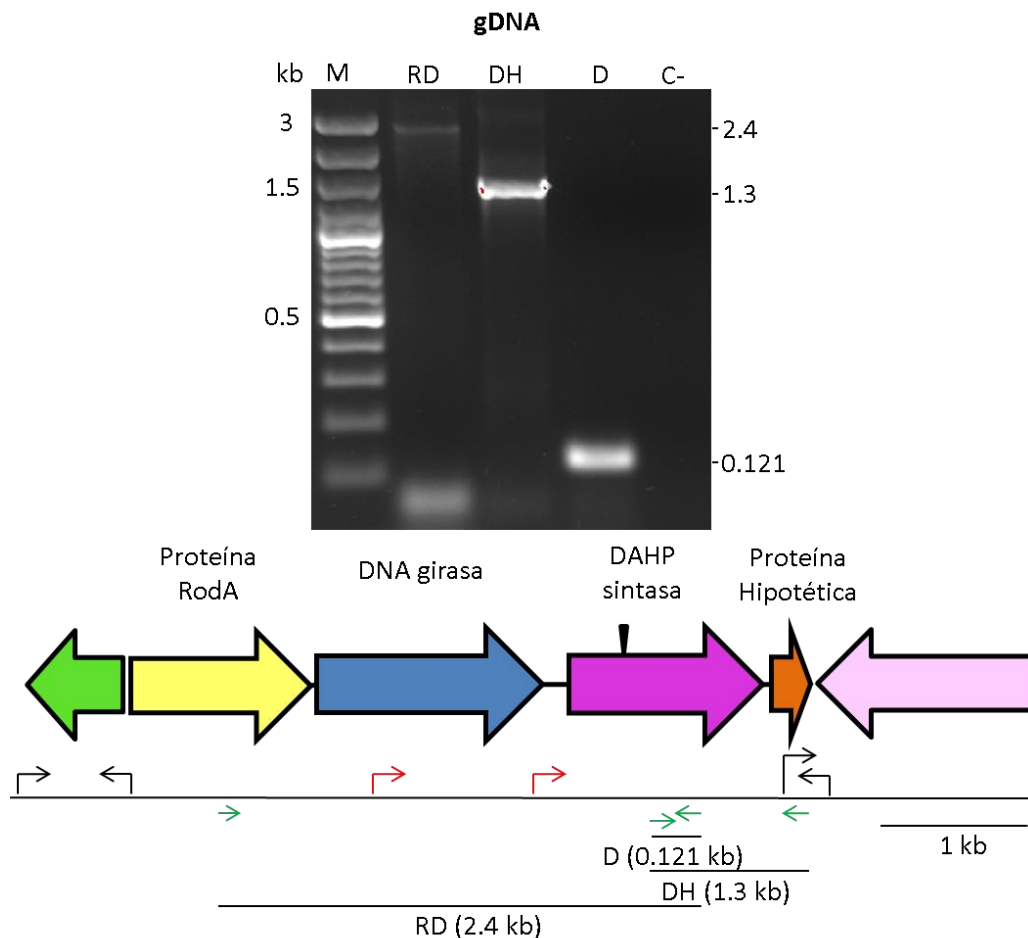
En la mutante H.I.20 (Regulador transcripcional tipo AsnC) se encontró un promotor a 50 pb de bases río arriba del AUG del gen mutado con el mismo sentido transcripcional, el cual parece ser el responsable de la transcripción de este gen. No se encontraron terminadores (Figura 28).



**Figura 28. Análisis de promotores para el arreglo génico de H.I.20.** Se identificaron cuatro promotores y ningún terminador (Neural Network Promoter Prediction ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org))).

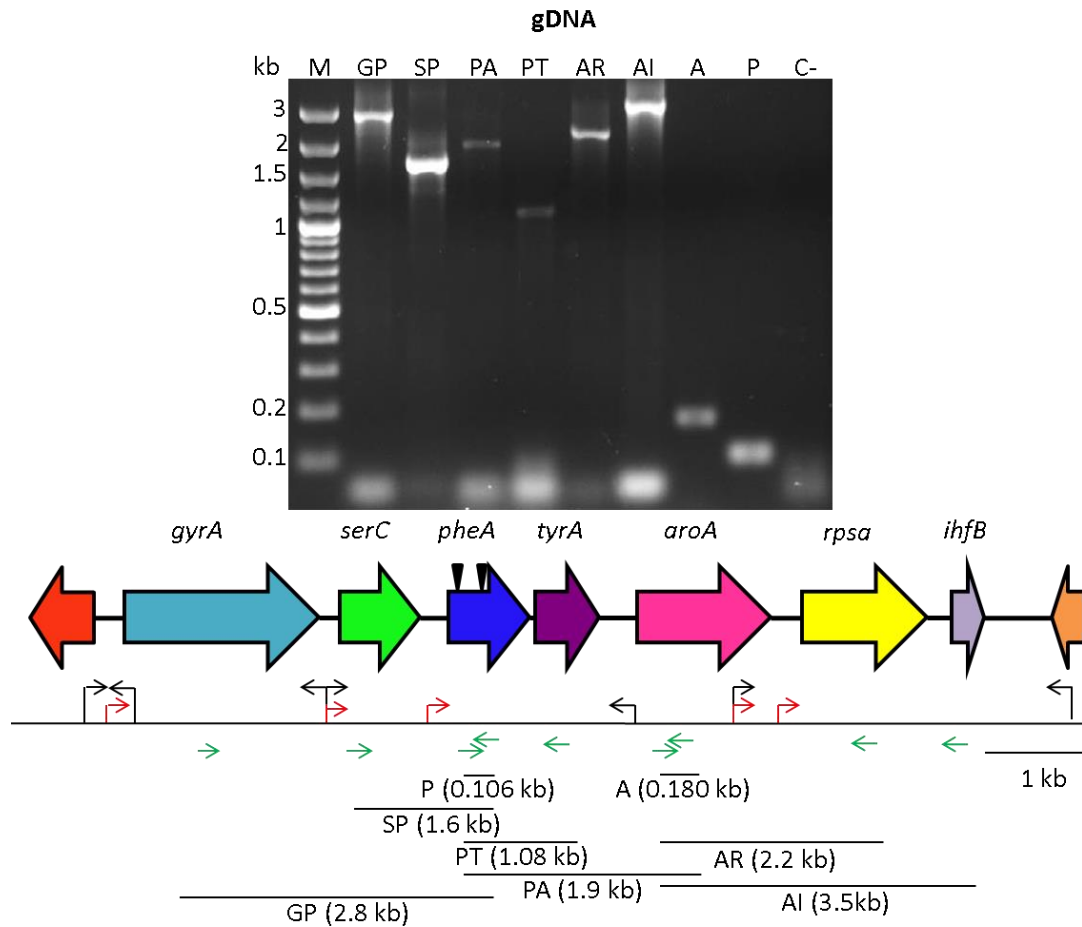
El siguiente paso para determinar cómo se expresaban los genes de interés y poder definir que fragmento se debía amplificar y clonar para realizar los ensayos de complementación, era realizar un análisis de RT-PCR. Para esto se diseñaron

oligonucleótidos intergénicos que pudieran determinar la existencia de mRNA con estas secuencias, para cada mutante. Las distintas combinaciones que intentaríamos amplificar sobre el cDNA, se probaron primero sobre el gDNA de BQ1. Para analizar los genes de interés correspondientes a la mutante E.III.100 (DAHP sintasa) se probaron tres pares de primers sobre gDNA de la cepa silvestre. Todos los fragmentos lograron ser amplificados mediante PCR cuando se empleó como molde DNA, lo que confirma que en el genoma de BQ1 estos genes son adyacentes (Figura 29).



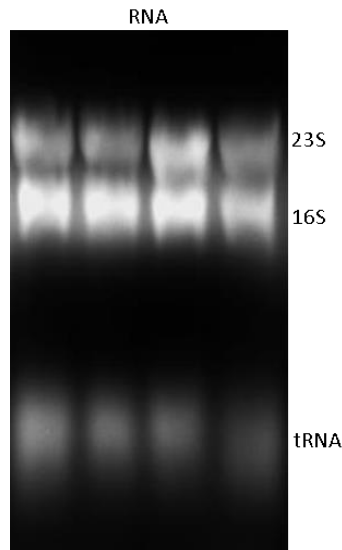
**Figura 29. Amplificación por PCR de segmentos de regiones intergénicas de la mutante E.III.100 empleando gDNA como molde.** En la parte superior se muestra el gel de agarosa 1% teñido con BrEt. M, marcador DNA de Lambda digerido con *HindIII*; C-, reacción sin gDNA. Los tamaños y los nombres de los fragmentos amplificados por PCR se muestran en la parte inferior. Las flechas en color verde representan los oligonucleótidos usados y las flechas rojas y negras representan los posibles promotores.

Para las mutantes D.IV.28/J.XII.10 (CM/PDT) se amplificaron siete fragmentos usando nueve oligonucleótidos en distintas combinaciones empleando gDNA como molde. Todos los fragmentos lograron ser amplificados mediante PCR (Figura 30).



**Figura 30. Amplificación por PCR de segmentos de regiones intergénicas de las mutantes D.IV.28/J.XII.10 empleando gDNA como molde.** En la parte superior se muestra el gel de agarosa 2% teñido con BrEt. M, marcador 1000 pb plus; C-, muestra sin cDNA. Los tamaños y nombres de los fragmentos amplificados por PCR se muestran en la parte inferior. Las flechas en color verde representan los oligonucleótidos empleados y las flechas rojas y negras representan los posibles promotores predichos bioinformáticamente.

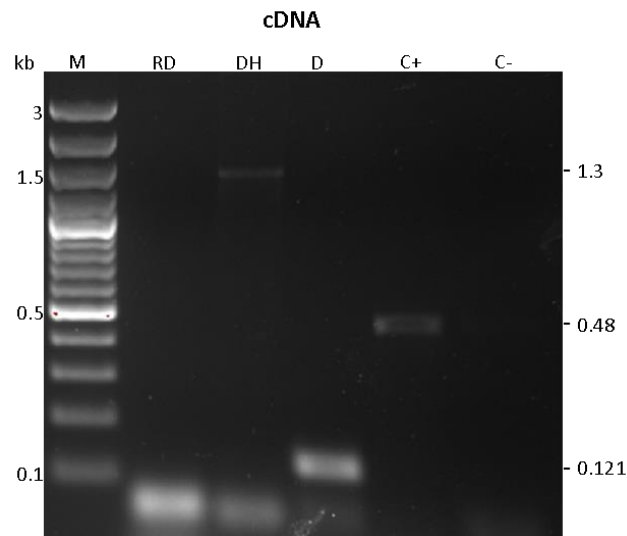
Una vez obtenidos estos resultados se prosiguió a la extracción de RNA total de BQ1 de las mutantes. Se obtuvieron cuatro muestras, en todas se apreciaron las subunidades ribosomales y el tRNA (Figura 31).



**Figura 31: Verificación de extracción y calidad de RNA total de *Alicyclophilus* sp. BQ1.** Gel de agarosa al 1%. Se corrieron las cuatro muestras de RNA total obtenidas. 23S y 16S, subunidades ribosomales rRNA; tRNA, RNA de transferencia.

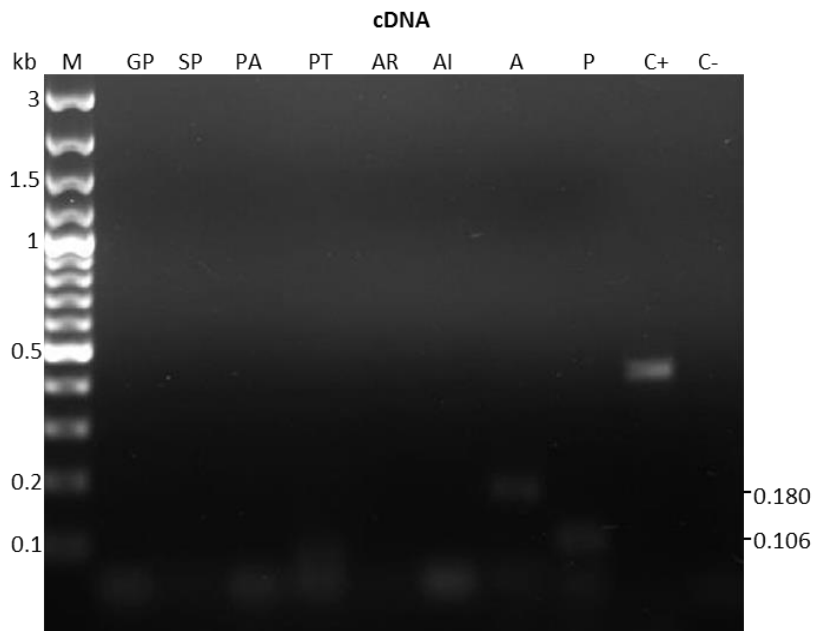
Se prosiguió con la síntesis de cDNA y se realizaron ensayos de RT-PCR. Como control positivo (I2-I3) se amplificó un fragmento de un par de genes (Antranilato fosforribosil transferasa y una proteína hipotética), que se expresaron tanto en RNA extraído de BQ1 crecida en LB como en MM-PolyLack<sup>®</sup> (datos no mostrados). En el caso del análisis de los genes relacionados con la mutante E.III.100 (DAHP sintasa) se aprecian bandas que corresponden al fragmento DH y al fragmento D, pero no para el fragmento RD, lo cual indica que los genes que codifican a la DAHP sintasa y a la proteína hipotética están siendo transcritos como un mismo mRNA. Este resultado concuerda con lo esperado, dada la información reportada previamente, referente a este gen en betaproteobacterias (Figura 32).





**Figura 32. Ensayo RT-PCR de la mutante E.III.100.** Gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt. M, marcador 1000 pb plus; C+, genes I2-I3; C-, mix de PCR sin cDNA.

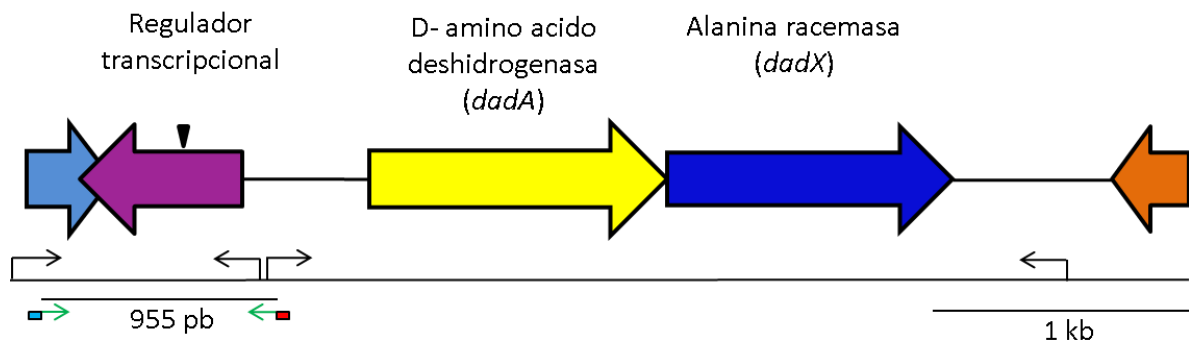
Para el análisis de los genes correspondientes a las mutantes D.IV.28/J.XII.10 se encontró que el gen *pheA*, que codifica para la CM/PDT se expresa como un mRNA monocistrónico (Figura 33). Será necesario confirmar estos resultados.



**Figura 33. Ensayo RT-PCR para la mutante D.IV.28/J.XII.10.** Gel de agarosa 2% teñido con BrEt. M, marcador 1000 pb plus; C+, genes (I2-I3); C-, muestra sin cDNA.

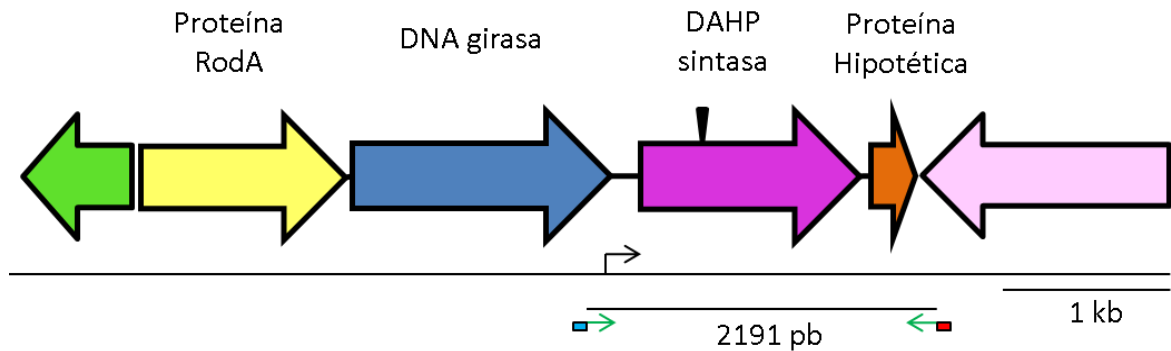
## 7.9. Ensayos para evaluar la recuperación del fenotipo de las mutantes

El último punto, fue demostrar que los genes mutados por el transposón están involucrados en la capacidad de BQ1 de usar MM-pp como única fuente de carbono mediante los ensayos de complementación. Con este fin se seleccionaron los distintos oligonucleótidos a utilizarse para cada mutante. En el caso de la mutante H.I.20 (regulador transcripcional tipo AsnC) se incluyó la región del posible promotor con el mismo sentido transcripcional al del gen del regulador transcripcional AsnC (955 pb) (Figura 34).



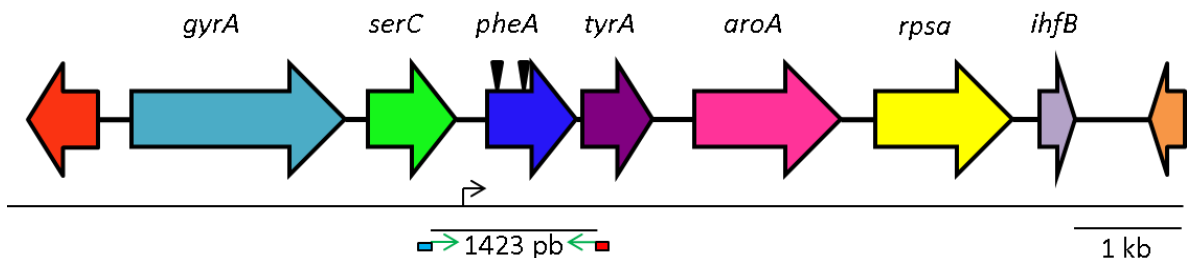
**Figura 34. Fragmento seleccionado para ensayos de complementación de la mutante H.I.20.** Se muestra el tamaño del fragmento seleccionado para los ensayos de complementación. Los oligonucleótidos se representan con flechas verdes y las enzimas de restricción que los flanquean se representan con un rectángulo azul (*HindIII*) y rojo (*XhoI*).

Para el análisis del gen interrumpido en la mutante E.III.100 (DAHP sintasa), se decidió incluir además del gen mutado, la proteína hipotética contigua y considerar funcional al posible promotor más cercano a estos genes río arriba del arreglo génico. Si bien se desconoce la función de la proteína hipotética, de acuerdo con el ensayo de RT-PCR, este gen es transcrito en el mismo mRNA de la DAHP sintasa, así que si la mutación tuviese un efecto polar, sería probable que afectara la expresión de ese gen, cuya proteína podría tener una actividad implicada en la utilización del poliéster-poliol como fuente de carbono, por lo que se tomó como parte del fragmento para los ensayos de complementación (Figura 35).



**Figura 35. Fragmento seleccionado para ensayos de complementación de la mutante E.III.100.** Se muestra el tamaño del fragmento seleccionado para los ensayos de complementación. La flecha negra representa el posible promotor. Los oligonucleótidos se representan con flechas verdes y las enzimas de restricción que los flanquean se representan con un rectángulo azul (*Hind*III) y rojo (*Bam*HI).

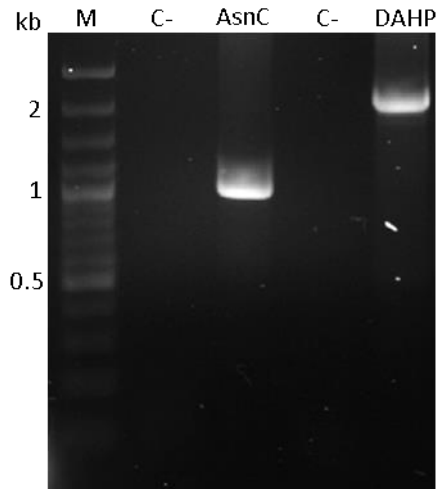
Para las mutantes D.IV.28/J.XII.10 (CM/PDT), de acuerdo con el ensayo de RT-PCR, en el que se vio que este gen se expresa en un mRNA de tipo monocistrónico, el fragmento a amplificar incluye solamente al gen afectado por el transposón y el promotor sugerido para su expresión, dando un total de 1423 pb (Figura 36).



**Figura 36. Fragmento seleccionado para ensayos de complementación de las mutantes D.IV.28/J.XII.10.** Se muestra el tamaño del fragmento seleccionado para los ensayos de complementación. La flecha negra representa al posible promotor. Los oligonucleótidos se representan con flechas verdes y las enzimas de restricción que los flanquean se representan con un rectángulo azul (*Hind*III) y rojo (*Xho*I).

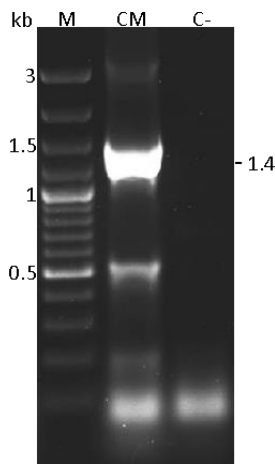
Los oligonucleótidos propuestos se mandaron a sintetizar, se probó su correcto funcionamiento usando *Taq* DNA polimerasa sobre gDNA, y se hizo la amplificación

para los ensayos usando la enzima Pushion High Fidelity DNA polimerasa. No se obtuvieron amplificaciones inespecíficas (Figura 37).



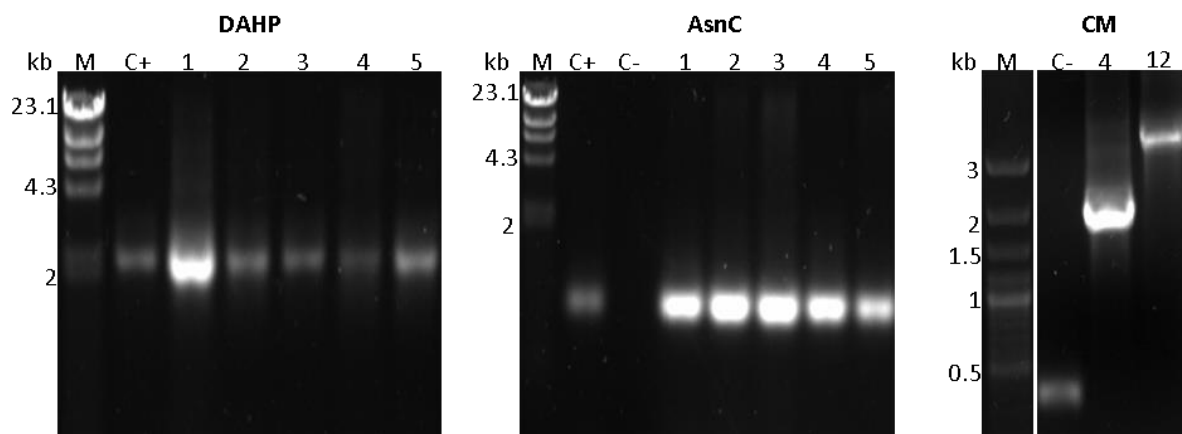
**Figura 37. Amplificación de los fragmentos para complementación de las mutantes E.III.100 y H.I.20.** M, marcador 1000 pb plus; C- control negativo (mix de reacción sin DNA); AsnC, H.I.20; DAHP, E.III.100.

En las mutantes D.IV.28/J.XX.10, los oligonucleótidos alinearon específicamente a distintas temperaturas, sin amplificaciones inespecíficas usando la enzima *Taq* DNA polimerasa; sin embargo, al usar la enzima Pushion High Fidelity DNA polimerasa, sí hubo amplificaciones inespecíficas. Se modificaron distintas concentraciones de magnesio para tratar de eliminarlas pero no se logró (datos no mostrados). Para subsanar este problema, se usó un kit de purificación por gel (Thermo Scientific) para purificar la banda correspondiente al tamaño esperado (1.4 kb) (Figura 38).



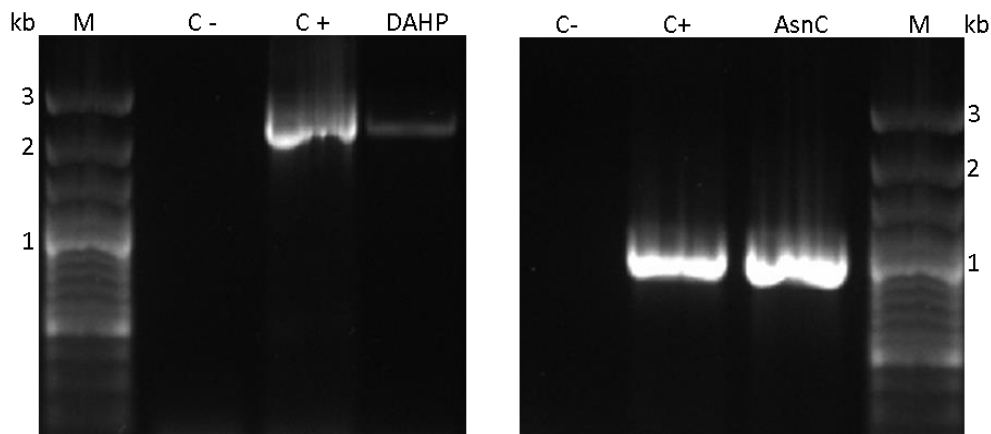
**Figura 38. Amplificación del fragmento para complementación de la mutantes D.IV.28/J.XII,10.** M, marcador 1000 pb plus; C-, mix de reacción sin DNA); CM, fragmento para mutantes D.IV.28/J.XII.10.

Los fragmentos correspondientes para complementar las cuatro mutantes (AsnC, DAHP, CM) y los vectores de clonación (pBBR1MCS-5) fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción y se hicieron los controles pertinentes sembrando en cajas de medio sólido LB Gm<sup>30</sup> bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con reacciones de autoligación de los vectores sin los insertos (T4 DNA ligasa (Thermo Scientific 10 U/ $\mu$ L)) para evaluar que ambas enzimas hubieran digerido adecuadamente y poder iniciar con el proceso de ligación con los fragmentos de las mutantes (datos no mostrados). Las reacciones de ligación vector/inserto se realizaron usando T4 DNA ligasa (Thermo Scientific 10 U/ $\mu$ L), y las reacciones se usaron para transformar células DH5 $\alpha$ . La selección de transformantes se hizo por  $\alpha$ -complementación. Las transformantes obtenidas se seleccionaron y se realizaron reacciones de PCR de colonia con los oligonucleótidos diseñados para los fragmentos DAHP y AsnC y con M13 para el fragmento CM como un primer criterio para determinar que las transformantes seleccionadas tuvieran el plásmido con el inserto de interés (Figura 39).



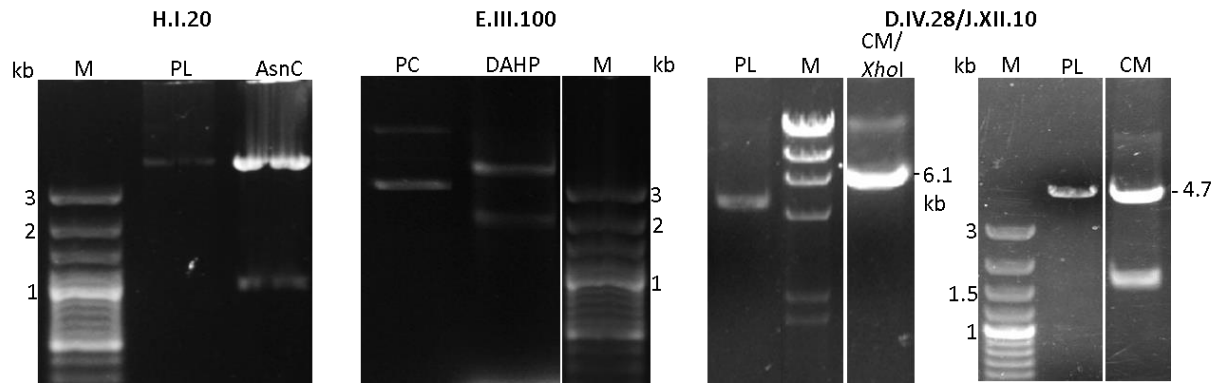
**Figura 39. PCR de colonias transformadas con las construcciones de las mutantes E.III.100, H.I.20 y D.IV.28/J.XII.10. DAHP**, construcción para complementar la mutante E.III.100; M, marcador DNA de Lambda cortado con *Hind*III; C+, molde DNA de BQ1; 1-5 colonias transformantes. **AsnC**, construcción para complementar la mutante H.I.20; M, marcador DNA de Lambda cortado con *Hind*III; C+, molde DNA de BQ1; C-, mix de PCR sin DNA; 1-5 colonias transformantes. **CM**, construcción para complementar la mutante D.IV.28/J.XII.10; M, marcador 1000 pb plus; C-, colonia con plásmido vacío; 4 y 12 células transformantes.

Como un segundo criterio, en las células transformadas con las construcciones para complementar las mutantes E.III.100 y H.I.20 se extrajo el plásmido por lisis alcalina y se realizó nuevamente ensayo de PCR con el plásmido, para asegurarnos que tenían el plásmido recombinante (Figura 40). Se observó la amplificación de fragmentos del tamaño correspondiente.



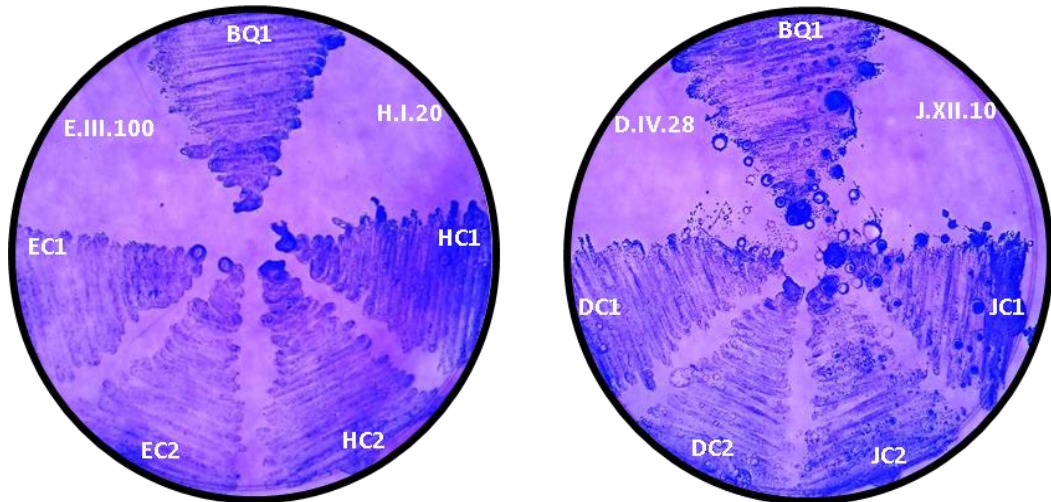
**Figura 40. PCR de plásmidos recuperados de células transformadas con las construcciones de las mutantes E.III.100 y H.I.20.** Lado izquierdo, construcción para complementar la mutante E.III.100; lado derecho, construcción para complementar la mutante H.I.20; M, marcador 1000 pb plus; C-, mix de PCR sin DNA; C+, molde DNA de BQ1.

En el caso de la mutante D.IV.28/J.XII.10 se hizo directamente la doble digestión del plásmido obtenido de las transformantes, que fue el tercer criterio empleado para las otras dos mutantes (Figura 41). En cada una de las digestiones se observó una banda de 4.7 kb correspondiente al plásmido linearizado y la banda del tamaño esperado para AsnC (955 pb), DAHP (2191 pb) y CM (1423 pb).



**Figura 41. Dobles digestiones de los plásmidos recombinantes de todas las mutantes.** M de **H.I.20**, marcador 1000 pb plus; M de **E.III.100**, marcador 1000 pb plus; M de **D.IV.28/J.XII.10** gel del lado izquierdo, DNA  $\lambda$  digerido con *HindIII*; M de **D.IV.28/J.XII.10** gel del lado derecho, marcador 1000 pb plus; PL, plásmido linealizado; PC, plásmido circular, CM/*XhoI*, plásmido recombinante digerido con *XhoI*, AsnC, DAHP y CM, plásmido recombinante doblemente digeridos de las mutantes H.I.20, E.III.100 y D.IV.28/J.XII.10, respectivamente.

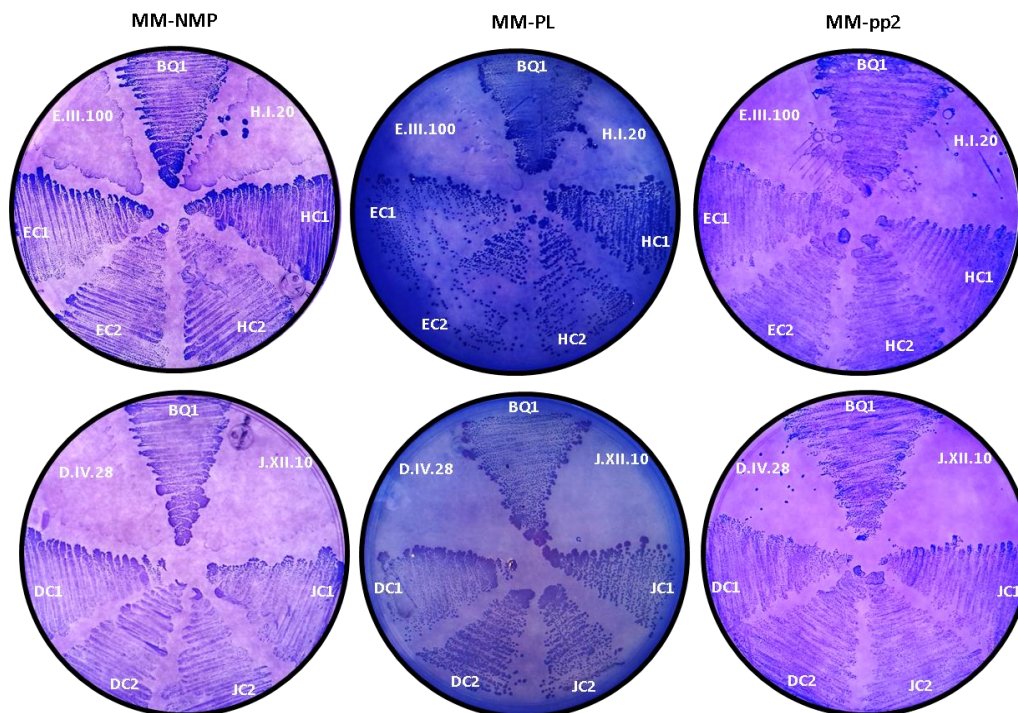
Los plásmidos recombinantes fueron transformados en *E. coli* S-17. Las cepas transformadas se emplearon para realizar las conjugaciones con las cepas mutantes y así introducir los plásmidos para las complementaciones correspondientes. Como resultado de las conjugaciones se obtuvieron células que recuperaron la habilidad de crecer en MM-pp (Figura 42). Estos resultados indican que se logró la complementación de todas las mutantes, y por lo tanto, los genes que habían sido afectados por el transposón están involucrados en la habilidad de BQ1 para degradar el poliéster-poliol Rymsapol<sup>®</sup>. A las células mutantes que recuperaron su capacidad de crecer en Rymsapol<sup>®</sup> se les extrajeron los plásmidos correspondientes y se enviaron a secuenciar para verificar que los genes clonados no tuvieran mutaciones. Ninguna secuencia presentó mutaciones en la región codificante (Anexo 2).



**Figura 42. Complementación de mutantes.** Cajas con MM-pp teñido con azul de Coomassie 0.3%. BQ1, C+; E.III.100, H.I.20, D.IV.28 y J.XII.10, mutantes afectadas por el transposón; EC1 y EC2, exconjugantes de E.III.100, HC1 y HC2, exconjugantes de H.I.20; DC1 y DC2, exconjugantes de D.IV.28; JC1 y JC2, exconjugantes de J.XII.10.

Las colonias recuperadas fueron también probadas en los otros medios selectivos con los que se trabaja en nuestro laboratorio: MM-NMP, MM-PL y otro poliéster-poliol (MM-pp2), sobre los cuales las mutantes también habían perdido la habilidad de crecer; en todos los casos las mutantes complementadas fueron capaces de crecer nuevamente (Figura 43). Esto indica que las actividades de las proteínas codificadas por los genes mutados podrían no ser exclusivas para la capacidad de crecer en el poliéster-poliol (MM-pp y MM-pp2), sino que también podrían estar involucradas en la asimilación de otros compuestos relacionados con los poliuretanos, como el NMP, y con el poliéter poliuretano usado en nuestro laboratorio, MM-PL PolyLack®. En qué parte específicamente del proceso de asimilación de estos compuestos, no lo sabemos con certeza pero con base en el tipo de mutantes encontradas podemos decir que en rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de aminoácidos.





**Figura 43. Caracterización de mutantes complementadas.** MM-NMP (cosolvente de PUs), MM-PL (PE-PU, PolyLack ) y MM-pp2 (poliéster-poliol), distintos medios selectivos usados en nuestro laboratorio. BQ1, C+; E.III.100, H.I.20, D.IV.28 y J.XII.10, mutantes afectadas por el transposón; EC1 y EC2, exconjugantes de E.III.100, HC1 y HC2, exconjugantes de H.I.20; DC1 y DC2, exconjugantes de D.IV.28; JC1 y JC2, exconjugantes de J.XII.10. Cajas teñidas con azul de Coomassie 0.3%.

## 8. Conclusiones

En las cuatro mutantes de *Alicyclophilus* sp. BQ1, seleccionadas por su incapacidad de crecer en el poliéster polioliol Rymsapol<sup>®</sup> (MM-pp) la inserción del transposón fue en genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de aa aromáticos y la regulación del metabolismo de algunos D-aa: una proteína semejante al regulador transcripcional de la familia Lrp/AsnC (mutante H.I.20), que podría regular los genes que codifican la DadA (D-aa deshidrogenasa), el cual convierte la mayoría de los D-aa en cetoácidos y la DadX (alanina racemasa), que se encarga de la conversión de L-alanina en D-alanina y participa en el metabolismo de alanina y aspartato; y dos enzimas que participan en la biosíntesis de aa aromáticos, una de ellas en la vía del shikimato, la DAHP sintasa (mutante E.III.100) y la otra, la corismato mutasa, que participa en la síntesis de prefenato (precursor de tirosina y fenilalanina), de la cual se identificaron dos mutantes (J.XII.10 y D.IV.28). El hecho de que dos de las mutantes caracterizadas tengan la inserción del transposón en un mismo gen, sugiere fuertemente que la enzima codificada, la CM/PDT, debe tener una participación muy importante en la utilización del poliéster-polioliol por parte de *Alicyclophilus* sp BQ1.

Contrario a lo que esperábamos, ninguna de las actividades de las enzimas cuyos genes se vieron afectados por el transposón posee actividad esterasa, ni otro tipo de actividad hidrolítica que pudiera explicar la degradación del poliéster-polioliol. Por tal motivo, la participación que desempeña cada una de las enzimas en la asimilación de Rymsapol<sup>®</sup> es todavía desconocida. Una posibilidad es que las enzimas identificadas actúen en vías metabólicas posteriores a la fragmentación del polioliol y tomen productos más pequeños de esta ruptura para incorporarlos al metabolismo central.

Se ha sugerido que el primer paso de la degradación del PU es iniciado por la adhesión de enzimas asociadas a membrana a la superficie del PU, seguida por la hidrólisis de distintos enlaces en el polímero (ésteres y uretano) y la liberación de monómeros y otros fragmentos que constituyen el PU (Howard, 2012; Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Lo que encontramos con este trabajo sugiere que los monómeros liberados tras la ruptura del poliéster-polioliol entran en rutas del

metabolismo central, como la vía del shikimato, en donde la DAHP sintasa regula la entrada de carbono necesaria para la vía; o bien en la síntesis de aa aromáticos, en donde la CM hace la conversión de corismato a prefenato, el cual puede ser transformado a fenilalanina o tirosina. La posibilidad de que estas enzimas tengan alguna otra actividad catalítica no es algo que esté reportado en la literatura y dada la naturaleza de ambas, parece poco probable. Sin embargo, se requiere de más análisis para poder dilucidar su mecanismo de acción sobre este precursor del PU.

## 9. Perspectivas

Entre las perspectivas de este trabajo estarían: a) realizar un análisis de los monómeros obtenidos una vez que la bacteria rompe el poliéster-poliol y tratar de comprender cómo es que éstos llegan a las rutas identificadas en este trabajo; b) purificar las enzimas ya identificadas y evaluar si presentan alguna actividad catalítica distinta a la reportada en la literatura; c) mutar las otras enzimas DAHP sintasa y CM presentes en BQ1 y evaluar si de esta forma BQ1 también pierde la capacidad de degradar poliéster-poliol; d) realizar mutaciones dirigidas hacia los genes que codifiquen esterases presentes en BQ1 para tratar de identificar aquellas implicadas en la ruptura inicial del poliéster-poliol; e) determinar si la expresión de los genes que identificamos en este trabajo es inducible en medios de cultivo conteniendo poliéster-poliol o si es constitutiva; f) probar que el mecanismo que *Alicyclophilus* sp. BQ1 utiliza para degradar poliéster-poliol, es el mismo que utiliza en la degradación de PS-PU.

## Bibliografía

- Ahmad S, Jensen RA. 1986. The evolutionary history of two bifunctional proteins that emerged in the purple bacteria. *Trends Biochem Sci* 11:108-112.
- Ahmad S, Jensen RA. 1988. The phylogenetic origin of the bifunctional tyrosine-pathway protein in the enteric lineage of bacteria. *Mol Biol Evol* 5:282-297.
- Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl Environ Microbiol* 64:62-67.
- Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1999. Purification and properties of culture broth secreted esterase from the polyurethane degrader *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Biosci Bioeng* 88:484-487.
- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:422-429.
- Ausubel FM. 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol 1. Unidad 2.4 suplemento 24. John Wiley & Sons.
- Brinkman AB, Ettema TJG, de Vos WM, der Oost J. 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol* 48:287-294.
- Boutin M. 2004. Identification of the isocyanates generated during the thermal degradation of a polyurethane car paint. *J Anal App Pyrol* 71:791-802.
- Boulette ML, Baynham PJ, Jorth PA, Kukavica-Ibrulj I, Longoria A, Barrera K, Levesque RC, Whiteley M. 2009. Characterization of alanine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and its importance for proliferation *in vivo*. *J. Bacteriol* 191:6329-6334.
- Calvo JM, Matthews RG. 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58:466-490.
- Camakaris H, Camakaris J, Pittard J. 1980. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: control of the *aroF*-*tyrA* operon in the absence of repression control *J Bacteriol* 143:613-620.
- Casarrubias-Ríos D. 2010. Construcción de una biblioteca genómica de *Alicyclophilus* sp. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Charlier D, Roovers M, Thia-Toong TL, Durbecq V. and Glansdorff N. 1997. Cloning and identification of the *Sulfolobus solfataricus* *lrp* gene encoding an archaeal homologue of the eubacterial leucine responsive global transcriptional regulator Lrp. *Gene* 201: 63-68.
- Craig C, Klau M. 1985. Operator Mutations of the *Escherichia coli* *aroF* Gene. *J. Biol Chem.* 260: 30820-3825.
- Davies B, Davidson E. 1982. Structure of a human  $\beta$ -actin-related pseudogene which lacks intervening sequences. *Nucleic Acids Res* 13:4045-4058.
- De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal

- insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172:6568-6572.
- Dosselaere F, Vanderleyden J. 2001. A metabolic node in action: Chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 27:75-131.
- Franklin FCH, Venables WA. 1976. Biochemical, genetic and regulatory studies of alanine catabolism in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* 149:229-237.
- Gautam R, Bassi AS, Yanful EK. 2007. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. Humana Press Inc. 141:85-108.
- Gething M-JH, Davidson BE, Dopheide TAA. 1976. Chorismate mutase/prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K12. Effect of phenylalanine, NaCl and pH on the protein conformation. *Eur J Biochem.* 71:317-325.
- Gray JV, Knowles JR. 1994. Monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*: FTIR studies and the mechanism of action of the enzyme. *Biochem.* 33:9953-9959.
- Grove C, Gunsalus R. 1987. Regulation of the *aroH* Operon of *Escherichia coli* by the Tryptophan Repressor. *J Bacteriol.* 169:2158-2164.
- Hermann KM, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway, *Annu Rev Plant Biol* 50:473-503.
- Hermann KM, Entus R. 2001. Shikimate pathway: aromatic amino acid and beyond. *Encyclopedia of life Sciences.* DOI: 10.1038/npg.els.0001315.
- Howard GT, Blake RC. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int Biodeterior Biode.* 42:213-220.
- Howard G T, Ruiz C, Hilliard N P. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyesterpolyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *Int Biodeterior Biodeg* 43:7-12.
- Howard G T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodeg* 49:245-252.
- Howard GT, Mackie RI, Cann IKO, Ohene-Adjei S, Aboudehen KS, Duos BG, Childers GW. 2007. Effect of insertional mutations in the *pueA* and *pueB* genes encoding two polyurethanases in *Pseudomonas chlororaphis* contained within a gene cluster. *J Appl Microbiol* 103:2074-2083.
- Hudson GS, Howlett GJ, Davidson BE. 1983. The binding of tyrosine and NAD<sup>+</sup> to chorismate mutase/prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K12 and the effects of these ligands on the activity and self-association of the enzyme. Analysis in terms of a model. *J Biol Chem* 258:3114-3120.
- Jensen RA. 1986. Tyrosine and phenylalanine biosynthesis: relationship between alternative pathways, regulation and subcellular location. *Rec Adv Phytochem* 20:57-82.
- Kay MJ, McCabe RW, Morton LH. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int Biodeterior Biodeg* 31:209-225.

- Koch GL, Shaw DC, Gibson F. 1971. Characterisation of the subunits of chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* 229:795-804.
- Kolling R, Lother H. 1985. AsnC an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 164:310-315.
- Liao HF, Lin LL, Chien HR, Hsu WH. 2001. Serine 187 is a crucial residue for allosteric regulation of *Corynebacterium glutamicum* 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase. *FEMS Microbiol* 194:59-64.
- Lim S, Springstead JR, Yu M, Bartkowski W, Schröder I, Monbouquette HG. 2009. Characterization of a key trifunctional enzyme for aromatic amino acid biosynthesis in *Archaeoglobus fulgidus*. *Extremophiles* 13:191-198.
- Liu YJ, Li PP, Zhao KX, Wang BJ, Jiang CY, Drake HL, Liu SJ. 2008. *Corynebacterium glutamicum* contains 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthases that display novel biochemical features. *Appl Environ Microbiol* 74:5497-5503.
- McArthur JD, West NP, Cole JN, Jungnitz H, Guzmán CA, Chin J, Lehrbach PR, Djordjevic SP, Walker MJ. 2003. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. *FEMS Microbiol* 221:7-16.
- Mahmood Zia K, Nawaz Bhatti H y Ahmad Bhatti I. 2007. Methods for polyurethane and polyurethane composites, recycling and recovery: A review. *React Funct Polym* 67:675-692.
- Mathew E, Zhi J, Freundlich, M. 1996. Lrp is a direct repressor of the dad operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178:7234-7240.
- Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G. 2003. *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing  $\beta$ -proteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:147-152.
- Moreno-González LE. 2012. Comparación de la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601T con las cepas de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5 capaces de crecer en poliuretano como única fuente de carbono. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Morton LH, Surman SB. 1994. Biofilms in biodeterioration: a review. *Int Biodeterior Biodeg* 32:203-221.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol* 129:39-42
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:134-140.
- Napoli A, Van der Oost J, Sensen CW, Charlebois RL, Rossi M, Ciaramella M. 1999. An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. *J Bacteriol* 181:1474-1480.

- Newman EB, Lin RT. 1995. Leucine-responsive regulatory protein a global regulator of gene expression in *Escherichia coli*. *Ann Rev Microbiol* 49:747-775.
- Nomura N, Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nakahara T. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Ferm and Bioeng* 86:339-345.
- Oceguera A, Carrillo A, López N, Bolaños S, Cruz MJ, Wachter C, Loza-Tavera H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus sp.* strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol* 73:6214-6223.
- Oosterkamp M, Veuskens T, Talarico SF, Veuskens T, Talarico F, Sander A, Weelink B, Goodwin LA, Daligault HA, Bruce DC, Detter JC, Tapia R, Han CS, Land ML, Hauser LJ, Langenhoff AM, Stams A, *et. al.* 2013. Genome analysis and physiological comparison of *Alicyclophilus denitrificans* strains BC and K601<sup>T</sup>. *PLOS ONE* 8(6):66971.
- Prabhu P, Hudson A. 2010. Identification and Partial Characterization of an L-Tyrosine Aminotransferase (TAT) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Res Int.* ID 549572.
- Rowe L, Howard GT. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodetrior Biodeg* 50:33-40.
- Schnappauf G, Lipscomb WN, Braus GH. 1998. Separation of inhibition and activation of the allosteric yeast chorismate mutase. *Proc Natl Acad Sci* 95:2868-2873. *Microbiol* 162(9):1698-1707.
- Shimada T, Tanaka K, Ishihama A. 2016. Transcription factor DecR (YbaO) controls detoxification of L-cysteine in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 162:1698-1707
- Solís-González CJ. 2008. Caracterización del crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ5 en poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Solís-González J. 2011. Identificación y clonación de algunos de los genes de *Alicyclophilus sp.* relacionados con su capacidad para utilizar poliuretano como única fuente de carbono. Tesis de maestría, Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Stern RS, Howard GT. 2000. The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol* 185:163-168
- Tani TH, Khodursky A, Blumenthal, R.M, Brown PO, Matthews RG. 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci* 99:13471-13476.
- Thaw P, Sedelnikova SE, Muranova T, Wiese S, Ayora S, Alonso JC, Brinkman AB, Akerboom J, van der Oost J, Rafferty JB. 2006. Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family. *Nucleic Acids Res* 34:1439-1449.
- Urbanski J, Czerwinski W, Janicka K, Majewska F, Zowall H. 1977. Handbook of analysis of synthetic polymers and plastics. Ellis Horwood Limited, Chichester.

- Vipin PJ. 2009. Studies on synthesis and characterization of thermoplastic polyurethane-urea copolymers. Tesis de doctorado. Complex Fluids & Polymer Engineering Group Polymer Science & Engineering Division National Chemical Laboratory University of Pune.
- Vojtová L, Vávrová M, Bednařík K, Šucman E, David J, & Jančář, J. 2007. Preparation and ecotoxicity assessment of new biodegradable polyurethane foams. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 42:677-683.
- Wasserman SA, Walsh CT, Botstein D. 1983. Two alanine racemase genes in *Salmonella typhimurium* that differ in structure and function. *J Bacteriol* 153:1439-1450.
- Weiqing He, Congran Li, Chung-Dar Lu. 2011. Regulation and Characterization of the *dadRAX* Locus for D-Amino Acid Catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 364:2107-2115
- Wild J, Klopotoski T. 1981. D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12: positive selection of mutants defective in enzyme activity and localization of the structural gene. *Mol Genet Genomics* 181:373-378.
- Wild J, Hennig J, Lobočka M, Walczak W, Klopotoski T. 1985. Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* 198:315-322.
- Willins DA, Ryan CW, Platko JV, Calvo JM. 1991. Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J Biol Chem* 266:10768-10774.
- Wong SM, Mekalanos JJ. 2000. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 97:10191-10196.
- Wu J, Sheflyan GY, Woodard RW. 2005. *Bacillus subtilis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase revisited: resolution of two long-standing enigmas. *Biochem J* 390:583-590.
- Xiao Y, Ji-Cheng Y, Hong-Wei L, Ying H, Wen-Jun Li. 2014. Genome-wide identification, domain architectures and phylogenetic analysis provide new insights into the early evolution of shikimate pathway in prokaryotes. *Mol Phylogenet Evol* 75:154-164.
- Xie G, Bonner CA, Jensen RA. 2000. Cyclohexadienyl dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri* exemplifies a widespread type of tyrosine-pathway dehydrogenase in the TyrA protein family. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 125:65-83.

### Referencias de web

<http://www.ebiac.uk/>

<http://www.fruitfly.org/>

<http://www.genome.jp/kegg/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.plastemart.com/>



<http://operons.ibt.unam.mx/>  
<http://www.softberry.com/>

## Anexos

### I. Preparación de medios selectivos

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

Composición por litro.

#### -Solución A (10 X)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  20.0 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  70.0 g

#### -Solución B (100 X)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  100.0 g

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

#### -Solución C (1000 X)

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

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g

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

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

Las soluciones A y B se esterilizan directamente en autoclave 120 °C/ 15 min. La solución C se esteriliza por filtración.

**Medio Luria-Bertani (LB).** Composición por litro.

Triptona 10.0 g

Extracto de levadura 5.0 g

NaCl 10.0 g

Agar 16.0 g

Disolver todos los componentes en el orden que se indica, excepto el agar, en 700 mL de agua desionizada. Cuando la solución esté totalmente cristalina aforar hasta un volumen final de un litro. Si el LB se usará en forma líquida, omitir el agar. En la preparación de LB sólido, el agar se agrega en el volumen final aforado. Ajustar a pH

7.0. Esterilizar por autoclave 120 °C/ 15 min. Las placas de LB sólido se preparan vertiendo el medio ya estéril y caliente sobre cajas Petri estériles desechables. Si se usará antibiótico, se debe esperar a que el medio tenga una temperatura de 45-50 °C para poder agregarlo, mezclar completamente y entonces verterlo en las cajas Petri. Se deja enfriar y solidificar el medio por 20-30 min en condiciones de asepsia. Tapar las cajas cuando esté totalmente solidificado y frío y guardar en refrigeración.

### Medios selectivos

Las cajas con medio sólido son preparadas usando una solución agar-agua (32 g/L) estéril. Se funde el agar en el microondas y una vez que la botella tenga una temperatura entre 45-50 °C se agregan los componentes estériles en el orden que se muestra en la siguiente tabla. En el caso de la preparación de MM-pp, la mezcla debe ser continuamente agitada con vórtex fuerte durante 1-2 minutos (2500 rpm) para mantener una emulsión constante hasta el momento de verterlo en la caja de Petri, de lo contrario el Rymsapol® forma agregados en el medio. La solución C se agrega al final, ya que el medio está a TA.

Componente* (mL)	MM-pp (0.3% p/v)	MM-PUpl (0.3% p/v)	MM-NMP (25mM)	MM-Mal (10 mM)
Agar-agua (32 g/L)	25	25	25	25
Solución A (10 X)	5	5	5	5
Solución B (100 X)	0.5	0.5	0.5	0.5
Agua	19.3	14.45	18.95	14.45
Fuente de carbono	0.15	5	0.5	0.5
Solución C (1000 X)	0.05	0.05	0.05	0.05
Volumen final (mL)	50	50	50	50

## II. Secuencias de los genes afectados por el transposón de las mutantes

### A) Mutante E.III.100 (DAHPS sintasa CE154\_16060)

```
ATGACCGCCACCGTCTCCAGCAGCGATGCCTGGTACCGCAACGTCGACAAGACCAGCCAGACCGACGACCAACGC
ATCGAGGACATACCGTGCTCCCCCTCCCGAACACCTGATCCGCTTCTTCCCATCAGCGGGACCGAGGTCGAA
TCGCTGATCTCCGGTACGCGCCGAGCATCCAGCGCATCATGAACGGCGAGGACGACCGCCTGCTGGTCATCATC
GGCCCCCTGCTCCATCCACAACCCCGTAGCGGCGCTCGAATACGCGCAAAGGCTCAAGGTGGTGCAGGAGCAGTAC
AAGGACCAGCTGGAAGTGGTGTATGCGCGTGTACTTCGAGAAGCCCCGACCACCGTGGGCTGGAAGGGCCTGATC
AACGACCCCTACCTGGACGGCAGCTACCGCATCGACGAGGGCCTGCGCATCGCGCGCCAGCTGCTCATCGACATC
AACCGCCTGGGCGTGCCCGCGGGCAGCGAGTTCCTGGACGTGATCTCGCCGAGTACATCGGCGACCTGATCAGC
TGGGGCGCGATCGGCGCGCGCACCCAGAGAGCCAGGTGCACCGCGAGCTGGCCTCGGGCATCTCGGCGCCGATC
GGCTTCAAGAACGGCACGGACGGCAACATCCGCATCGCCACCAGCCATCCAGTCCGCCAGCCGCGGCCACCAC
TTCCTGTGCGGTGCACAAGAACGGCCAGGTGGCCATCGTGCACAGTCCGGCAACAAGGACTGCCACGTGATCCTG
CGCGGGCGCAAGGGCGCCAACTACGACGCGGCCAGCGTGGCCGCGCTTGCGCCGACCTGGAAAAGGCCGGCCCTG
CCCGCCACGCTGATGGTGGACTGCAGCCACGCCAACAGCAACAAGCAGCAGGAGCGCCAGCGCGACGTGGCGCGC
GACATCGCGGGCGAGATCGCGGGCGGCTCGCGCAGCGTGTTCGGCGTCATGATCGAGGGCCACCTGCAGCCCGGG
GCGCAGAAATTACGCCGGGCAAGGACGACCCCGCGGCCCTGGAGTACGGCAAGAGCATCACCGACGCTGCCTG
GGCTGGGACGATTCCGTGCGCTGCCTGGCCGAGCTGGCGTCCGCCGTGCAGGCGCGCCGCGCACGTTGA
```

### B) Mutante D.IV.28/J.XII.10 (CM/PDT CE154\_06450)

```
ATGGCAGACAAACCAATGAGCATCACCCCGCAGGCCAGCCCCGCGCTGGCCGATCTGCGCGTGCAGATCGACTCG
CTGGACCACAGCTGCTTGAGCTCGTCAACCAGCGCGCCCGGTGGCCGAGCAGGTGGGCGAGCTCAAGAAGCGC
GAGGGCACGCCCTTCTTCCGCCCGACCGGTGGCGCAGGTGATCGAGAAGATCCAGGCGGCCAACCCCGGCCCG
CTCAAGAACGCGCACGTGGCCGCCATCTGGCGCAGATCATGTCCGCGTGCCTGGCGCTCGAATCGCCCCAGCGC
GTGGCCGTGCTGGGCCCGAGGGCACGTTCTGCGAGCAGGCGGCCATCGAATACTTCGGCGCGCGGCCGACCTG
ATGTAAGTCAACAGCTTCGACGAGGTGTTCCACGCCACGGCCGCGGGCAGCGCGCAGTACGGCGTGGTGGGCGTC
GAGAAGTCCAACGAGGGCGTGGTACGCGCTCGCTGGACATGTTCTGCACACGCCCTGCCACGTGGTGGCGAG
GTGAGCCTGCTGATCCGCCACAACCTGCTGCGCAGCGTCAACTCGGCTGAGGGCATCGAGGCGGTGCTGGCCAC
CCGCAGGCGCTGGCGCAGTGCACGCGTGGCTCGCCAAGCACCTGCCGCATGCCGAGCGCCGCCCGGTGTCGAGC
AACGCCGAGGGCGCGCGCCTGGCCGCCACCAACCCGGCCTGGGCGGCATATCGAGCGAGCGCGCGGCCAGCAG
TACGGCCTGCACGTGGTGGCCACGCCATCCAGGACGACGCCTACAACCGCACGCGCTTCGCCATCATCTGCCTG
CCGCACACGCTGGCCACGCCCGCGCCACGGGCAAGGACTGCACCAGCCTCATCATCTCCGTGCCCAACCGCCCC
GGCGCGGTGCACGACCTGCTGGTGGCGCTCAAGCGCCACGGCGTGTCCATGACCCGCTTCGAGTCCGCGCCCCGCG
CGCACCGGCCAGTGGGAGTACTACTTCTACATCGACCTCGAAGGCCACCCCGCGCAGCCCAACGTGGCCGCCGCG
CTGGCCGAGCTGCAGCAGCTGTGCGCTTCTACAAGCTGCTCGGCACCTACCCCGTCCGTGCGTGA
```

### C) Mutante H.I.20 (regulador transcripcional tipo AsnC CE154\_20540)

```
ATGTCTGAGCTCGACTCCATAGACCTGCGCATCCTCGACCTCCTGCAGCAGGACGGACGCTGACGATGACCGAA
CTGGGCGAGCGCGTGGGCTGTCCACGTGCGCGTGCAGCGCGTCAAGCGCTGGAGGCCAGGGCGTGATC
ACGGGCTACCACGCGCGCGTGGCCCGGGCAGTGGGCAAGAACCTGCTGGTCTTCGTGGAAATCACCTGGCG
CAGAAGTCCGAGCAGATCTTCAAGAAGGTGCGCGACGAGCTGCAGAACATGCCCGAGGTGCTGGAATGCCACCTG
ATCTCGGGCAGCTTCGACTACCTGGTCAAGGCGCGCCTGGCCGGCATGTCCGAATACCGGCACCTGCTGGGCTCC
ATCCTGCAGCAGATGCCCGTGGCGCGCAGTCCAACAGCTACGTGGTGTGAGGAGGTCAAGGAGAGCTTCGTG
GTCCCGGTGATCGCGCCGGGGCGGGCGGGGCGGGCGCCGGTCA
```