



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización genómica de una mutante
espontánea alcohol deshidrogenasa ADH⁻ de
Gluconacetobacter diazotrophicus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CRISTIAN IVÁN SORIANO TÉLLEZ



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Martha Lucinda Contreras Zentella

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno	
Apellido paterno	Soriano
Apellido materno	Télez
Nombre(s)	Cristian Iván
Teléfono	56-10-27-27
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	30332119-8
2. Datos del tutor	
Grado	Dra.
Nombre(s)	Martha Lucinda
Apellido paterno	Contreras
Apellido materno	Zentella
3. Datos del sinodal 1	
Grado	Dra.
Nombre(s)	Luisa Alvarina
Apellido paterno	Alba
Apellido materno	Lois
4. Datos del sinodal 2	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Eduardo
Apellido paterno	Rodríguez
Apellido materno	Bustamante
5. Datos del sinodal 3	
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Suri Karina
Apellido paterno	Martínez
Apellido materno	Yee
6. Datos del sinodal 4	
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Arístides III
Apellido paterno	Sampieri
Apellido materno	Hernández
7. Datos del Trabajo escrito	
Título	Caracterización genómica de una mutante espontánea alcohol deshidrogenasa ADH- de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
Número de páginas	84
Año	2012

Agradecimientos

Agradezco de manera especial y sincera a la Dra. Martha Contreras por su completa dedicación y paciencia en cada paso que di para la realización de esta Tesis.

Agradezco profundamente al Dr. Edgardo Escamilla[†] por abrirme las puertas para unirme a su grupo de trabajo, brindarme siempre su apoyo y confianza desde el primer día que yo estuve en el laboratorio

Agradezco a mis sinodales por tomarse el tiempo de revisar y corregir este trabajo.

Agradezco el apoyo a los miembros de la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, Ivette Rosas Arciniega, Juan Manuel Barbosa Catillo, Gerardo Coello Coutiño, Ana María Escalante Gonzalvo y Francisco Pérez Eugenio.

Así mismo, el apoyo técnico de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

Agradezco a los donativos que financiaron este trabajo de investigación PAPIIT-IN218710, CONACyT 50672 y 104269.

Dedicatorias

Dedico por completo este logro a mi Mamá Lourdes Téllez y a mi Papá Melchor Soriano ya que son mi principal inspiración, sin su presencia en mí día a día jamás saldría a hacer las cosas de la misma manera. Jamás existirán triunfos en mi vida que compensen su apoyo, muchas gracias a los dos.

A mi hermana Damayanti Soriano por ser mi principal amiga desde su nacimiento, gracias por estar en mi vida y por tu paciencia.

A la Dra. Martha Contreras por no solo ser mi tutora, sino por también ser esa persona que da consejos y te apoya en la vida diaria. Su apoyo hacia mi jamás tendrá suficientes gracias de mi parte para agradecerle todo.

A Alicia Luna porque siempre me motivo a ser alguien en la vida, tu apoyo lo llevo siempre presente amiga.

A Roberto Gallegos por brindarme su gran amistad y apoyo añejos. Gracias por ser la prueba fehaciente de que cuando se quiere se pueden lograr las cosas.

A Jorge Patiño por ser mi mano derecha, tu amistad es algo que no se encuentra cotidianamente. Gracias por tu apoyo, por escucharme y por darme todos esos consejos que hacen de la vida algo más ameno.

A Carlos Morales por ser ese amigo que brinda siempre amistad y apoyo francos. Gracias por estar siempre en el momento preciso y por la comprensión.

A Leslie Olmedo por brindarme las sonrisas y apoyo cotidianos. Tu amistad y tu nobleza amiga son algo incomparables.

A Rolando Gasca por brindarme su apoyo y amistad veraces. Gracias por hacer gratos los días en el laboratorio, los consejos académicos y por hacerme ver la vida desde un punto de vista más valeroso.

A Suri Martínez, Azucena Lira y Helga López por su amistad y compañía en el laboratorio, sus consejos siempre fueron y serán de gran importancia en mi vida.

"Seas quien fueres o lo que hagas, si deseas algo con firmeza, es por que ese deseo nació antes en el alma del universo, y es tu misión en esta tierra."

-Paulo Coelho-

INDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	4
I.I. Fisiología y Taxonomía de las Bacterias Ácido Acéticas.....	5
I.II. Cadenas Respiratorias Bacterianas. Las Bacterias Ácido Acéticas.....	8
I.II.I. PQQ-Alcohol deshidrogenasa.....	10
I.III. Elementos Genéticos Móviles.....	12
I.III.I. Secuencias de inserción.....	13
II. Antecedentes.....	16
II.I. Secuencias de Inserción en Bacterias Acéticas.....	16
II.I.I. Secuencias de inserción <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	19
II.II. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	21
II.II.I. Diazotrofia aeróbica.....	23
II.II.II. La PQQ-Alcohol deshidrogenasa.....	25
II.II.III. Mutante PQQ-ADH ⁻ <i>Ga. diazotrophicus</i> (mutante C6).....	26
III. Objetivo General.....	31
IV. Metas.....	31
V. Justificación.....	32
VI. Material y Método.....	32

VI.I. Material Biológico:	32
VI.II. Medios y condiciones de Cultivo:	33
VI.III. Mantenimiento del material biológico:	33
VI.IV. Selección de Mutantes espontáneas PQQ-ADH ⁻ de <i>Ga. diazotrophicus</i> :	34
VI.V. PCR:	34
VI.VI. Extracción de DNA Genómico:	35
VI.VII. Electroforesis:	38
VI.VII.I. Extracción en gel de agarosa:	39
VI.VIII. Secuenciación de DNA:	41
VI.IX. Southern Blot:	41
VII. Resultados:	50
VII.I. Amplificación de los genes que codifican a la PQQ-ADH:	51
VII.II. Análisis de la secuencia adicional en el gen <i>adhA</i> :	55
VII.III. La IS <i>Gad</i> C6 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> mutante C6:	58
VII.IV Las secuencias de Inserción de la Familia IS110:	68
VIII. Discusión:	73
IX. Conclusiones:	78
X. Bibliografía:	80

Resumen

La familia de las Bacterias Ácido Acéticas (BAA) se caracteriza por su gran inestabilidad genética. En esta familia es posible observar un patrón de distribución de secuencias de inserción (IS), afectando diversos procesos. Entre los procesos afectados tenemos a la fermentación oxidativa, en relación con el cual se han reportado mutantes de una enzima fundamental, la PQQ-alcohol deshidrogenasa membranal (PQQ-ADH⁺); las mutantes reportadas se dan por inserción de IS en los genes que codifican para las diferentes subunidades de esta proteína.

Como parte de la caracterización de la fermentación oxidativa en *Gluconacetobacter diazotrophicus*, decidimos determinar la importancia de la PQQ-ADH, en la fijación de nitrógeno y la oxidación de alcoholes. Obtuvimos mutantes espontáneas de la vía de oxidación de estos compuestos, utilizando alcohol alílico como factor de selección para aquellas células donde la PQQ-ADH no es funcional y seleccionamos a una mutante (mutante C6), por su habilidad para crecer en presencia de este alcohol.

Estudios previos en el laboratorio mostraron que la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*, la PQQ-ADH es inactiva porque la subunidad I (catalítica) no esta

ensamblada en la membrana. Por lo anterior decidimos explorar si esta falta de ensamblaje se debía a alguna mutación en esta enzima para lo cual realizamos una caracterización genómica, enfocando nuestra atención en determinar si existía una inserción de DNA ajeno dentro de los genes que forman el operón que codifica para la PQQ-ADH, conformado por los genes *adhA* y *adhB*.

El análisis realizado nos muestra que el gen *adhA*, que codifica para la subunidad catalítica de la enzima, presenta un aumento de 1.5 Kb en relación a la cepa silvestre, mientras que el gen *adhB* no estaba afectado. El DNA adicional que interrumpe el gen *adhA* fue secuenciado y el análisis de esta secuencia indicó que se trata de una secuencia de inserción de la familia IS110, a la que llamamos IS*GadiC6*.

Estos resultados nos permiten proponer que la falta de integración de la subunidad I a la membrana y por tanto, la falta de actividad de PQQ-ADH en la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*, se debe a la interrupción del gen *adhA* que codifica para la subunidad catalítica de esta enzima, por la integración de la IS*GadiC6*.

Este es el primer reporte en el que se identifica a una IS de la familia IS110 interrumpiendo un gen estructural en una bacteria de la familia BAA; además, la IS*GadiC6* aquí descrita es la primera secuencia de inserción detectada en el gen que codifica para la subunidad catalítica de la PQQ-ADH en estas bacterias.

Es de llamar la atención que una de las características que comparten algunas de las bacterias en las que la IS110 ha sido detectada, es que son fijadoras de nitrógeno, incluyendo a *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

De acuerdo a lo reportado en la base de datos IS Finder, la presencia de IS's de esta familia es frecuente en bacterias diazótrofes. La mayoría de los fijadores de nitrógeno así como las BAA son α -proteobacterias; en el caso específico de *Ga. diazotrophicus*, además comparten el ser bacterias simbióticas de plantas. Pensamos que el presentar estas características en común, favorece la transferencia horizontal de las secuencias de inserción de la familia 110 entre estas bacterias.

I. Introducción

En la relación que existe entre el hombre y los microorganismos, ha sido evidente la gran importancia que estos últimos tienen. Una de las familias de microorganismos que ejemplifican esta relación es la familia de las BAA. Como su nombre lo indica y es lo que las diferencia de otras bacterias, su metabolito principal es el ácido acético ó vinagre, el cual producen a partir del etanol por medio de su oxidación incompleta, proceso que se conoce como fermentación oxidativa (29). Este proceso es de gran importancia tecnológica en la producción del vinagre. Además del etanol, esta familia de bacterias oxidan diversos sustratos como alcoholes primarios, azúcares, ácidos de azúcar y polioles, produciendo compuestos importantes como L-sorbosa a partir de D-sorbitol, L-ribulosa a partir de ribitol, dihidroxiacetona a partir de glicerol, entre otros productos que se utilizan desde el área biotecnológica hasta la farmacéutica y cosmética.

Además, algunas especies de la familia de las BAA son fijadoras de nitrógeno; estas bacterias habitan en el tallo y/o raíces de las plantas, donde son comensales ó endófitos, ya que aprovechan el ambiente bajo en oxígeno y relativamente alto en fuentes de carbono del interior de la planta, contribuyendo con la fuente de nitrógeno necesaria para su crecimiento. Estas propiedades de la familia BAA dan como resultado un gran interés por estudiarlas y caracterizar los procesos que llevan al cabo.

I.I. Fisiología y Taxonomía de las Bacterias Ácido Acéticas

Fisiológicamente las BAA pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, de la subclase α -Proteobacteria (28). Son bacterias Gram-negativas, mesófilas y aerobias estrictas; tienen forma elipsoidal o de bastón (15). Oxidan azúcares, polioles y etanol teniendo al ácido acético como producto principal. Su pH óptimo de crecimiento es entre 5.5 y 6.3, aunque resisten valores entre 3.0 y 4.0 y algunas cepas se han podido aislar de medios que contienen acetato y que crecieron en un rango de pH de 2.0 a 2.2; su temperatura óptima es entre 25 – 30°C. Una característica muy importante de estas bacterias es su resistencia al ácido acético, la cual es particular de cada cepa (29). El hábitat de estos géneros pueden ser flores, frutas, miel de abejas, etc. (29).

El primer género y especie, identificado en 1898, fue *Acetobacter aceti*, y a partir de entonces la taxonomía de las bacterias pertenecientes a dicha familia ha sido tema de discusión. Hasta 1935 las bacterias capaces de oxidar glucosa a ácido glucónico, mejor que etanol a ácido acético, fueron clasificadas en el género *Gluconobacter* (G.); aquellas bacterias que podían oxidar sustratos produciendo acetato fueron clasificadas en el género *Acetobacter* (A) (35).

En 1984 Yamada y Konko distinguieron dentro del género *Acetobacter*, especies que en su sistema respiratorio tenían como aceptor de electrones ubiquinona-10

(UQ-10) de aquéllas que tenían ubiquinona-9 (UQ-9) (35). Basándose en estas diferencias, estos mismos autores propusieron en 1985, el género *Gluconoacetobacter* (*Ga.*), cuya quinona endógena es UQ-10 a diferencia del género *Acetobacter*, cuya quinona endógena es la UQ-9. Dicha propuesta fue rechazada, de la misma manera que se rechazó el género *Acidomonas* propuesto por Urakami en 1989 (35). Sin embargo, el análisis parcial de la secuencia de DNA ribosomal 16S en estas bacterias, corroboró que estos dos géneros eran diferentes. De esta manera ambas propuestas fueron aceptadas y *Gluconoacetobacter* fue cambiado a *Gluconacetobacter*, con su especie tipo *Gluconacetobacter liquefaciens* (35)

En los últimos diez años se han descrito varios géneros más, por lo que a la fecha la familia *Acetobacteraceae* está formada por treinta géneros (Figura 1) (14; 16; 20; 34; 36; 37).

Dentro de esta familia, tres géneros poseen capacidad de fijación biológica de nitrógeno: *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* y *Swaminathania* (21; 28; 35).

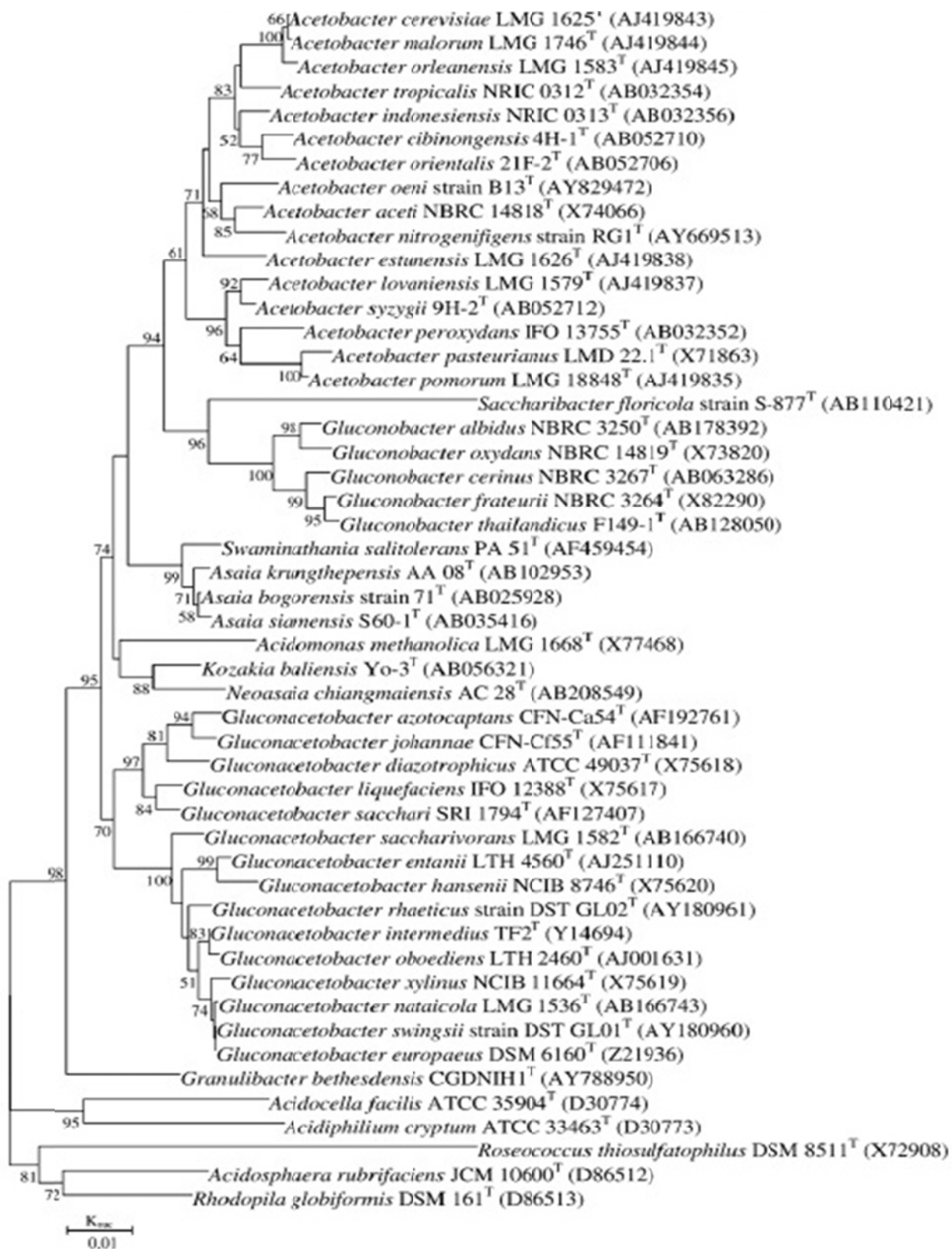


Figura 1. Árbol filogenético de la familia Acetobacteraceae basado en el gen de rRNA 16S (35).

I.II. Cadenas Respiratorias Bacterianas. Las Bacterias Ácido Acéticas.

Las bacterias aerobias utilizan oxígeno (O_2) como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria. Durante la respiración, electrones y protones obtenidos a partir de la oxidación de sustratos son transportados a través de la cadena, permitiendo la formación de un gradiente protón motriz transmembranal que es utilizado por la ATP-sintasa para formar ATP a partir de ADP y P_i , (5; 26) (Figura 2)

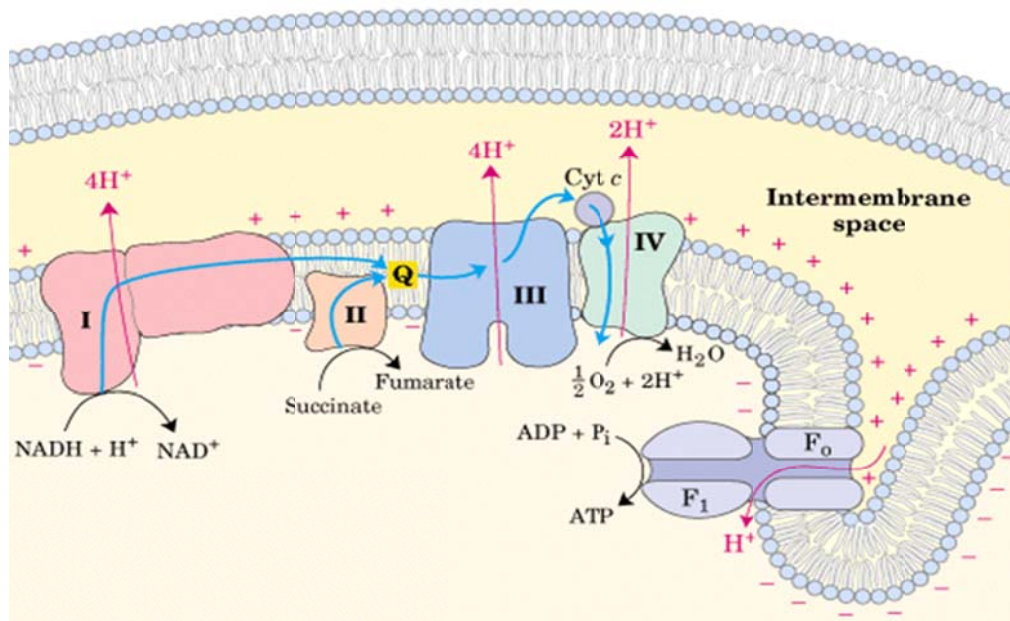


Figura 2. Esquema general de una cadena respiratoria aeróbica. (26)

La cadena respiratoria en bacterias, de la misma manera que sucede en mitocondria, puede estar formada por proteínas de fierro-azufre como la NADH y la succinato deshidrogenasa ó la proteína de Rieske que forma parte del complejo bc_1 ; flavoproteínas, citocromos de tipo b , c , a , o d y moléculas no proteicas como la quinonas.

En particular, además de algunos de los componentes mencionados, las cadenas respiratorias de la familia de BAA poseen un grupo diverso de proteínas, las quinoproteínas o quinoenzimas dependientes de Pirroloquinolin Quinona (PQQ). Estas proteínas son capaces de llevar al cabo la oxidación incompleta de azúcares, aldehídos y alcoholes, donando los electrones producto de su actividad a la quinona endógena de la cadena respiratoria y promoviendo altísimas tasas respiratorias. Ejemplos de estas enzimas son la glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) y la alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH), que son enzimas membranales cuyo sitio catalítico está orientado hacia el espacio periplásmico (7; 10) (Figura 3).

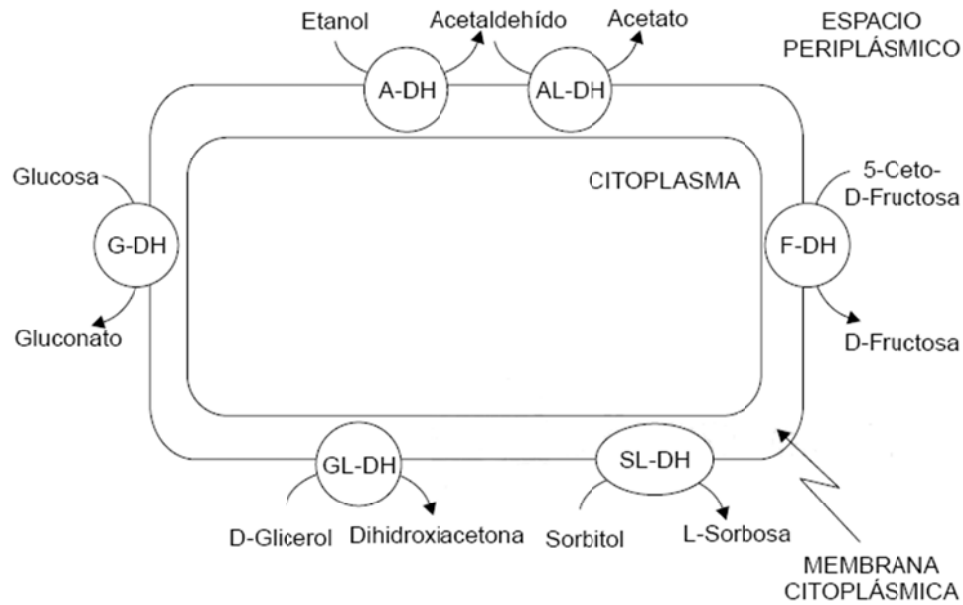


Figura 3. Esquema de algunas PQQ-deshidrogenasas periplásmicas presentes en las BAA. (7)

I.II.I. PQQ-Alcohol deshidrogenasa

Las PQQ-ADH se pueden localizar en una amplia gama de especies que incluyen a las subclases α , β y γ -proteobacterias y pueden ser solubles o estar ancladas a la membrana plasmática; su sitio catalítico puede estar orientado hacia el citoplasma o hacia el periplasma (10; 12).

Entre ellas, las ADHs que tiene como grupo prostético PQQ están clasificadas en tres grupos diferentes, las ADH tipo I, II y III. Las que pertenecen al grupo I son afines a las quinoproteínas metanol deshidrogenasas y se han localizado en un

número limitado de proteobacterias; son enzimas solubles y no contiene citocromo *c*. Las PQQ-ADH grupo II son enzimas solubles que están localizadas en el periplasma y que además del grupo prostético PQQ tienen al citocromo *c*. Finalmente aquellas PQQ-ADH clasificadas en el grupo III, son enzimas membranales, representativas de las BAA, que además de PQQ tienen al citocromo *c* como grupo prostético (Tabla 1). En general, las ADHs tipo III están conformadas por tres subunidades; la subunidad I es la subunidad catalítica, que contiene el grupo prostético PQQ y un citocromo *c* y es la encargada de oxidar el sustrato; tiene un peso relativo de entre 72-80 kDa. La subunidad II tiene un peso relativo entre 44-54 kDa y tiene tres citocromos *c* como grupos prostéticos; finalmente la Subunidad III, que no se encuentra presente en todas las BAA, tiene un peso relativo de entre 8-20 kDa y aún no se le ha asociado una función específica (Figura 4).

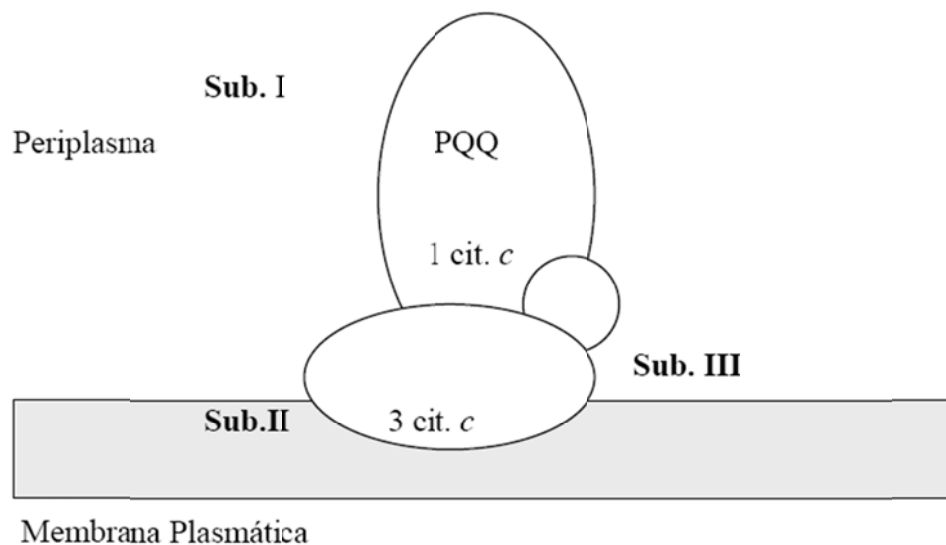


Figura 4. Esquema representativo del arreglo de las tres subunidades en las ADH tipo III de las BAA (1)

Tabla 1. Quinoproteínas que oxidan alcoholes y su localización celular (10)

Enzima	Localización	Organismo
<i>Quinoproteínas capaces de oxidar alcoholes</i>		
Metano deshidrogenasa	S	Methylotrophs (12)
<i>ADH Tipo I (PQQ)</i>		
Etanol deshidrogenasa (qEDH)	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (13)
Alcohol deshidrogenasa (ADH I)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
1-Butanol deshidrogenasa (BOH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> (15)
Polipropilén glicol deshidrogenasa (PPGDH)	S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (16)
<i>Otras quinoproteínas capaces de oxidar alcoholes (PQQ)</i>		
Sorbosa/Sorbosona deshidrogenasa	S	Especies de <i>Gluconobacter</i> (17) <i>Pseudogluconobacter saccharoketogenes</i> (18)
Glicerol deshidrogenasa	M	Especies de <i>Gluconobacter</i> (19)
<i>Quinohemoproteínas capaces de oxidar alcoholes</i>		
<i>ADH Tipo II (PQQ/hemo C)</i>		
Polietilén glicol deshidrogenasa (PEGDH)	S	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i> (20)
Etanol deshidrogenasa (qhEDH)	S	<i>Comamonas testoteroni</i> (21)
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIB)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIG)	S	<i>Pseudomonas putida</i> (14)
Polivinil alcohol deshidrogenasa (PVADH)	S	<i>Pseudomonas</i> sp. (22)
Tetrahydrofurfuril alcohol deshidrogenasa (THF ADH)	S	<i>Ralstonia eutropha</i> (23)
1-Butanol deshidrogenasa (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> (15)
<i>ADH Tipo III (PQQ/hemo c/3 hemo C)</i>		
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acetobacter aceti</i> (24)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (25)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Gluconoacetobacter polyoxogenes</i> (26)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Acidomonas methanolicus</i> (27)
Alcohol deshidrogenasa	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i> (28)
S: soluble; M:membranal.		

I.III. Elementos Genéticos Móviles

Los llamados elementos genéticos móviles o elementos transponibles, fueron reportados por primera vez en la década de 1940 por la científica Bárbara McClintock, cuando describió elementos de control transponibles como reguladores de la expresión de algunos genes en el maíz (31).

Los elementos genéticos transponibles son fragmentos de DNA capaces de moverse de un lugar a otro en el genoma, integrándose a él. Su replicación se da como parte del genoma tanto en procariontes como en eucariontes. Estos fragmentos son de gran relevancia ya que generan variabilidad genética. Es importante destacar que la transposición de los fragmentos en el genoma es un acontecimiento raro, el cual ocurre con una frecuencia de entre 10^{-5} – 10^{-7} por generación. En organismos procariontes, se han reportado tres tipos de elementos genéticos transponibles: los transposones, las secuencias de inserción y los fragmentos de DNA viral como resultado de una infección (23).

I.III.I. Secuencias de inserción

El descubrimiento de las Secuencias de Inserción (IS's) durante investigaciones de expresión de genes en *Escherichia coli* y el bacteriófago λ , puso fin al concepto "del genoma estable", ya que estableció que la inserción de estas secuencias en el genoma modifica la expresión de genes, secuestra genes, y provoca mutaciones (2; 24).

Las IS's están consideradas como los elementos transponibles más simples, ya que son segmentos cortos de DNA de un tamaño entre 800 y 2500 pares de bases (pb), que son capaces de insertarse en sitios múltiples de secuencias específicas

del genoma. Además de encontrarse en DNA genómico, también pueden ser localizadas en DNA plasmídico y en algunos bacteriófagos. Se diferencian de los transposones por ser segmentos más cortos y no codificar para propiedades más complejas, como marcadores de resistencia a drogas (2; 23).

Las IS's solamente codifican para funciones que tienen que ver con su transposición, es decir para una única enzima llamada transposasa, la cual es codificada por uno o dos marcos de lectura abierta (ORF's) y su secuencia abarca casi todo el tamaño del fragmento. El resto está formado por terminales invertidas en cada extremo, nombradas repetición invertida izquierda y derecha (IRL e IRR), que son de un tamaño aproximado de entre 10 y 40 pb; estas terminales invertidas son de suma importancia ya que codifican para dos dominios; el primero (II) posicionado dentro de las IR, es el sitio de unión de la T_pasa; el segundo (I), está implicado en las reacciones de rompimiento y transferencia que llevan a la transposición de la secuencia. El promotor de la transposasa está localizado parcialmente en la IRL (Figura 5) (24). Por otro lado, cuando existen IS's relacionadas entre sí y solo diferenciadas por pocas secuencias de nucleótidos, son denominadas como isoformas de un elemento parental (24).

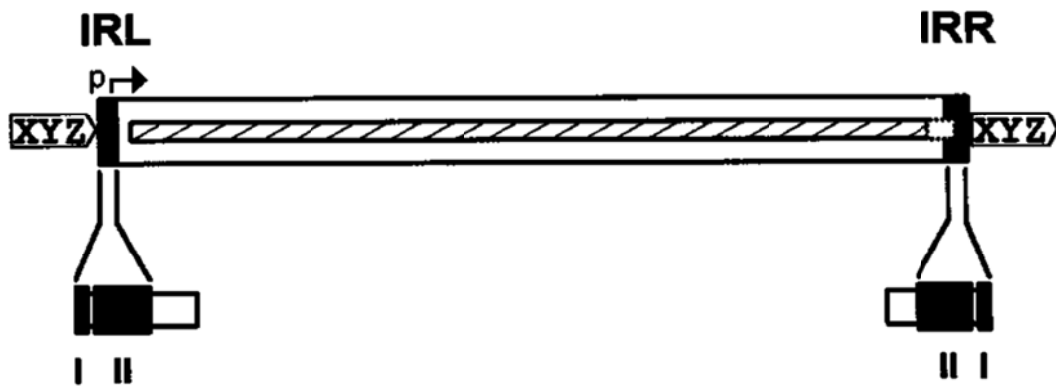


Figura 5. Organización general de una IS en la que se observan en ambos extremos, pequeñas secuencias generadas (XYZ) a causa de la inserción en el DNA blanco (24).

Existe la regulación de la actividad de transposición por factores de la bacteria hospedera. Estos factores son proteínas que gobiernan el súper enrollamiento del DNA, como son diferentes tipos de chaperonas, proteasas, control de proteínas SOS y las Dam DNA metilasas (24).

En 1978, E. Lederberg de la Universidad de Stanford inició la nomenclatura de las IS's; el nombre solo incluía un número, lo cual no aportaba suficiente información. Una segunda manera de nombrarlas es el que nos provee las iniciales de la bacteria hospedadora de la cual se extrajo la IS; un ejemplo de esta nomenclatura sería la ISm1 de *Rhizobium meliloti*.

II. Antecedentes

II.I. Secuencias de Inserción en Bacterias Acéticas.

El descubrimiento de IS`s en las BAA se ha dado en gran parte por el interes biotecnológico asociado a la producción de ácido acético y la formación de celulosa; la aparición de varios reportes de mutaciones espontáneas en cepas del género *Acetobacter*, las cuales afectaban sus propiedades morfológicas y fisiológicas, dió un impulso al estudio de estas secuencias (4; 33)

En 1991, dos reportes de IS en BAA comienzan a aportar datos importantes en este tema. El primero reporta la secuencia de inserción IS1031 en *Ga. xylinus* (antes *Acetobacter xylinum*) la cual está involucrada en la deficiencia en la síntesis de celulosa en esta bacteria; este estudio no especifica en que parte del operón se encuentra insertado el elemento; aún así, se sabe que puede estar en regiones regulatorias río arriba del operón o en genes que representan funciones conocidas en la producción de la celulosa (4).

El segundo reporta la secuencia de inserción IS1380 de *Acetobacter pasteurianus* NCI 1380. Esta secuencia se inserta en la subunidad II o subunidad de citocromo c de la alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH), lo que ocasiona la falta de actividad

de la enzima. Interesantemente, IS1380 está presente en otras BAA: *A. pasteurianus*, *A. aceti* subespecie 1023 e IFO 3284, *Ga. xylinus* y *A. polyoxogenes*, sugiriendo que IS1380 está distribuida ampliamente en las BAA, con lo cual se puede suponer que la transposición de esta secuencia de inserción es probablemente uno de los factores responsables de la inestabilidad genética en bacterias de esta familia. Estudios en mutantes espontáneas de *A. aceti* subsp 1023 reportaron también la presencia de IS1380; estas mutantes fueron seleccionadas de cultivos en fase estacionaria tardía, cuando la concentración de ácido acético aumenta en el medio, lo cual podría suponer que el ácido acético causa inducción de transposición de IS1380 en *Acetobacter* (33).

Años después de que la IS1380 fuera caracterizada, se localizó una nueva IS en *Acetobacter pasteurianus* NCI 1452, generando mutantes espontáneas deficientes en la oxidación de etanol. La IS1452 se inserta en la subunidad III (*adhS*) de la PQQ-ADH en esta bacteria. Al igual que la IS1380, esta secuencia de inserción también se encuentra en otras bacterias acéticas como *A. pasteurianus* NCIB 7214, *A. aceti* y *A. hansenii* (18).

En el mismo año en que se caracterizó a IS1452, se localizó una nueva IS en el género *Gluconobacter*; este fue el primer reporte acerca de elementos genéticamente transponibles en este género. Esta IS nombrada IS12528, se expresa en mutantes espontáneas de *Gluconobacter suboxydans*, seleccionadas como mutantes resistentes a alcohol alílico, las cuales carecen de la habilidad de

oxidar etanol; la inserción se produce entre los genes *g3-adhA* y *g3-adhB* (agrupados en la misma polaridad; codifican para las subunidad I y II), causando inactividad de la enzima. Esta IS también se encuentra distribuida en varias cepas de BAA: *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter cerinus*, *A. acetii*, *A. pasteurianus*, *A. polyoxogenes* y *G. suboxydans* IFO3254, IFO3255, IFO3257 e IFO3258 (17).

Entonces, se puede observar un patrón de distribución de las secuencias de inserción; *A. hansenii* solo presenta IS1452; *Ga. xylinus* y *A. pasteurianus* NCI 1380 presentan IS1380; *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter cerinus*, *A. pasteurianus* sp, y *G. suboxydans* IFO3254, IFO3255, IFO3257 e IFO3258 presentan IS12528; *A. polyoxogenes* presenta la IS1380 y la IS12528 y en *A. acetii* se observan las tres (17; 18). Estos hallazgos apoyan la presunción de que la transposición de estas secuencias es un factor importante de la inestabilidad genética en BAA.

II.I.I. Secuencias de inserción en *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Desde que la secuencia del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* fue liberada en 2009 (3), se abrieron las puertas para ampliar el conocimiento sobre su metabolismo, regulación y expresión de genes, entre los cuales están aquellos involucrados en la fijación biológica del nitrógeno (FBN), la tolerancia al ácido acético, la osmotolerancia, la señalización e inclusive los involucrados en procesos de evolución y adaptación, que ayudan a entender la interacción de la bacteria con las plantas (3).

El genoma de *Ga. diazotrophicus* está compuesto por un cromosoma circular de 3,994,163 (pb) de los cuales el 66.19% corresponde a los nucleótidos G+C; posee 3,930 secuencias codificantes putativas (CDS) teniendo una capacidad de codificación del 90.67%. Esta bacteria contiene dos plásmidos: el primero fue nombrado pGD01 y tiene un tamaño de 38, 818 pb; el segundo nombrado pGD02, con un tamaño de 16,610. En cuanto a elementos móviles transponibles *Ga. diazotrophicus* tiene 245, más que cualquier otra bacteria endofita (Tabla 2), lo cual sugiere que pueden estar asociados a un alto número de eventos de transferencia horizontal de genes, ya que el 40% de ellos son similares al orden rizobiales (también α -Proteobacteria) (3).

Tabla 2. Comparación de elementos móviles transponibles entre algunas bacterias endófitas (3).

Genomes	Integrases	Transposases	Total	CDS	Percent
<i>Azoarcus sp.</i> BH72	9	13	22	3,989	0,55%
<i>Pseudomonas putida</i> W619	18	16	34	5,182	0,66%
<i>Enterobacter sp.</i> 638	22	6	28	4,240	0,66%
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	17	25	42	4,942	0,85%
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	41	43	84	7,241	1,16%
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	19	65	84	5,365	1,6%
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	55	190	245	3,930	6,23%

A la fecha, no han sido identificadas en *Ga. diazotrophicus* proteínas cuyos genes hayan sido interrumpidos o afectados en su expresión por la inserción de alguna IS.

Por tanto, en este trabajo se reporta la primera proteína cuyo gen es interrumpido por la inserción de una IS en *Ga. diazotrophicus*. Aún más importante es que la IS localizada, pertenece a la familia IS110, que no ha sido reportada en las BAA y que se ha observado en bacterias fijadoras de nitrógeno como *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Azotobacter*.

II.II. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus (Figura 6) se aisló por primera vez de las raíces y el tallo de la caña de azúcar de Brasil por Cavalcante y Döbereiner en 1988. (3; 8; 25). La bacteria también se ha observado en otras regiones del mundo en donde crece la caña de azúcar, incluyendo Argentina, Australia, Cuba, Filipinas, India, Japón y México (30).

Esta bacteria endófito, descrita como una bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido, abrió la puerta para las investigaciones posteriores sobre la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas (25).

Ga. diazotrophicus tiene forma bacilar y mide cerca de 0.7 a 0.9 μm ; su movilidad está dada por flagelos peritricos o laterales; es una bacteria Gram-negativa, con una temperatura y pH óptimos de crecimiento en cultivo de 30°C y 5.5 respectivamente. Una concentración de sacarosa al 10% suele ser la mejor fuente carbono para el crecimiento de esta bacteria, pero también se pueden usar otras fuentes de carbono como glucosa ó etanol y obtener ácidos a partir de estos substratos (8; 25). Además de encontrarse en la caña de azúcar, *Ga. diazotrophicus* también puede ser encontrada en las raíces, tallos y hojas de la papa, café, té, plátano, arroz, piña, etc. (19).

Esta bacteria contribuye de manera benéfica a las plantas que endofita, sintetizando sustancias promotoras de crecimiento tales como auxinas, giberelinas y fitohormonas como el ácido indol acético (IAA); inclusive contribuye a incrementar la capacidad de supervivencia de la planta bajo factores de tensión ambiental y la conduce a una mejor adaptación para tener una mayor productividad agrícola. Por otro lado, *Ga. diazotrophicus* es capaz de sintetizar una bacteriocina que posee actividad de lisozima, la cual inhibe el crecimiento de patógenos para la caña de azúcar como es el caso de *Xanthomonas albilineans*; además tiene actividad anti-fúngica inhibiendo las fitotoxinas producidas por los hongos *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium* sp. y *Helminthosporium carbonum*, causantes de la mayor enfermedad en esta planta. (3; 19; 30).

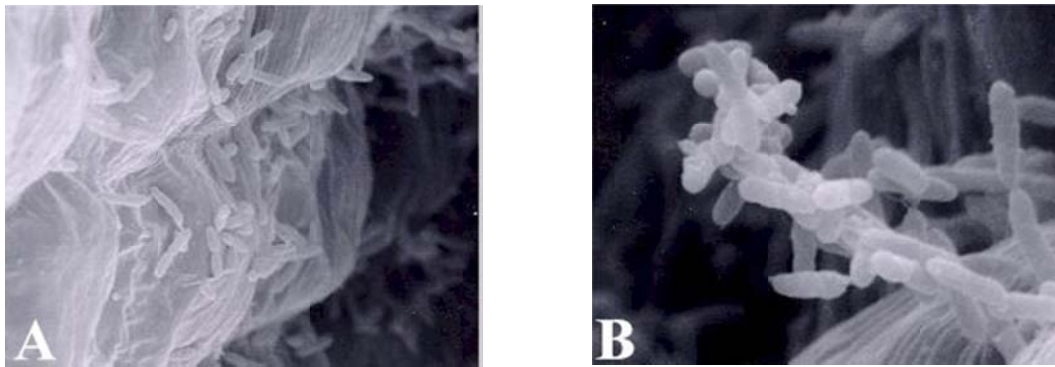


Figura 6. Micrografías electrónicas de *Ga. diazotrophicus* PAL5 (Fotos tomadas de <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Acetobacter>).

II.II.I. Diazotrofía aeróbica

Ga. Diazotrophicus lleva al cabo la FBN a pH ácido (incluso debajo de 3.0) y en presencia de altas concentraciones de nitratos (hasta 10 mM); se ha estimado que es capaz de fijar más de 150 kg de N₂ por hectárea por año en la caña de azúcar (25; 27), y contribuye a casi a la mitad de N₂ fijado que está disponible para las plantas hospedadoras (19).

La nitrogenasa de esta bacteria puede ser inactivada parcialmente a concentraciones de 20 mM de (NH₄)₂SO₄, además de la presencia de oxígeno (8; 25). Sin embargo, *Ga. diazotrophicus* al ser un aerobio estricto, lleva al cabo la fijación de nitrógeno en cultivo bajo condiciones de alta aeración (aproximadamente 20 kPa) (6). La fijación de nitrógeno, en presencia de altas concentraciones de oxígeno en esta bacteria, es posible gracias a que exhibe mecanismos de protección de la nitrogenasa por oxígeno; entre ellos *Ga. diazotrophicus* emplea el mecanismo de "Protección Respiratoria", que se asocia a una alta tasa de respiración consecuencia de la presencia de deshidrogenasas periplásmicas muy activas, entre ellas la PQQ-ADH. El mecanismo de "Protección Respiratoria" mantiene la concentración de oxígeno intracelular a niveles bajos y por tanto no se inactiva la nitrogenasa. Este sistema de protección se describió hace más de 40 años en *Azotobacter chroococcum* por Drozd y Postgate. (6; 13; 32).

En la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* podemos encontrar deshidrogenasas primarias, como la NADH y succinato deshidrogenasas, con su centro activo orientado hacia el citoplasma y a la PQQ-GDH, la PQQ-ADH y la PQQ-ALDH, con su centro activo orientado hacia el espacio periplasmico. Estas ultimas llevan al cabo el proceso de fermentación oxidativa, es decir oxidan de manera incompleta a sus sustratos correspondientes; el aceptor de los electrones producto de la actividad de estas deshidrogenasas es la ubiquinona endógena, la cual en su forma reducida (ubiquinol), dona los electrones directamente a las oxidasas terminales, las citocromos oxidasas ba_3 y bb_3 , presentes bajo condiciones de crecimiento de fijación de nitrógeno (Figura 7) (6; 13).

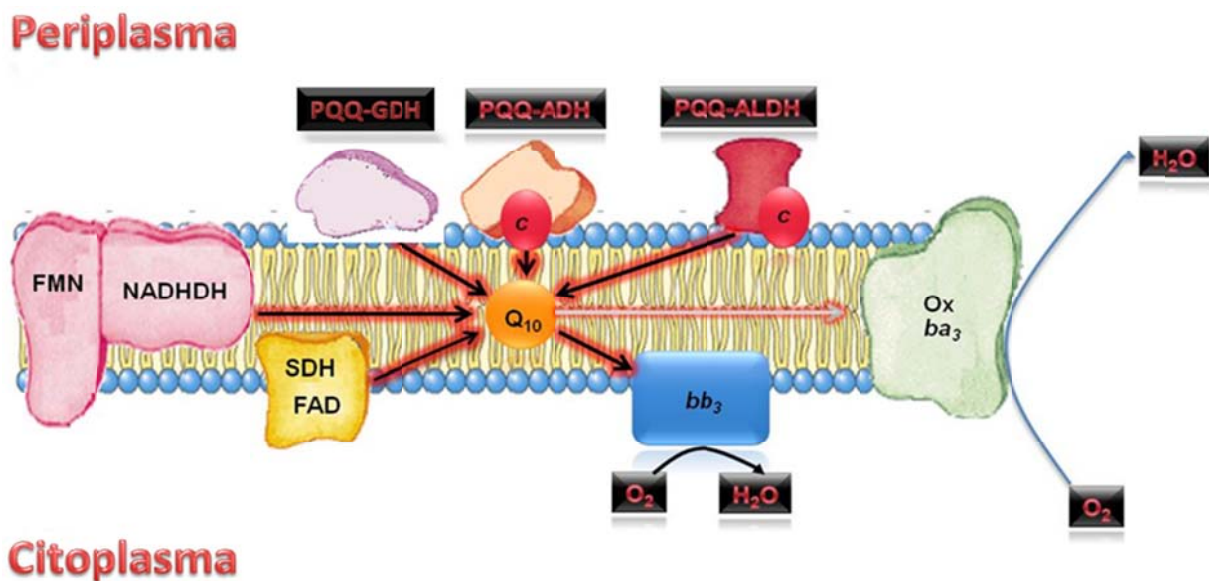


Figura 7 .Esquema de la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* bajo condiciones de fijación de nitrógeno (13).

II.II.II. La PQQ-Alcohol deshidrogenasa

Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Escamilla por Saúl Gómez-Manzo (9), demostraron que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es una quinohemoproteína tipo III, es decir, presenta como grupos prostéticos PQQ y citocromo *c* y está anclada a la membrana. Esta proteína está conformada por dos subunidades; la subunidad I, la catalítica, tiene un peso relativo de 72kDa y contiene a la PQQ y un citocromo *c* como grupos prostéticos; la subunidad II tiene un peso relativo de 44kDa y tres citocromos *c* como grupos prostéticos (Figura 8) La subunidad III esta ausente (11; 12).

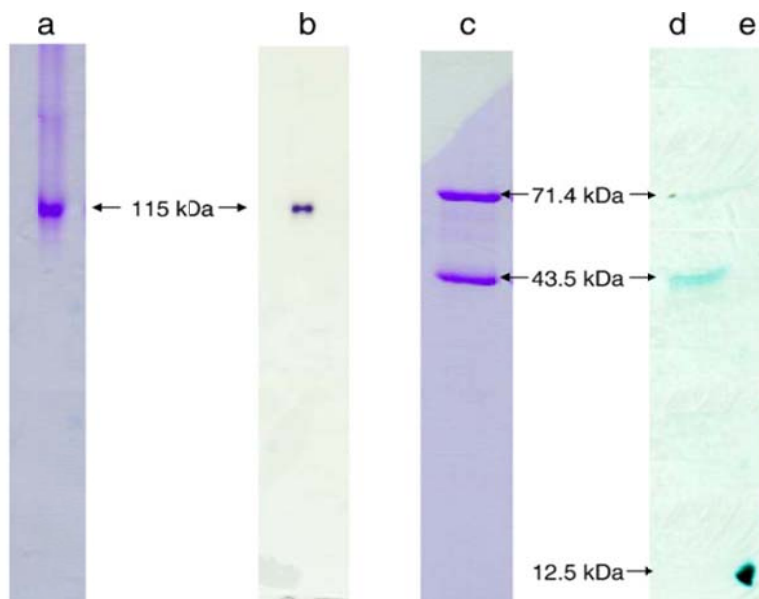
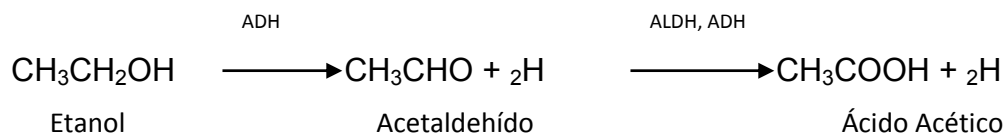


Figura 8. Análisis electroforético de la enzima purificada. Los carriles a y b muestran el análisis por PAGE nativa; el gel se tiñó por Coomassie blue R-250 (a) o por zimografía utilizando alcohol como sustrato y nitroazul de tetrazolium como aceptor de electrones (b). Los carriles c y d muestran el análisis en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE). En el carril c el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 y en el carril d se muestra la zimografía para citocromo *c* utilizando tetrametil-bencidina (11)

La PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, tiene su sitio catalítico orientado hacia el espacio periplásmico y es capaz de transferir los electrones producto de su actividad directamente a la quinona endógena Q₁₀ (12; 13). La enzima es capaz de oxidar tanto alcoholes primarios como secundarios.

La caracterización de la enzima hizo posible determinar que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es una enzima de doble función. Es decir, además de llevar al cabo la oxidación de etanol a acetaldehído puede, bajo ciertas condiciones, catalizar la oxidación de acetaldehído a ácido acético, como lo hace la ALDH. (11; 12):



II.II.III. Mutante PQQ-ADH⁻ *Ga. diazotrophicus* (mutante C6)

En un estudio previo realizado en el laboratorio (1), se seleccionó a una mutante espontánea PQQ-ADH⁻ de *Ga. diazotrophicus* (mutante C6), por su resistencia a 2 mM de alcohol alílico. La mutante puede crecer en presencia de este alcohol,

porque carece de actividad de la PQQ-ADH, ya que si la enzima estuviera activa, la oxidación del alcohol produciría acroleína, compuesto que es sumamente tóxico para la célula (Figura 9). Esta mutante fue caracterizada y se observó que puede crecer en condiciones de fijación de nitrógeno y mantiene la actividad de las otras deshidrogenasas de la cadena respiratoria sin variación.



Figura 9. Reacción de oxidación del alcohol alílico catalizada por la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Una posible razón de la inactividad de la PQQ-ADH en esta cepa podría ser la falta de sus grupos prostéticos. Se buscó la presencia de citocromos *c* por espectrofotometría y zimografía en geles SDS-PAGE (Figura 10). Los resultados indicaron que la cepa C6 carece de citocromos *c*, de acuerdo a la determinación espectrofotométrica y al resultado negativo obtenido en la zimografía cuando se utiliza tetrametil-bencidina, el cual reacciona con los grupos hemo del citocromo produciendo una banda de color azul-verdoso, como se muestra para el citocromo *c* de caballo usado como control (Figura 10).

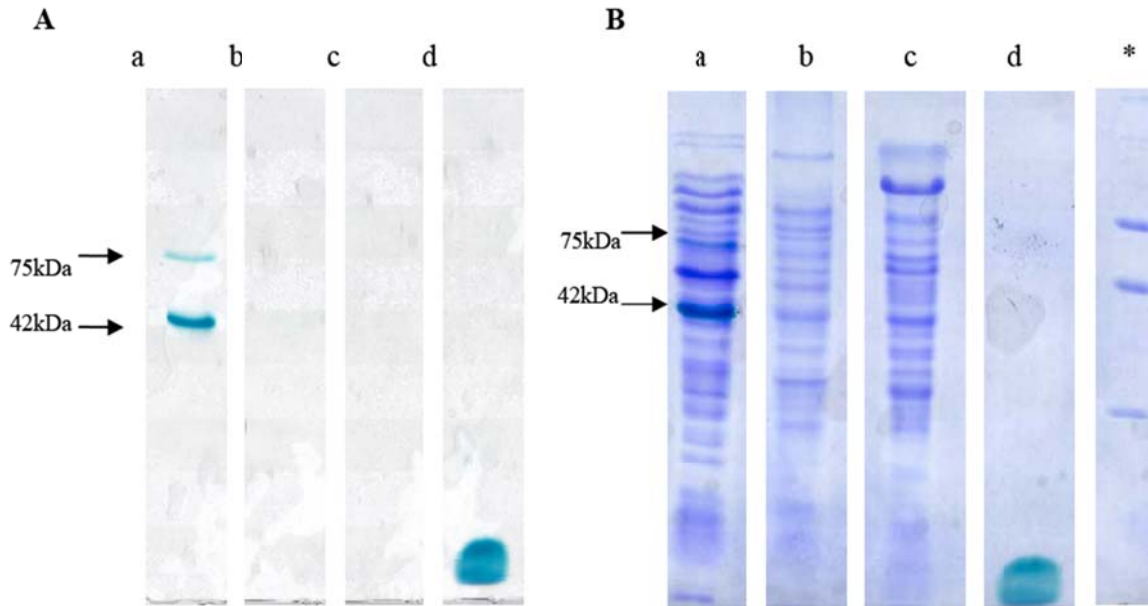


Figura 10. Análisis de la presencia del grupo prostético citocromo *c* en diferentes cepas de *Ga. diazotrophicus*. (A) Zimografía en SDS-PAGE para citocromo *c*, utilizando tetrametil-bencidina (B) El mismo gel teñido con azul de Coomassie. a) cepa silvestre b) mutante C6 (PQQ-ADH⁻). Como controles: c) mutante *ccm*-MAd21 (mutante en la biogénesis de citocromo *c*) d) citocromo *c* de caballo (1)

De acuerdo a los resultados obtenidos la mutante no tiene citocromo *c*, pero no sabíamos si la carencia del citocromo se debe a que no se está integrando a la proteína o a la ausencia de la proteína en la membrana. Para contestar esta pregunta se decidió realizar un ensayo de inmuno-detección de la PQQ-ADH en la mutante C6.

Para este ensayo se obtuvieron, a partir de la enzima purificada por Gómez y col, anticuerpos multiclonaes de conejo. La cepa silvestre y la mutante *ccm*-MAd21 sirvieron de control del experimento. Con membranas de las diferentes cepas se

corrió una SDS_PAGE y con las proteínas separadas se realizó un Western blot (Figura 11).

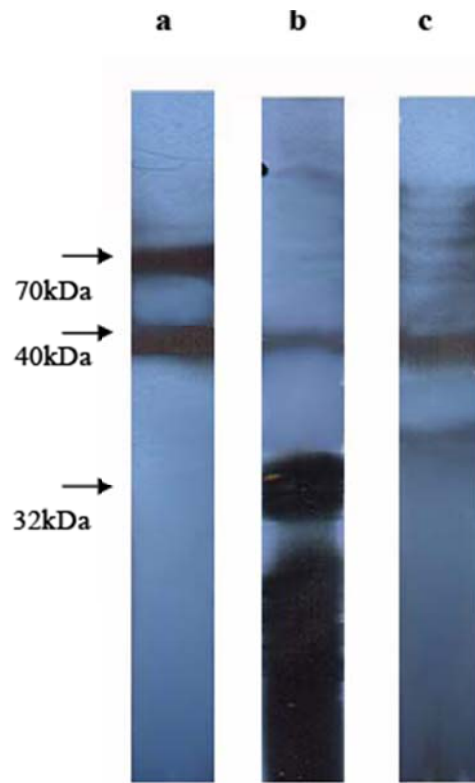


Figura 11. Inmunodetección de la PQQ-ADH en membranas. Se corrió una SDS-PAGE y a partir de las proteínas separadas se realizó el western blot utilizando anticuerpos policlonales contra la enzima completa. a) membranas de cepa silvestre b) membranas de *ccm-MAd21* (cit c⁻) y c) membranas de la mutante PQQ-ADH⁻ (1).

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de la subunidad I (catalítica) en la cepa silvestre, mientras tanto la mutante *ccm-MAd21* (deficiente en la biogénesis de citocromos c) como la mutante C6 (deficiente en la actividad de PQQ-ADH), carecían de esta subunidad integrada a membrana. En cuanto a la subunidad II, pudo ser detectada en las tres cepas, aunque en la mutante C6 se observa disminuida en su concentración. (1).

La información anterior despertó el interés por caracterizar a nivel genómico a la mutante C6, por lo que este trabajo está enfocado en estudiar a los genes que codifican a las dos subunidades de la PQQ-ADH en la mutante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* C6 (ADH⁻), y así poder encontrar la razón por la que la subunidad I está ausente en la membrana y por tanto, la PQQ-ADH es inactiva en esta mutante.

III. Objetivo General

- Determinar la naturaleza de la mutación que confiere el fenotipo PQQ-ADH⁻ en la mutante C6 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a través del análisis de la secuencia del operón adhA-B

IV. Metas

- i. Diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes que codifica para las dos subunidades de la PQQ-ADH.
- ii. Estandarizar las condiciones de amplificación de los genes tanto de la cepa silvestre como de la mutante PQQ-ADH⁻, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- iii. Comparar los fragmentos obtenidos a partir del DNA cromosomal de ambas cepas, por electroforesis en agarosa.
- iv. Secuenciar los fragmentos obtenidos a partir del DNA cromosomal de la mutante PQQ-ADH⁻.
- v. Analizar las secuencias obtenidas comparando con la secuencias de los genes de la cepa silvestre, para determinar la causa de la mutación.
- vi. Utilizando las base de datos, comparar con las secuencias de otras especies de la familia de las BAA.

V. Justificación

La obtención de la secuencia de los genes que codifican a la PQQ-ADH en la mutante C6, nos permitirá determinar si la causa de la falta de integración de la subunidad I (catalítica) de esta enzima a la membrana es debida a una afectación a nivel del operón que la codifica y así explicar la ausencia de su actividad.

VI. Material y Método

VI.I. Material Biológico

Ga. diazotrophicus PAL5 ATCC49037 (cepa silvestre) y la mutante espontánea *Ga. diazotrophicus* C6 (PQQ-ADH⁻), fue obtenida utilizando el alcohol alílico como factor de selección.

VI.II. Medios y condiciones de Cultivo

Ga. diazotrophicus PAL5 se creció en un medio mínimo adicionado de 5 % de azúcar (LGIP modificado (6)), el cual consiste de: 5 g K_2HPO_4 , 4 g KH_2PO_4 , 0.2 g $MgCl_2$, 0.02 g $CaCl_2$, 0.01 g $FeCl_3$, 5 g de citrato de sodio, 0.2642 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.002 g Na_2MoO_2 , y 50 g sacarosa para un litro de medio; el pH fue ajustado a 5.5. *Ga. diazotrophicus* C6 se creció en Caldo Nutritivo adicionado con sacarosa al 5%, pH 5.5 y 2 mM de alcohol alílico como factor de selección.

Ambas cepas se crecieron en condiciones aeróbicas, con una agitación constante (200 r.p.m) a 30 °C, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (24 hrs para la cepa silvestre y 36 hrs para la cepa mutante).

VI.III. Mantenimiento del material biológico

Para la conservación de las cepas, *Ga. diazotrophicus* PAL 5 y C6 fueron crecidas en sus medios respectivos y condiciones mencionadas anteriormente, hasta fase de crecimiento logarítmica y a partir de estos cultivos se hicieron gliceroles (50% de glicerol esteril, 50% del cultivo activo).

VI.IV. Selección de Mutantes espontáneas PQQ-ADH⁻ de *Ga.*

diazotrophicus

El aislamiento de las mutantes *Ga. diazotrophicus* PQQ-ADH⁻, se realizó con alcohol alílico como factor de selección, de acuerdo a los reportes previos en los que este alcohol fue utilizado para la obtención de mutantes de esta enzima en *Escherichia coli* (22). La cepa silvestre fue crecida en cajas de agar nutritivo adicionado con azúcar al 5% y 2 mM de alcohol alílico a pH 5.5. Las colonias obtenidas fueron probadas por su capacidad de oxidar etanol, glucosa y acetaldehído. Se obtuvieron 8 colonias, de las cuales la sexta (C6) fue capaz de oxidar glucosa y acetaldehído, pero no etanol; esta mutante fue seleccionada y se obtuvieron gliceroles para su almacenamiento.

VI.V. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), es una técnica de biología molecular en la que se recrea el mecanismo celular de replicación del DNA y nos permite obtener varias copias de un fragmento específico *in vitro*. La reacción se lleva al cabo en un termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf) y se dan varios ciclos que implican la desnaturalización del

DNA templado, el alineamiento de los oligonucleótidos y la elongación del DNA a partir de estos oligonucleótidos por acción de una DNA polimerasa.

El protocolo para la reacción de PCR se muestra a continuación:

Polimerasa AccuPrime™ Pfx SuperMix (Invitrogen)	22.5µL
Oligonucleotido Forward (50pmoles/µl)	1.5 µL
Oligonucleotido Reverse (50pmoles/µl)	1.5 µL
DNA (Silvestre o C6)	2 µL
Dimetilsulfóxido	2 µL
Total	29.5 µL

Paso	Temperatura	Tiempo minutos.	Ciclos
Desnaturalización	95°C	10	1
Desnaturalización	95°C	1:30	35
Alineamiento ¹	72.5° o 56°C	1:30	
Elongación	68°C	4:30	
Elongación Final	68°C	10	1
Incubación	4°C	∞	∞

La temperatura 72.5° corresponde para los oligos utilizados para amplificar el gen *adhA* (subunidad I) y 56°C corresponde para los oligos utilizados para amplificar el gen *adhB* (subunidad II) de la PQQ-ADH.

VI.VI. Extracción de DNA Genómico

La purificación de DNA genómico de la cepa silvestre y de la mutante C6 se realizó mediante el protocolo de extracción utilizando fenol-cloroformo (Tabla 3). El protocolo se describe a continuación:

1. Obtener un cultivo de 50mL de cada cepa (silvestre o C6), agregando 2mL de inóculo activo en sus respectivos medios y permitir el crecimiento por 24 horas.
2. Agregar 1.5mL de cada cultivo en dos tubos eppendorf y centrifugar a 10,000 rpm por 40 segundos.
3. Lavar las células agregando 500µL de amortiguador TE, agitar con vórtex para homogeneizar correctamente y centrifugar a 10,000 rpm por 40 segundos.
4. Retirar el sobrenadante y repetir el paso anterior.
5. Agregar 50µL de lisozima a una concentración de 10 mg/mL, agitar con vórtex por 10 segundos e incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Agregar 50µL de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL, agitar con vórtex por 10 segundos e incubar a 37°C por 30 minutos.
7. Agregar 50µL de SDS 10%, agitar invirtiendo el tubo suavemente e incubar a 37°C por 15 minutos.
8. Agregar 100µL de NaCl 5 M, agitar invirtiendo el tubo suavemente e incubar a 65°C por 10 min.
9. Adicionar 80µL de una solución de CTAB al 10% en NaCl 0.7 M; agitar invirtiendo el tubo suavemente e incubar de 15 a 20 minutos a 65°C.
10. Dejar enfriar y agregar 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, mezclar y centrifugar a 10, 000 rpm por 10 minutos.

11. Separar la fase acuosa en un tubo limpio y estéril y agregar 0.6 volúmenes de fenol cloroformo-alcohol isoamílico 24:1; mezclar y centrifugar a 10, 000 rpm por 10 minutos.
12. Separar la fase acuosa en un tubo limpio y estéril y agregar 0.6 volúmenes de fenol cloroformo-alcohol isoamílico 24:1; mezclar y centrifugar a 10, 000 rpm por 10 minutos.
13. Separar la fase acuosa en un tubo limpio y estéril y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol frío; mezclar y centrifugar a 10, 000 rpm por 10 minutos.
14. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla de DNA 2 o 3 veces con 1 mL de etanol al 70%, centrifugando a 10, 000 rpm por 5 minutos por cada lavada.
15. Evaporar el alcohol.
16. Cuando ya no existan rastros de etanol, resuspender la pastilla de DNA en 55 μ L de agua estéril.
17. Agregar de 1 a 2 μ L de RNAsa y dejar en reposo 30 minutos a 37°C.
18. Almacenar a -20°C.

Tabla 3. Soluciones utilizadas para la extracción del DNA

Reactivo	Concentración
TE (Tris-EDTA) pH 8	50mM Tris 20mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
SDS	10% (w/v)
NaCl	5M
CTAB en NaCl	10% (w/v) de CTAB 0.7M de NaCl
Cloroformo – alcohol isoamilico	24:1
Fenol – Cloroformo – alcohol isoamilico	El fenol se agrega en igual proporción que el Cloroformo –alcohol isoamilico el cual se toma de la solución anterior con concentración 24:1, es decir, para tener 1mL total se agregan 500 μ L de cada solución.
Etanol	70% (v/v)

VI.VII. Electroforesis

La electroforesis de DNA se realizó en gel de agarosa al 1% preparado con amortiguador TBE (1X) (Tabla 4) y se corrió en el mismo amortiguador entre 85-90V. Como amortiguador de carga se empleó el de la marca QIAGEN y como marcador de peso molecular se empleó el 1kb DNA Ladder de New England BioLabs.

Tabla 4. Soluciones utilizadas para la electroforesis.

Amortiguador de Corrida TBE 10X	
Reactivo	Concentración
Tris	1.0 M
Ácido Bórico	0.9 M
EDTA	0.01 M

VI.VII.I. Extracción en gel de agarosa

Para extraer el DNA a partir de una banda obtenida por electroforesis se utilizó el Kit para extracción de gel de agarosa QIAquick gel extraction de QIAGEN, de acuerdo a las instrucciones del proveedor:

- Corta la banda de DNA deseada, evitando el exceso de agarosa.
- Colocar la banda(s) en un tubo eppendorf y pesar; el peso de la banda(s), es un volumen de gel.
- Agregan 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel.
- Incuba por 10 minutos a una temperatura de 50°C o de lo contrario hasta que la agarosa se haya disuelto por completo, obteniendo al final una mezcla de color amarillo. Si la mezcla llega a ponerse naranja o violeta agregar 10µL de acetato de sodio 3M pH 5 y mezclar.

- Agregar 1 volúmen de isopropanol frío (4°C) por cada volumen de gel y mezclar invirtiendo el tubo suavemente.
- Para adherir el DNA, se pasa la solución a una columna del kit y se centrifuga por 1:30 minutos a 13, 000 rpm; se desecha el sobrenadante.
- Se añaden 500µL de amortiguador QG y se centrifuga por 1 minuto; se retira el sobrenadante. Este paso es requerido solo en el caso de que el DNA vaya a ser utilizado para secuenciación directa, transcripción in vitro o microinyección.
- Para lavar se añaden 750µL de amortiguador PE y se centrifuga por 1 minuto a 13, 000 rpm y se elimina el sobrenadante. Este paso se repite 2 veces más; debe revisarse que ya no existan rastros del amortiguador PE u olor a etanol, de ser así, se centrifuga una vez más. Si el DNA va a ser usado para aplicaciones sensibles a sal como ligación y secuenciación directa, dejar reposar la columna de 2 a 5 minutos después de la adición del amortiguador PE, antes de centrifugar y solo la primera vez.
- La columna se pasa a un tubo eppendorff nuevo y estéril.
- Para eluir el DNA puede utilizarse amortiguador EB ó agua miliQ estéril. Se debe de tener en cuenta la intensidad de la banda purificada para el volumen de elución (entre 10 y 50 µL). Se centrifuga por 1 minuto a 13, 000 rpm, recolectando en un tubo eppendorff nuevo y estéril. El eluido obtenido se rotula y se usa para pruebas posteriores o se almacena entre 4 y -22°C.

VI.VIII. Secuenciación de DNA

Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleotidos con los que se amplificaron cada uno de los fragmentos correspondientes a los genes *adhA* y *adhB* de la cepa silvestre. La secuenciación se llevó al cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología, UNAM. Los datos de la secuencia fueron obtenidos con ayuda del programa Chromas.

VI.IX. Southern Blot

Para determinar qué enzimas de restricción utilizar se obtuvo un mapa de restricción del fragmento conteniendo al gen *adhA*, para evitar que fuera cortado (programa pDRAW 32). Así, las enzimas seleccionadas fueron *Bam*HI, *Hind*III y *Not*I.

1. Digestión del DNA:

- i. Digerir el DNA genómico con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III e incubar por 2 horas por 37°C; inactivar a 65°C.
- ii. Agregar al mismo tubo la enzima de restricción *Not*I incubar durante 2 horas a 37°C; inactivar a 65°C.

Las restricciones se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo:

<i>BamH I + Hind III</i>		
	Silvestre	C6
DNA	11 μ L	10 μ L
H ₂ O	2 μ L	3 μ L
Amortiguador K	2 μ L	2 μ L
<i>BamH I</i>	1 μ L	1 μ L
<i>Hind III</i>	1 μ L	1 μ L
Total	20 μ L	20 μ L

Not I		
	Silvestre	C6
H ₂ O	4 μ L	4 μ L
BSA	2 μ L	2 μ L
Tritón	2 μ L	2 μ L
Amortiguador H	1 μ L	1 μ L
Not I	1 μ L	1 μ L

2. Electroforesis del DNA

- i. Se corrió una electroforesis con el DNA digerido, en un gel de agarosa al 1% a 90V y se tiñó con bromuro de etidio.

ii. Posteriormente se tomo una fotografia del gel utilizando una regla del lado del marcador de peso molecular, para ubicar las bandas en relación al estandar.

3. Transferencia y detección. Para la detección de la banda se empleó el kit Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems de GE Healthcare y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante:

i. El gel fue lavado con solución depurinizadora (Tabla 5) e incubado en agitación lenta por 12 min, hasta observar el vire del azul de bromofenol del marcador a amarillo por el incremento de la acidez.

ii. Se hizo un lavado del gel con agua bidestilada para eliminar la solución depurinizadora y posteriormente se lava con la solución desnaturalizadora (Tabla 5). Se incubó en agitación lenta por 25 min y se observo como el vire del bromofenol regreso a su color azul.

iii. El gel se lavó con agua bidestilada para eliminar la solución desnaturalizadora y se cubrió con solución neutralizadora (Tabla 5); se incubó en agitación lenta por 30 min.

iv. El gel se lavó con agua bidestilada para eliminar la solución neutralizadora.

v. El DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Amersham Hybond™-N⁺ de GE Healthcare durante toda la noche. La fracción móvil para el sistema de capilaridad empleado en la transferencia fue el amortiguador 20X SSC (Tabla 5). El esquema del sistema de capilaridad fue el siguiente: amortiguador 20X SSC en un recipiente, puente de papel filtro de fibra de vidrio, gel de agarosa, membrana de nylon Amersham

Hybond™-N⁺, 3 piezas de papel filtro whatman, papel absorbente, una placa de vidrio/plástico y finalmente un peso de aproximadamente 2Kg (Figura 12).

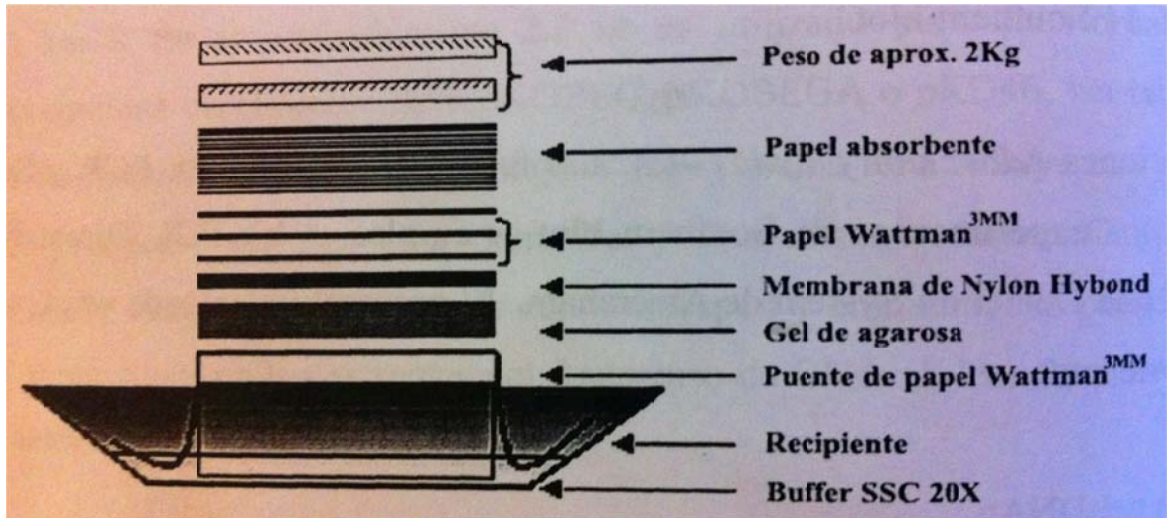


Figura 12. Esquema que muestra el sistema de capilaridad empleado para la transferencia de DNA

Tabla 5. Soluciones utilizadas para la transferencia del DNA

Solución	Componentes
Solución depurinizadora	HCl 250 mM
Solución desnaturalizadora	NaCl 1.5 M NaOH 0.5 M
Solución neutralizadora	NaCl 1.5 M Tris-HCl 0.5 M pH 7.5
Amortiguador 20X SSC	Na ₃ citrato 0.3 M NaCl 3M pH 7.0

- vi. Al terminar la transferencia, en la membrana de nylon se marcaron los carriles de la electroforesis utilizando un lápiz. Posteriormente el DNA se fijó a la membrana utilizando luz UV.

4. Preparación de la sonda de hibridación

#	Protocolo	Notas
1	Diluir el DNA que va a ser marcado, a una concentración de 10ng/ μ L usando el agua suministrada.	La concentración de sal en la muestra de ácidos nucleicos no debe exceder 10 mM.
2	Desnaturalizar 100 ng de la muestra de DNA (10 μ L) por calentamiento durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo.	La mínima cantidad de DNA que debe ser marcada es 100 ng en 10 μ L. Si se requiere más el volumen debe incrementarse apropiadamente manteniendo al mismo tiempo la concentración a 10 ng / μ L.
3	Inmediatamente enfriar el DNA en hielo por 5 minutos. Dar un spin en microcentrifuga para coleccionar el contenido en la parte inferior del tubo.	
4	Añadir un volumen equivalente de agente de marcaje de DNA (10 μ L) al DNA enfriado. Mezclar suavemente.	El volumen de agente de marcaje debe ser igual al volumen de DNA a ser marcado. Por ejemplo 100 ng de DNA en 10 μ L requiere 10 μ L de agente de marcaje.
5	Adicionar el glutaraldehído, usar un volumen equivalente al volumen del agente de marcaje (10 μ L). Mezclar generosamente. Dar un spin en microcentrifuga para coleccionar el contenido al fondo del tubo.	Por ejemplo, 10 μ L de solución de DNA (10 ng / μ L) + 10 μ L de agente de marcaje requerirán 10 μ L de la solución de glutaraldehído.
6	Incubar por 10 minutos a 37°C.	Cuando los nucleótidos marcados sean <300 pb, incrementar el periodo de incubación a 20 minutos, puede mejorar la eficiencia de marcaje.

7	Si no se usa inmediatamente, la prueba puede ser guardada en hielo por un periodo corto, por ejemplo 10-15 minutos.	Las pruebas de marcaje pueden ser guardadas en 30% de glicerol a -15°C a -30°C por hasta seis meses.
---	---	--

5. Hibridización y lavados de astringencia.

1.	<p>Preparar el amortiguador de hibridización de la siguiente manera:</p> <p>A temperatura ambiente, tomar el volumen requerido de amortiguador de hibridización (30 mL). Añadir cloruro de sodio sólido (grado analítico) a una concentración que es la más adecuada para una prueba de hibridización efectiva.</p> <p>Añadir agente de bloqueo a una concentración final de 5% (w/v). Inmediatamente mezclar completamente el agente de bloqueo en una suspensión.</p> <p>Continuar mezclando a temperatura ambiente por 1 hora en un agitador magnético, luego calentar a 42° C por 0.5 – 1 hora mezclando ocasionalmente.</p>	<p>0.25mL/cm² es recomendado para blots pequeños y 0.125mL para membranas grandes.</p> <p>La concentración óptima de cloruro de sodio puede ser diferente para diferentes pruebas. 0.5 M NaCl generalmente da buenos resultados.</p>
2.	Si es necesario precalentar el volumen requerido de amortiguador de hibridización a 42°C, colocar las membranas en el amortiguador y prehibridizar por 15 minutos a 42°C con agitación suave.	
3.	Siguiendo a la prehibridización, añadir la prueba de marcaje al amortiguador de prehibridización. Evitar colocarla directamente en la membrana y mezclar suavemente. Continuar incubando con agitación suave toda la noche a 42°C.	Es importante no exceder 42°C durante la hibridación; altas temperaturas son perjudiciales al componente enzimático del agente de marcaje de DNA.
4.	Preparar el amortiguador de lavado primario y precalentar a 42°C. Este es usado en exceso a un volumen aproximado de 2-5mL/cm ² de membrana. Cuidadosamente transferir las membranas a la	Cada lavado primario no debe exceder los 20 minutos para proteger la actividad enzimática de

	solución y lavar por 20 minutos con agitación suave, asegurando no exceder la temperatura de 42°C.	peroxidasa. Se puede almacenar el amortiguador de lavado primario a una temperatura estable de 2-8°C por un máximo de 3 meses.
5.	Llevar a cabo un nuevo lavado en amortiguador de lavado primario fresco a 42°C por 20 minutos.	
6.	Colocar la membrana en un contenedor limpio y agregar en exceso amortiguador de lavado secundario. Lavar con agitación suave por 5 minutos a temperatura ambiente. Llevar a cabo un nuevo lavado en amortiguador de lavado secundario fresco a temperatura ambiente por 5 minutos. Llevar a cabo un nuevo lavado en amortiguador de lavado primario fresco a 42°C por 20 minutos.	Si es necesario la membrana puede ser dejada en amortiguador de lavado secundario hasta 30 minutos a temperatura ambiente antes de la detección.

1) Generación de una señal quimiofluorescente y detección con ECL

		Notas
1.	Mezclar en volúmenes iguales el agente de detección 1 con el agente de detección 2 para dar solución suficiente para cubrir la membrana. 0.125 mL/cm ² es recomendado. Nuestro gel tiene 60 cm ² x 0.125 cm ² = 7.5 mL Por lo tanto se deben tomar 3.75 mL de cada reactivo.	Mezclar solo el volumen de detección necesario para cubrir la membrana. No es recomendable almacenar la solución mezclada. Si no se usa inmediatamente, la solución de detección preparada puede ser dejada en hielo por un corto periodo, por ejemplo 30 minutos. Evitar la contaminación de los agentes de detección 1 y 2.
2.	Drenar el exceso de amortiguador de lavado secundario de la membrana y colocarla en un contenedor limpio o sobre una sabana de SaranWrap, con el DNA hacia arriba. Agregar el agente de detección directamente sobre la	

	membrana en la carga del sitio del DNA; no dejar que la membrana se seque.	
3.	Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.	
4.	Drenar el exceso de agente de detección y envolver la membrana en SaranWrap. Dejando fuera cualquier burbuja.	
5.	Colocar la membrana con el DNA hacia arriba en el cassette. Realizar el trabajo lo más rápido posible para minimizar el retraso entre la incubación de las membranas en sustrato y la exposición al film.	
6.	Apagar las luces y colocar una hoja de film de autoradiografía en la parte superior de la membrana. Cerrar el cassette y exponer por 30 segundos.	
7.	Remover el film y revelar. Si es necesario, exponer un segundo film para una medida apropiada de tiempo.	

2) Revelado del Film

1.	Llevar al cuarto oscuro: reloj, pinzas y el cassette con el film a revelar. Antes de iniciar: verificar que las soluciones de revelado y fijador no presenten un color café/amarillento muy obvio (caducas). Si este es el caso, hay que preparar nuevas soluciones y almacenar en botellas perfectamente enjuagadas con agua desionizada. La mayor parte de problemas de revelado tiene que ver con soluciones caducas o con contaminación entre las soluciones de revelador y fijador.
2.	Cerrar el cuarto con seguro, encender la luz roja.
3.	Llenar una charola plástica con revelador, otra con agua de la llave, otra con fijador y una última con agua de la llave. Colocar en este mismo orden las cuatro charolas encima de la mesa.
4.	Sumergir el film en el revelador y agitar manualmente hasta que aparezca señal.

	Entre 1-5 minutos, o lo que indique el fabricante del kit del Southern.
5.	Ecurrir cuidadosamente y transferir el film a la charola con agua. Agitar con la mano por aproximadamente 60 segundos, de preferencia lavar el film con agua corriente antes de transferir al fijador.
6.	Ecurrir cuidadosamente y transferir el film al fijador por al menos 3 minutos.
7.	Enjuagar abundantemente el film con el agua de la última charola o directamente en la tarja con un leve chorro de agua. Si el fijador no se elimina completamente, el film adquiere un color amarillento al secarse y se pierde contraste y resolución.
8.	Ecurrir y poner a secar el film colgado en las pinzas prensapapeles.
9.	Regresar cada solución a su frasco y enjuagar las charolas.

Amortiguador	Componente						
Amortiguador de hibridización	<p>Adicionar NaCl grado analítico a la solución de amortiguador de hibridización para obtener una concentración de 0.5 M.</p> <p>Adicionar el agente bloqueador para obtener una concentración final de 5% (w/v). Para mejores resultados adicionar el agente bloqueador despacio a la solución del amortiguador mientras se agita.</p> <p>Continuar mezclando a temperatura ambiente durante 1 hora en agitador magnético. Este amortiguador puede ser usado inmediatamente o almacenado en alícuotas de -15 a -30°C.</p>						
Amortiguador para lavado primario	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center;">Urea 360 g</td> <td style="text-align: center;">6 M</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">SDS 4 g</td> <td style="text-align: center;">0.4%</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">20 x SSC 25 mL</td> <td style="text-align: center;">0.5 x SSC</td> </tr> </table> <p>Volumen final de 1L. Este amortiguador puede ser almacenado hasta 3 meses en refrigerador a 2-8°C.</p>	Urea 360 g	6 M	SDS 4 g	0.4%	20 x SSC 25 mL	0.5 x SSC
Urea 360 g	6 M						
SDS 4 g	0.4%						
20 x SSC 25 mL	0.5 x SSC						
Amortiguador para lavado secundario	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center;">20 x SSC</td> <td style="text-align: center;">100mL</td> </tr> </table> <p>Volumen final de 1L para obtener 2x SCC. Puede ser almacenado hasta 3 meses en refrigerador a 2-8°C.</p>	20 x SSC	100mL				
20 x SSC	100mL						

VII. Resultados

Ga. diazotrophicus presenta un mecanismo de protección respiratoria a la nitrogenasa, resultado de una alta tasa de respiración asociada a la fermentación oxidativa, proceso en el que se oxidan de manera incompleta azúcares y alcoholes. Entre las enzimas que llevan al cabo este proceso se encuentra la alcohol deshidrogenasa membranal (PQQ-ADH).

Buscando determinar la importancia de esta enzima en la fijación de nitrógeno y la oxidación de alcoholes en *Ga. diazotrophicus*, obtuvimos mutantes espontáneos de la vía de oxidación de alcoholes en esta bacteria y seleccionamos a una mutante (la mutante C6) por crecer en presencia de alcohol alílico.

Para explicar la causa de la mutación en la cepa C6, decidimos hacer una caracterización genómica de esta mutante, enfocando nuestra atención en determinar si existía una inserción de DNA ajeno al operón *adh* que codifica para la PQQ-ADH.

Como hemos mencionado, este operón está formado por 2 genes: el *adhA* que codifica para la subunidad catalítica y el gen *adhB* que codifica para la subunidad pequeña. Decidimos amplificar por PCR ambos genes en búsqueda de dichas secuencias.

VII.I. Amplificación de los genes que codifican a la PQQ-ADH

Se diseñaron oligonucleotidos que permitieran amplificar por PCR los genes *adhA* y *adhB*. Usando la base de datos del NCBI se obtuvieron las secuencias de ambos genes dentro de la secuencia del DNA genómico de *Ga. dizotrophicus* PAL 5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; No. de acceso GenBank [AM889285](#); No. de acceso GenBank de *adhA* [CAP55983.1](#); No. de acceso GenBank de *adhB* [CAP55984.1](#)).

Los genes que forman el operón *adh* se localizan entre las 2082961 y 2085241pb para *adhA* y entre las 2085241 y 2086621pb para *adhB* ([Figura 13](#)) Los programas pDRAW32, DNASTar y Lasergene fueron usados para realizar el diseño de los oligonucleotidos que codifican para las dos subunidades. Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados fueron:

Oligonucleótidos para *adhA* (subunidad I); se obtiene un amplificado de 4136 pb en la cepa silvestre:

- *adhAF* 5'-ACCAAATCCCGGGACCAAACAC- 3' T_m= 68°C
- *adhAR* 5'-CACGGACGGCAGGCTCTTCA- 3' T_m= 69°C

Con los oligonucleótidos diseñados para ambas subunidades se realizaron las reacciones de amplificación (PCR), como se indica en la metodología. Los tamaños esperados para los fragmentos amplificados en la cepa silvestre son de 4136 pb para la *adhA* y de 1489 pb para *adhB*.

Los resultados obtenidos al hacer el análisis electroforético de los fragmentos amplificados para *adhA* y *adhB* a partir del DNA genómico de la cepa silvestre, están de acuerdo con los tamaños esperados (Figura 14 Ab y Bb). En el caso de la cepa C6, el tamaño del fragmento obtenido para el gen *adhB* también corresponde al esperado, es decir, es el mismo que para la cepa silvestre (Figura 14 Bc).

Sin embargo, en el caso del gen *adhA* en la mutante C6 encontramos diferencias. El fragmento amplificado para este gen en la mutante está aumentado aproximadamente en 1500pb con respecto al tamaño esperado (de aproximadamente 4000 a 5500 pb) (Figura 14 Ac y Ad). Este aumento en el tamaño es indicativo de la inserción de DNA ajeno al gen, el cual podría ser el responsable del fenotipo PQQ-ADH⁻ en la cepa C6.

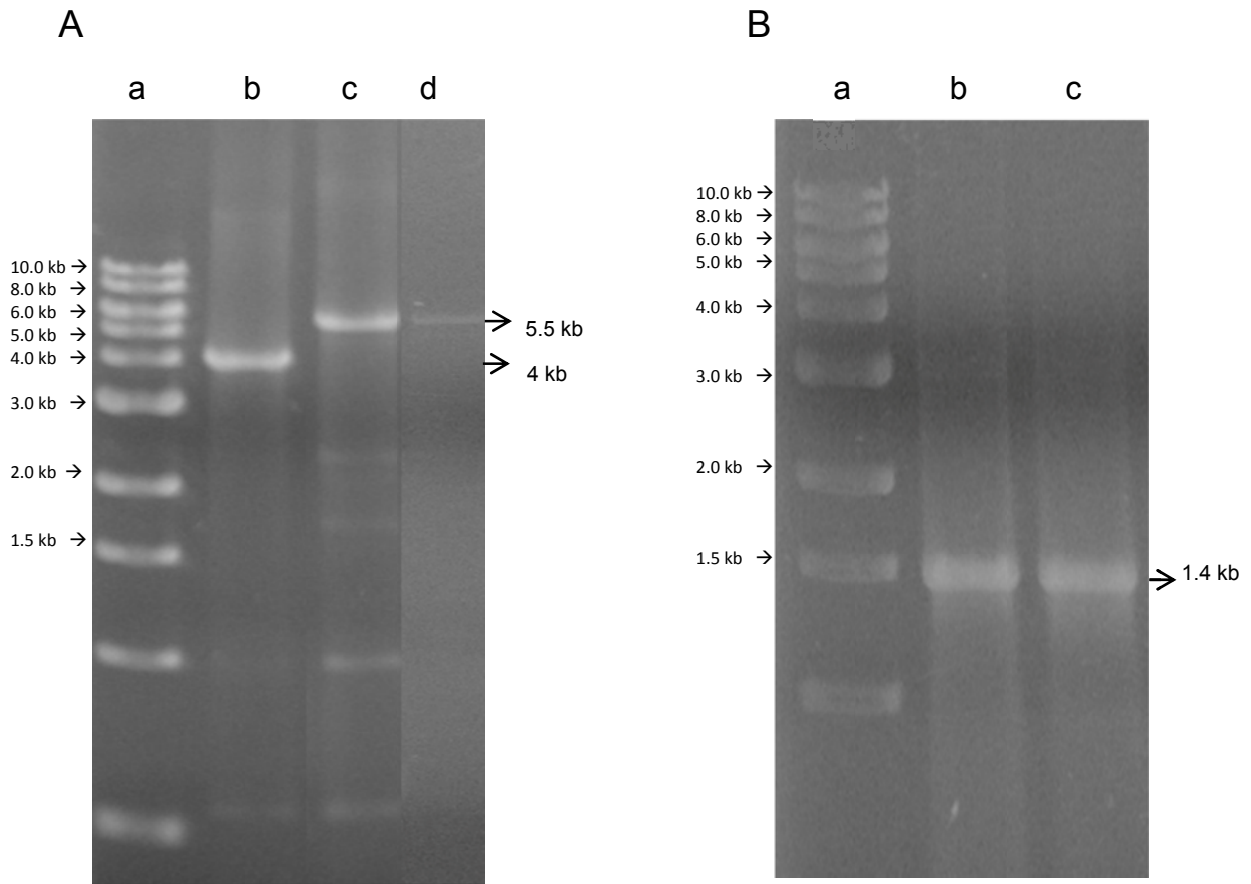


Figura 14. Análisis electroforético de los fragmentos obtenidos de la amplificación de los genes *adhA* (A) y *adhB* (B) de las cepas silvestre y C6 de *Ga. diazotrophicus*. Para ambas figuras el carril (a) corresponde al estándar, el carril (b) a la cepa silvestre y el carril (c) a la mutante C6. En el panel A, d corresponde al fragmento obtenido de la cepa C6 purificado.

De acuerdo a los resultados anteriores, era necesario conocer a qué correspondía la secuencia de nucleótidos adicionales en la *adhA* de C6. Para ello el fragmento fue purificado y se realizó una secuenciación (Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

VII.II. Análisis de la secuencia adicional en el gen *adhA*

La secuenciación del gen *adhA* de la cepa C6 se realizó utilizando los oligonucleótidos diseñados para amplificar este gen y se analizó con ayuda de los programas Chromas (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>), Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>) (Figura 15).

```
ATGATGCGAGCCGTTTACGGGAAAAGACGTTCTCTCCGCGGAACGCTTGCCGTGCGAACGATATGCGCCGCGACATTCCTTT
GGATATACGGCGGCGACCAGTGCCGCCGAATCCGAATTCGGCGCGACGGGTGAAGCAATTATCCATGCGGACGACCATCCC
GGCGACTGGCTGACCTACGGCCGCACCTATTCCGAGCAGCGTTATAGCCCGCTGGACCAGATCAACCGGTCCAATGTCGGC
AACCTGAAGCTGGCCTGGTATTACGACCTGGACACCAACCGTGGGCAGGAAGGCACGCCGCTGATCGTCGATGGCGTGATG
TACGCCACCACGAAGTGGAGCAAGATGAAGGCCCTGGACGCGGCCACGGGCAAGCTGCTGTGGGCGTACGACCCCCGCGTG
CCCGGCAATATCGCCGACAAGGGATGCTGTGACACCGTCAATCGCGGTGCGGCCCTACTGGAACTGCCAGCCGTAATCGGGC
CTGAGCGGTGCTGCTCGATTGGCGGTCTCCCGGGCCGAAAGAAGGTAGAGTTGCCGCGGTGAAACAGCAGCGCGGGAGGC
GTGCGATGGAATTCCTTTGCGGTCTCGATGTGTGATCGACGAAACGGCGGTCTGTGTGGTGGACGAGCGGGCACCGTGC
ATCTGGAAACGACGGTGGCCACGGACCCGGCTGCGCTCAGGGATGCCGTGAAGCCGTTCTTGCCGCGCTGCGCCGTATGG
GTCACGAGGCAGGTTCCCTGTGCGCCTGGCTGCATCCGGAGATGCTGGCGCTGGGCCTGCCGGCGGTCTGCCTGGAGACGA
AACACGTGCGGGCGCGATGTGCGGCGACGCAACAAGACCGACAAGCGGACGCGCTGGGGATCGGCATATCGTGCACA
CCGGCTGGTTCCGGACGCGCCATATCAAGAGCGAAGCAAGCTATCGGCTGCGTCTGATCCTGACCCAGCGCAGCACGCTCA
AGCGCAAATTCATGGATTCGAGAATACGATCCGCCATTCGCTCAAGCGGTTCCGATATCCGCCTGGGCACGGTCTCGCGGG
CGCGCTTCGACACCGCGTTTCGCGAGGCCGTGGCGCAGGACGCGCTGACCCGCGATCTCATGGAGGCGATGCTGCGGGCGA
AGCCGTGCTCTGGGAAGAATATACCCGGCTGCACAAGCTGGTGGTGCAGGATCGTCGCGGGTGACGAGGTGTGCCGGCGGTT
CATGGCCATTCGGGGGTGGGGCCGGTGACCGCGCTTGGCGTGATGACGGCGATCGACGATCCGTCGCGCTTCCGGCGCTC
GCGCGACGTGCGGGGTATTTCCGGCTGACGTGCGCGCGCTGCAGTCCGGTACCAGCATCGATGTGCAGGGACGCATCAGC
AAGGCCGGCGATCCGGAGGTGCGGGCGTCCCTCTATGAAGCGGCGTCTGCTGCTGACGCGTTTCAAGGGGCGCGACAAGC
TGCGGACCTGGGGCTGGAACCTGGCGAAACGGTCTTCCCATCGCAAGGCGGCGGTGCGCGTGGCGCGCAAGATGGCCGTGA
TCATGCATGCCATGTGGCTCGACGGAACGGTCTATGACGGCGGTCCGGCCGTGATCCCGAAGAGCGGGCCCGTCAATCG
CTTGCAAGAACCGCAAATTCGCGGGGCGCTCGCGTGAGTGTCCAGCTGCAAAGGAATGTTCCGCGCGGTGTCGGGATGAC
CGCGGCGTTCTGAACAGGGAGATCCGCCAAGGCGGATGGGGAAGGTTGACGTCGAGGACGACGGGAAGCAGCATATCTTGC
CTGGAGCACGCGCAGGTGAACGCTTGGGACTCCGCTCGAGTGCCTGTGATGCTGCCCGTGAATCCGATGGCAAAATG
CGCCACGACGAAAGGCCGGCCCGCCATCCACGGATGGGGCGGCATATCAGTCGTGCTGAGCGCGGAAGAGTGCACGGCGT
GCCACGAACCTCAGTCAGGGCCGAGATGCCAGTCCAGGAGCAGAAGTGTGATCGTGAAAGGAAGCTAAAGGAAAACGAAG
AATGAAAACCTTGACCAAAAACCCGCCGATTAAGAGCGCAAGGTCTATTTCCGGCACGTTTCGACGGAAGGCTGATCGCGC
TGGACGCCAAGACCGGCAAGCTGGTCTGGAGCGTGAACACCATCCCCCGACGCGGCCCTGGGCCACCAGCGTTCCTACA
CCGTGGACGGCGCGCCCGTATCGCCAAGGGCCGGTCAATCATCGGCAATGGTGGATCGGAATTCGGCGCGCGCGGCTTCG
TTTCGGCTTCGACGCCGAGACCGGCAAGCTGGACTGGCGCTTCTACACGGTGCCGAATGCGCAGAACAAAGCCGGACAACG
CGCCGTCGACGCTGTCTGATGAGCAAGGCGTACCCGACCTGGAGCCCACCGGCGCATGGACGACCCAGGGCGGCGGGC
GCACGGTATGGGATTCGATCGTCTATGACCCCGTGACCGATCTGGTCTATCTGGGCGTGGGCAACGGGTGCGCCCTGGAAC
```

ACAAGTTCGGTTCGACGGCAAGGGCGATAACCTGTTCTGCGCAGCATCGTTCGCGCTCAAGCCCGAAACCGGCGAATATG
TCTGGCATTTCCAGGAAACGCCGATGGACCAGTGGGACTATACCTCGGTCCAGCAGATCATGACGCTGGATCTGCCCATCA
ACGGGCAGACGCGGCATGTCATCGTCCATGCGCCGAAGAACGGCTTCTTCTACATCATCGACGCCAAGACCGGCGAATTC
TGTCGGGCAAGAACTATGTCTACGTGAACTGGGCCAGCGGCCTGGACCCGAAGACCGCCGTCGGATCTATAACCCGGATG
CGCTCTATACCCTGAACGGCAAGGAATGGTACGGCATCCCGGGCGATCTGGGCGGCCACAATTTTCGCGGCCATGGCCTTCA
GCCCCGGACCGGACTGGTCTATATCCCGGCCAGCAGGTGCCATTCTGTATACGAGCCAGGTTCGCGGCCTTCAAGCCGC
ATCCGGACAGCTGGAATCTCGGCCTCGACATGAACAAGGTTCGGCGTCACGGATTTCGCCGAGGCCAAGCAGGCCTTTCATCA
AGGACCTGAAGGGCTGGATCGTTCGCTGGGACCCGGTGAAGCAGCAGGAAGCGTTCGCGCTCGACCACAAAGGCCCGTGGA
ATGGCGGTATCGTGGCCACCGGCGGCACCTGCTGTTCAGGGCCTGGCGAACGGCGAATTCATGCCTACGACGCCACCA
ACGGCGCCGACCTGTTCCACTTCGCGGCGCAGAGCGGCATCATCGCCCCGCCGTTCACCTACATGGCCAACGGCAAGCAGT
ATGTCGCGGTTCGAGGTTCGGATGGGGCGGCATCTATCCGTTCTTCTGGGTGGCCTGGCGCGGACCAGCGGCTGGACCGTCA
ACCATTCGCGCGTTCATCGCTTCTCGCTCGACGGCGCGGCCAAGTTGCCCGCAGAACGACAAGGGCTTCTGCCCGTCA
AGCCGCCCGCCAGTTTCGACGGCAAGCGGACCGACAACGGGTATTTTCGAGTTCCAGACCTTCTGCGCGGCCTGCCATGGCG
ACAATGCCGAGGCCGGCGGCGTGTGCCCGACCTGCGCTGGTCCGGCGCGATCCGCCATCAGGACGCGTTCATATAACGTGG
TCGGCCGCGGCGCCCTGACGGCATAACGGCATGGATCGGTTTCGATGCCCTCGATGAAGCCGGAGCAGATCGAGGACATCCGGC
AATTCCTGATCAAGCGTTCACACGACCTACCAGAGGGAGGTTGATGCCCGGAAGAAGCTGGACGGCATACCCGCACAGT
GA

Figura 15. El gen *adhA* de la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*. En rojo se muestra la secuencia correspondiente al gen *adhA* de la cepa silvestre, interrumpido por la secuencia en negro. La C y la G de mayor tamaño marcadas en blanco indican los nucleótidos 468 y 469, entre los cuales se inserta la secuencia adicional desconocida.

La secuencia desconocida se insertó entre los nucleótido número 468 y 469 del gen *adhA* y tiene un tamaño de 1595 pb, lo que coincide perfectamente con el análisis electroforético, en donde observamos que el fragmento de la *adhA* amplificado por PCR en la cepa C6, tiene aproximadamente 1500 pb más que su equivalente en la cepa silvestre. Esta secuencia de inserción la llamamos IS*GadiC6*.

Al analizar la secuencia con los programas mencionados, los resultados nos mostraron un 100% de identidad con una transposasa de la familia IS110 en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* (No. de acceso GenBank [AM889285.1](#), proyecto Núcleo de Secuenciamiento Johanna Döbereiner; No. de acceso GenBank [CP001189.1](#), proyecto DOE Joint Genome Institute) y en el plásmido

pGDIPal5II de la misma bacteria (No. de acceso GenBank [AM889286.1](#)) (Figura 16). Es decir, la IS*Gad/C6*, que interrumpe al gen *adhA*, se encuentra en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus*, aunque a la fecha, no se había reportado que estuviera interrumpiendo ningún gen específico causando una mutación.

La secuencia insertada tiene también un 76% de identidad con la IS110 de *Mesorhizobium loti* (No. de acceso GenBank [BA000012.4](#)), una α -proteobacteria fijadora de nitrógeno.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP001189.1	Gluconacetobacter diazotrophicus fAl 5, complete genome	2931	1.759e+04	100%	0.0	99%
AM889286.1	Gluconacetobacter diazotrophicus fAl 5 plasmid pGDIPal5II, cc	2931	2931	100%	0.0	99%
AM889285.1	Gluconacetobacter diazotrophicus fAl 5 complete genome	2926	1.335e+04	100%	0.0	100%
BA000012.4	Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	512	512	64%	3e-141	76%

Figura 16. Resultados del Blast de la secuencia del gen *adhA* de la cepa C6

VII.III. La IS*GadiC6* de *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutante

C6

Como mencionamos en la introducción, en general las IS llevan la información de una única enzima llamada transposasa, la cual es codificada por uno o dos marcos de lectura abierto (ORF's). Estas secuencias presentan en general terminales invertidas en cada extremo, nombradas repetición invertida izquierda y derecha (IRL e IRR), que son de suma importancia en el reconocimiento, la transposición y unión de la transposasa para el corte y pegado en el fragmento.

Con ayuda del programa pDRAW32 pudimos localizar un ORF ([Figura 17](#)) en la secuencia de inserción IS*GadiC6*, con un tamaño de 669 pb que está en el sentido del gen; comienza con ATG y termina con TGA.

Existe poca información acerca de las IS de la familia IS110. La literatura menciona que esta familia no es muy homogénea. Está compuesta por 20 miembros, que presentan un tamaño de entre 1136 y 1558 pb. En las IS110 reportadas pueden o no estar presentes las secuencias invertidas repetidas (IR) ([24](#)), o como en el caso de *Streptomyces coelicolor* A3 (2), tienen IR imperfectas (10 a la izquierda y 15 a la derecha). En general en esta familia, no se generan blancos directos repetidos. El análisis de la IS*GadiC6* que interrumpe el gen *adhA*

en *Ga. diazotrophicus*, nos muestra la presencia de dos IR, con un tamaño de 9 pb.

```
TGCCAGCCGTAATCGGGCTGAGCGGTCGTCGTCGATTGGCGGTCTCCCGGGCCGGAAAGAAGGTA
GAGTTGCCGCGGTGAAACAGCAGCGCGGGAGGCGTGCGATGGAATTCTTTGCGGTCTCGATGTGT
CGATCGACGAAACGGCGGTCTGTGTGGTGGACGAGCAGGGCACCGTGCATCTGGAAACGACGGTG
GCCACGGACCCGGCTGCGCTCAGGGATGCCGTGAAGCCGTTCTGCCGCGCCTGCGCCGATGGGT
CACGAGGCAGGTTCCCTGTCGCCCTGGCTGCATCCGAGATGCTGGCGCTGGGCCTGCCGGCGGTC
TGCCTGGAGACGAAACACGTGCGGGCGGCGATGTCGGCGCAGCGCAACAAGACCGACAAGGCGG
ACGCGCTGGGGATCGCGCATATCGTGCACACCGGCTGGTTCGGACGGCCATATCAAGAGCGAAG
CAAGCTATCGGCTGCGTCTGATCCTGACCCAGCGCAGCACGCTCAAGCGCAAATTCATGGATCTCGA
GAATACGATCCGCCATTCGCTCAAGGCGTTCGGTATCCGCTGGGCACGGTCTCGCGGGCGCGCTC
GACACCGCCGTTGCGAGGCCGTGGCGCAGGACGCGCTGACCCGCGATCTCATGGAGGCGATGCT
GCGGGCGAAGCCGTGCTCTGGGAAGAATATACCCGGCTGCACAAGCTGGTGGTGGGATCGTCGC
GGGTGACGAGGTGTGCCGGCGGTTTCATGGCCATTCGGGGGTGGGGCCGGTGAACCGCGCTTGGCG
TGATGACGGCGATCGACGATCCGTCGCGCTCCGGCGCTCGCGCGACGTCGCGGCGTATTCGGCC
TGACGTCGCGGCGCTGCAGTCGGTACCAGCATCGATGTGCAGGGACGCATCAGCAAGGCCGGCG
ATCCGGAGGTGCGGCGGTCCCTCTATGAAGCGGCGTCGTCCTGCTGACGCGTTTCAAGGGGCGCGA
CAAGCTGCGGACCTGGGGCCTGGAAGTGGCGAAACGGTCTGCCATCGCAAGGCGGCGGTGCGCCG
TGGCGCGCAAGATGGCCGTGATCATGCATGCCATGTGGCTCGACGGAACGGTCTATGACGGCGGTC
CGGCCGTCGATCCCGAAGAGCGGGCCCGTCATATCGCTTGCAAGAACCGCAAATTGCCGCGGGCGC
TCGCGTGAGTGCCAGCTGCAAAGGAATGTTCCGCCGCGTGTGCGGGATGACCGCGGCGTTCTGAAC
AGGGAGATCCGCCAAGGCGGATGGGGAAGGGTGCAGTCGAGGACGACGGGAAGCACGATATCTT
GCCTGGAGCACGCGCAGGTGAACGCCTCGTGGGACTCCGCTCGAGTGCCTGTGATGCTGCCCGTG
AATCCGATGGCAAATGCGCCACGACGAAAGGCCGCGCCCATCCACGGATGGGGCGGCATATC
AGTCGTCGCTGAGCGCGAAGAGTGCACGGCGTGCCACGAACCCTCAGTCAGGGCCGAGATGCCA
GTCCAGGAGCAGAACTGTGATCGTGAAGGAAGCTAAAGGAAAACGAAGAATGAAAACTTGACC
AAAAAACCAGCCCGATTAAGAG
```

Figura 17. La IS*GadiC6*. En rojo se muestran las secuencias invertidas repetidas. Las flechas marcan el inicio y el final del ORF identificado.

El genoma completo de *Ga. diazotrophicus* ha sido obtenido por dos diferentes grupos. Uno de estos grupos forma parte del proyecto de secuenciación en el

Núcleo de Secuenciamiento Johanna Döbereiner, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Brasil; el segundo grupo obtuvo la secuencia como parte del proyecto estadounidense de secuenciación de genomas bacterianos en el DOE Joint Genome Institute, en colaboración con el Computational Biology and Bioinformatics Group of the Biosciences Division of Oak Ridge National Laboratory.

Dentro de este último proyecto, Miriam Land reporta en el 2008, 17 secuencias de inserción en el genoma de *Ga. diazotrophicus* y publica estas secuencias en una base de datos llamada IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>), donde las secuencias reportadas fueron obtenidas, ya sea a nivel bioinformático o por resultados experimentales. En esta base de datos encontramos varias BAA en las que se ha detectado la presencia de diversas IS's, siendo *Ga. diazotrophicus* la única en donde se presentan IS's de la familia IS110.

Entre las IS's reportadas por Land en *Ga. diazotrophicus*, están dos de la familia IS3, la IS407 y la IS51; tres de la familia IS630; dos de la familia IS481; una de la familia IS256; dos de la familia IS1182; una de la familia IS21 y una de la familia IS701. Ninguna de estas secuencias de inserción ha sido reportada en otras bacterias de la familia de BAA. Se encontraron también, tres IS1031 de la familia IS5 (presente en *Ga. xylinus*), y dos de la familia IS110, nombradas ISGdi7 (1,518

pb) e ISG*di*15 (1,602 pb). Específicamente las secuencias de la familia IS110, fueron detectadas por homologías de secuencias en bases de datos.

Las secuencias ISG*di*7 e ISG*di*15 reportadas en la base de datos IS Finder, fueron comparadas con la secuencia ISG*adi*C6, identificada por nosotros. Los resultados nos muestran que existe un 44% de identidad con la ISG*di*7 y un 100% de identidad con la ISG*di*15. Al comparar por medio de ClustalW2 estas últimas secuencias se observó que la ISG*di*15 es 7 nucleótidos mayor que la ISG*adi*C6 de la cepa C6, en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis electroforético y la secuenciación.

Un análisis en las dos secuencias reportadas del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* cepa silvestre mostró, que la ISG*adi*C6 se encuentran 4 veces representada en la secuencia obtenida por el Núcleo de Secuenciamiento Johanna Döbereiner y 6 veces en la secuencia de DOE Joint Genome Institute. Como se esperaba, ninguna de estas secuencias se encuentra interrumpiendo el gen de *adhA*, como ocurre en la mutante C6.

Tratamos de definir si la ISG*adi*C6 interrumpía algún otro gen que codificara para una proteína conocida en la cepa silvestre. Determinamos, que río arriba de cada una de las copias de ISG*adi*C6 encontradas en la cepa silvestre, tenemos genes de tamaños variados, entre 240 y 675 pb, de los cuales algunos codifican para

transglicolasas; río abajo, encontramos genes que codifican para proteínas hipotéticas de mayor tamaño (1740pb-1757pb), con una similitud entre 57 al 90% entre ellos; en ningún caso encontramos que la IS estuviera interrumpiendo otro gen que codificara para proteínas con alguna función conocida.

Para corroborar la presencia y distribución de la secuencia de inserción IS*GadiC6*, tanto en la cepa silvestre como en la mutante C6, se hizo el análisis por medio de un Southern blot utilizando como sonda un fragmento amplificado de esta secuencia.

Para obtener este fragmento se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

- Fln110 5'- GCCGACAAGGGATGCTG - 3' T_m= 48.5°C
- Rln110 5'- GGTGTAGGAACGCTGGTG - 3' T_m= 52.6°C

Utilizando como templado DNA cromosomal de la mutante C6 se obtuvo un amplificado de 1,772 pb ([Figura 18](#)).

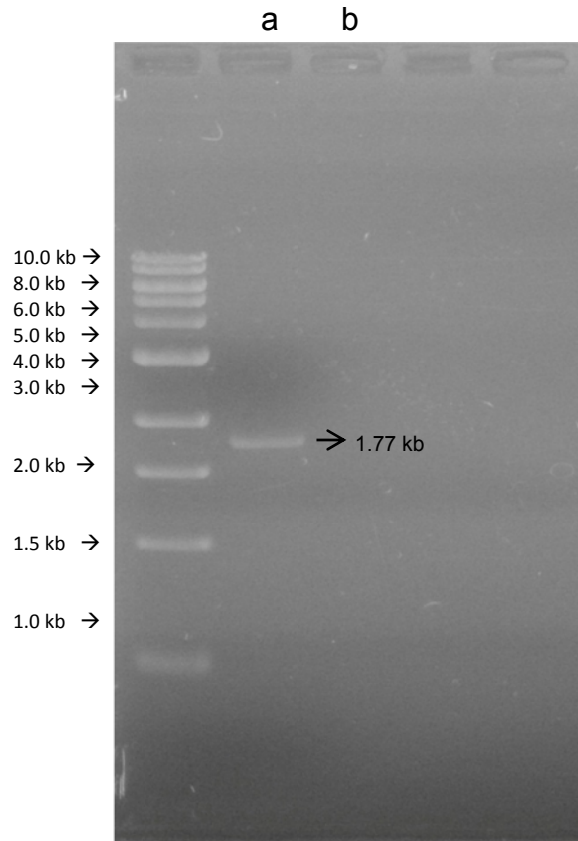
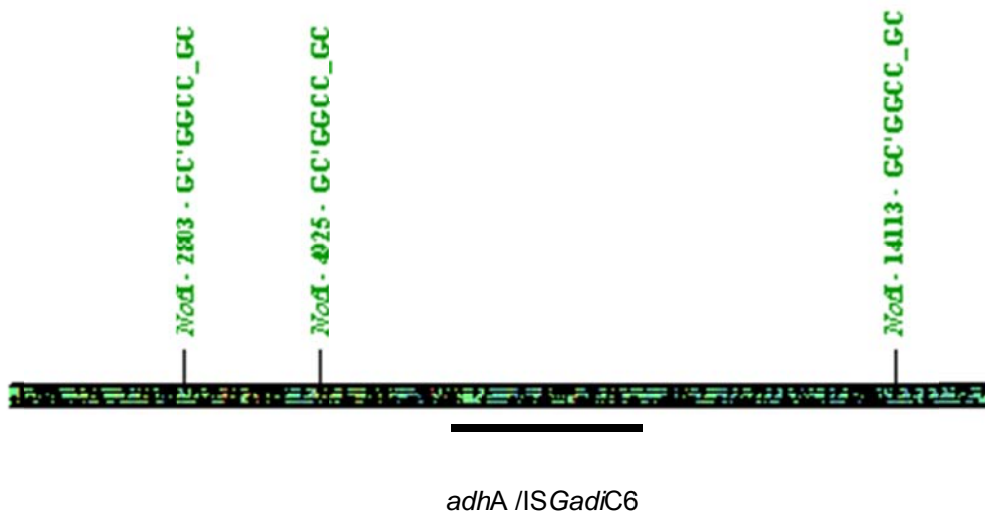


Figura 18. Análisis electroforético del fragmento obtenido de la amplificación de la secuencia de inserción IS*GadiC6* en *Ga. diazotrophicus* C6. El carril (a) corresponde al estándar, el carril (b) al amplificado de la secuencia de inserción de 1772 pb.

Este fragmento amplificado fue utilizado como sonda en el Southern blot, donde se compara la distribución de la IS*GadiC6* en ambas cepas. Se determinaron los perfiles de restricción con una mezcla de *Bam*HI-*Hind*III-*Not*I, desde 7000 pb río arriba hasta 4800 pb río abajo del gen *adhA* y de la IS*GadiC6*. De acuerdo al perfil de restricción las enzimas no cortan en ninguna de las dos secuencias (Figura 19).



15635 bp



de Ga.
BamHI,

El ensayo se realizó usando DNA genómico de *Ga. diazotrophicus* cepa silvestre y de la mutante C6. Los resultados nos muestran el mismo patrón en ambas cepas, (Figura 20), observándose 4 bandas fuertes y bien definidas, de acuerdo con lo esperado al análisis en la secuencia genómica reportada por Nucleo de Secuenciamento Johanna Döbereiner.

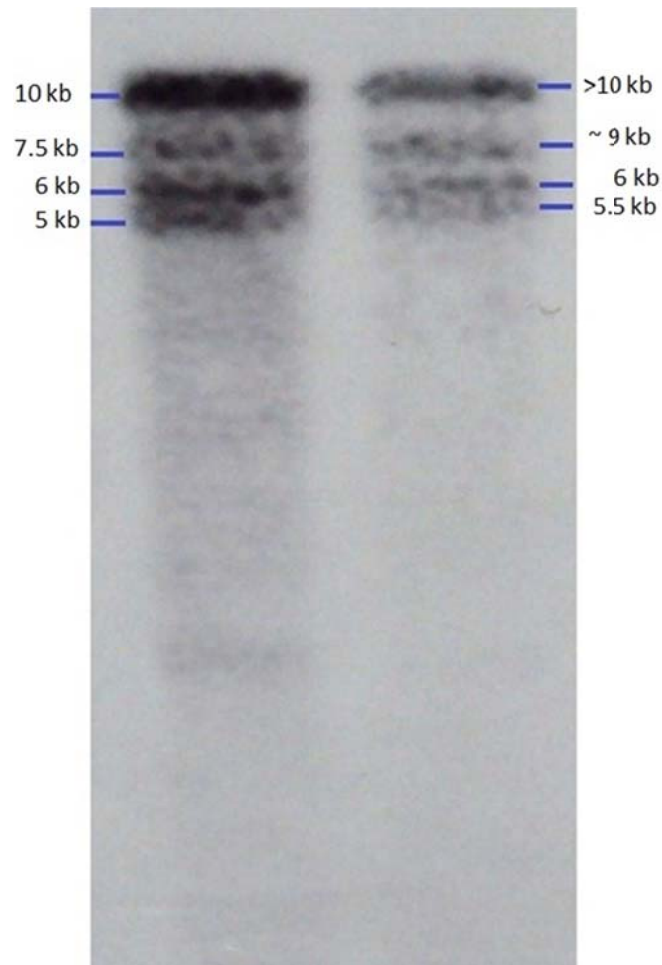


Figura 20. Southern blot usando como sonda un fragmento amplificado por PCR de la IS*GadiC6*. Los DNA cromosomales de las cepas silvestre y C6 fueron digeridos con *Bam*HI-*Hind*III-*Not*I.

Para corroborar la presencia de la IS*GadiC6* interrumpiendo el gen *adhA*, se realizó otro Southern blot, pero esta vez usando como sonda el gen de *adhA*.

De acuerdo al perfil de restricción obtenido cortando con una mezcla de las enzimas *Bam*HI, *Hind*III y *Not*I, la parte del genoma de *Ga. diazotrophicus* que

abarca el gen *adhA*, se debería observar una banda con un tamaño aproximado de 7 593 pb para la cepa silvestre y de 9 093 pb para la mutante C6 (Figura 21).



Figura 21. Esquema del perfil de restricción obtenido al digerir un fragmento de 14040 pb conteniendo el gen *adhA* con las enzimas de restricción *Bam*HI-*Hind*III-*Not*I. *Bam*HI y *Hind*III cortan por fuera del fragmento analizado.

Los resultados nos mostraron bandas del tamaño esperado, encontrando un aumento de aproximadamente 1500 pb en la banda correspondiente al gen *adhA* de la mutante C6 (Figura 22).

Con los resultados anteriores podemos estar seguros que la falta de actividad de PQQ-ADH se debe a la interrupción por la integración de la secuencia de inserción

IS*Gad*C6, en el gen *adhA* que codifica para la subunidad catalítica de la enzima en *Ga. diazotrophicus* C6.

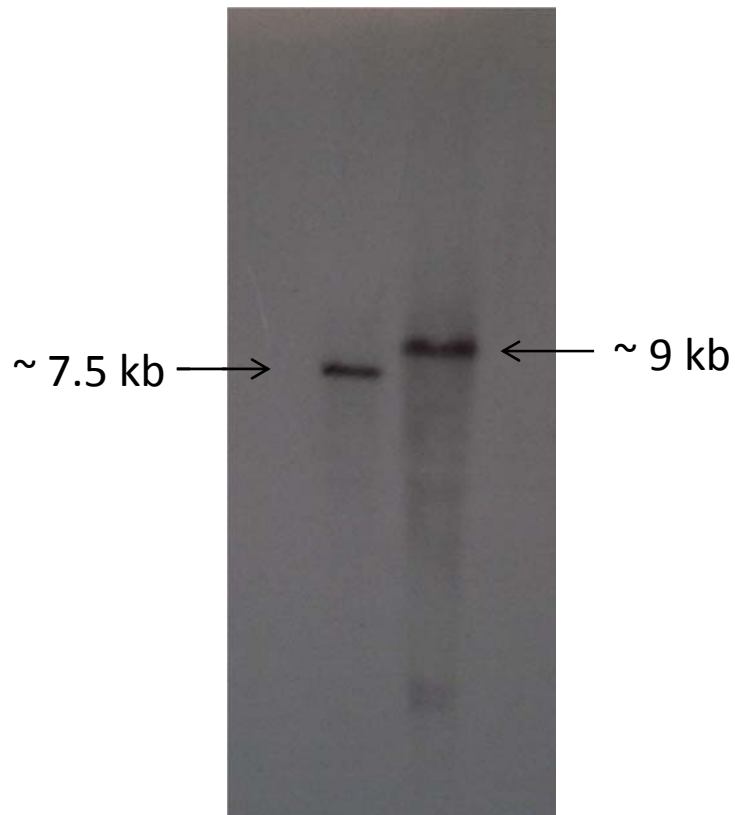


Figura 22. Southern blot usando como sonda un fragmento amplificado por PCR conteniendo el gen *adhA*. Los DNA cromosomales de las cepas silvestre y C6 fueron digeridos con *Bam*HI-*Hind*III-*Not*I.

VII.IV Las secuencias de Inserción de la Familia IS110

Las IS de la familia 110 pueden encontrarse en bacterias muy diversas (IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>)). Se ha detectado tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, aunque es más común en las primeras. En general se ha detectado en bacterias patógenas (hay una gran cantidad de copias en el género *Pseudomonas*), en bacterias simbiotes y en fijadoras de nitrógeno (como el género *Rhizobium*).

Ga. diazotrophicus es una bacteria que pertenece a la familia de BAA, pero también es simbiote fijadora de nitrógeno. En la [tabla 6](#), podemos observar que en la familia BAA es más frecuente encontrar IS's de la familia IS5, aunque como mencionamos en la introducción, también se han detectado IS's de las familias IS4 e IS1380.

Por otro lado, es importante recalcar que no es raro encontrar IS's de la familia IS110, como la IS aquí reportada, en bacterias simbiotes ó fijadoras de nitrógeno.

El análisis en las bases de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de las IS encontradas en bacterias fijadoras de nitrógeno, nos permitió determinar que

existe un porcentaje alto de identidad entre las diferentes IS's de la familia IS110 reportadas en bacterias fijadoras de nitrógeno y la IS*Gad/C6* reportada en este trabajo (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución entre bacterias fijadoras de nitrógeno, del suelo y algunas patógenas, de las IS encontradas en la familia de BAA (IS Finder, <http://www-is.biotoul.fr/is.html>)

GÉNERO	FAMILIAS DE IS FRECUENTES EN BAA					CARACTERÍSTICAS
	4	5	1380	110	Total	
Gram-						
Proteobacteria						
α-proteobacteria						
						BAA
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	0	3	0	2	5	Bacteria ácido acética, simbiote de caña de azucar y otras plantas Fijadora de nitrógeno
<i>Acetobacter</i>	1	0	2	0	3	Productora de ácido acético.
<i>Gluconobacter</i>	0	1	0	0	1	Productora de ácido acético.

<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	0	5	2	0	7	Productora de celulosa.
						Otras
<i>Agrobacterium</i>	0	4	0	2	6	Patógeno de plantas.
<i>Sphingomonas</i>	0	1	2	1	4	Bacteria del Suelo y agua. Patógena para humanos.
						Fijadores de nitrógeno.
<i>Bradyrhizobium</i>	0	3	1	1	5	Bacteria del Suelo. Simbiontes con plantas de especies leguminosas.
<i>Rhizobium</i>	2	11	1	3	17	Bacteria del Suelo. Viven en simbiosis con determinadas plantas en su raíz.
<i>Mesorhizobium</i>	0	0	1	3	4	Simbionte , formador de nódulos.
<i>Sinorhizobium</i>	1	5	0	1	7	Simbionte de leguminosas.
<i>Azospirillum</i>	0	12	2	5	19	Bacteria del suelo asociada con raíces de planta, tiene un alto uso en la agricultura.
<i>γ-proteobacteria</i>						
						Fijadores de nitrógeno.
						Bacteria de suelo. Presente también en agua

<i>Azotobacter</i>	3	0	0	4	7	y en asociación a plantas.
						Patógenos
<i>Pseudomonas</i>	6	28	1	17	52	Es común la presencia de plásmidos. En la rizósfera . Patógena en plantas o mamíferos, aunque hay especies inocuas.
<i>β-proteobacteria</i>						
<i>Burkholderia</i>	1	21	0	9	31	Bacteria de suelo. Patógena de plantas y animales. Una especie fija nitrógeno
						Fijadores de nitrógeno
<i>Azoarcus</i>	1	10	1	2	14	Bacterias del suelo, frecuentemente se encuentran en ambientes anóxicos contaminados con compuestos aromáticos.
Gram +						
Firmicutes						
<i>Bacillus</i>	38	1	3	4	46	Bacteria del suelo. Algunos patógenos y contaminantes de alimentos
Actinobacteria						

						Patógeno de plantas
<i>Streptomyces</i>	1	9	22	6	38	Se encuentran predominantemente en suelos y en la vegetación descompuesta.

Tabla 7. Comparación de la IS*GadI*C6 con las IS 110 de bacterias fijadoras de nitrógeno reportadas en la base de datos IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>). Para el análisis se utilizó discontinuous megablast.

Bacteria	Cepa	Nombre IS(s)	Tamaño (pb)	Identidad
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	ATCC 49037	IS <i>GadI</i> C6 (este trabajo)	1,595	100%
<i>Mesorhizobium loti</i>	MAFF 303099	IS 110 (GenBank BA000012.4)	1,146	73%
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	WSM2075	IS 110 (GenBank: CP002279.1)	1,032	73%
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Py2	IS 110 (GenBank: CP000781.1)	1,089	73%

VIII. Discusión

La familia de las BAA se caracteriza por su gran inestabilidad genética. Es posible observar un patrón de distribución de secuencias de inserción (IS's) en estas bacterias, afectando diversos procesos. Entre estos procesos, en la fermentación oxidativa se han reportado mutantes en la PQQ-alcohol deshidrogenasa membranal (PQQ-ADH⁻), por inserción de IS's en los genes que codifican para las subunidades de esta proteína. Dependiendo del género, la PQQ-ADH puede presentar dos o tres subunidades y los reportes muestran que las IS se han insertado en los genes que codifican para la subunidad III (**IS1452**, *A. pasteurianus*; 18); para la subunidad II (**IS1380**, *Ga. xylinus* y *A. pasteurianus*; 4; 33) o entre los genes que codifican para la subunidad II y la subunidad I (**IS12528**, *G. oxydans*, *G. cerinus*, *A. pasteurianus* sp, y *G. suboxydans* IFO3254, IFO3255, IFO3257 e IFO3258; 17) (Figura 24).

De acuerdo con esta característica, en el 2009 al ser liberada la secuencia del genoma de *Ga. diazotrophicus*, se detectaron un gran número de elementos móviles transponibles (245), más que en cualquier otra bacteria endófito (3).

Para determinar la importancia de la PQQ-ADH, en la fijación de nitrógeno y la oxidación de alcoholes en *Ga. diazotrophicus*, obtuvimos mutantes espontáneos de la vía de oxidación de estos compuestos. La utilización de alcohol alílico como factor de selección para aquellas células donde la alcohol deshidrogenasa no es

funcional, ha sido reportada anteriormente (22) y de acuerdo a ello, seleccionamos a una mutante PQQ-ADH⁻ (mutante C6), por crecer en presencia de este alcohol.

Estudios previos en el laboratorio mostraron que en *Ga. diazotrophicus* mutante C6, la PQQ-ADH es inactiva porque no está ensamblada adecuadamente en la membrana (1). A pesar de ello, la mutante es capaz de crecer fijando nitrógeno. Para explicar el porque de esta falla estructural, decidimos buscar la causa de la mutación en esta enzima de la cepa mutante, haciendo una caracterización genómica y enfocando nuestra atención en determinar si existía una inserción de DNA ajeno dentro de los genes que forman el operón que codifica para la PQQ-ADH. Esperabamos encontrar alguna de las secuencias que habían sido detectadas en otras bacterias de la misma familia.

El análisis electroforético y la secuenciación de fragmentos amplificados por PCR de los genes que forman parte del operon *adhAB* en *Ga. diazotrophicus* mutante C6, nos mostró que el gen *adhA*, que codifica para la subunidad catalítica de la enzima, efectivamente presentaba un aumento de 1.5 Kb en relación a la cepa silvestre, mientras que el gen *adhB* no estaba afectado.

El análisis de la secuencia del DNA adicional que interrumpe el gen *adhA* indicó, para nuestra sorpresa, que la IS insertada no pertenecía a ninguna de las familias de IS's que fueron reportadas anteriormente en BAA, sino se trataba de una

secuencia de inserción de la familia IS110; a esta IS la llamamos IS*Gad*C6. De acuerdo al análisis en la base de datos IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>), *Ga. diazotrophicus* es la única bacteria de la BAA en donde se presentan IS's de la familia IS110. De acuerdo a esta base de datos, se han detectado por homología de secuencias dos secuencias de esta familia en la cepa silvestre; una de ellas, la IS*Gdi*15, tiene un 100% de identidad con la IS*Gad*C6 identificada en este trabajo.

La presencia y distribución de la secuencia de inserción IS*Gad*C6 en *Ga. diazotrophicus* fue corroborada por medio de un Southern blot, comparando la cepa silvestre con la mutante C6. Los resultados nos indican que en ambas cepas se encuentra presente, mostrando cuatro bandas bien definidas que hibridizan con la IS*Gad*C6 amplificada por PCR y usada como sonda. La presencia de 4 bandas (4 copias) de esta IS esta de acuerdo con los resultados obtenidos al realizar el análisis por Blast, en la secuencia genómica de *Ga. diazotrophicus* reportada por el proyecto de secuenciación en el Núcleo de Secuenciamiento Johanna Döbereiner, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Entonces, una de estas copias de la IS*Gad*C6 se "movió" hacia el gen *adhA*, insertándose en él, por lo que interrumpe su secuencia y causa la mutación que provoca la falta de integración de la subunidad I de la enzima en la membrana en la mutante C6. Este hecho fue corroborado por medio de Southern blot utilizando un amplificado del gen *adhA* como sonda.

Por tanto, la falta de actividad de PQQ-ADH en la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*, se debe a la interrupción del gen *adhA* que codifica para la subunidad catalítica de la PQQ-ADH, por la integración de la IS*GdiC6*.

Este es el primer reporte en el que se identifica a una IS de familia IS110 interrumpiendo un gen estructural en una bacteria de la familia de BAA; además, la IS*GdiC6* aquí descrita es la primera secuencia de inserción detectada en el gen que codifica para la subunidad catalítica de la PQQ-ADH en esta familia de bacterias (Figura 23).

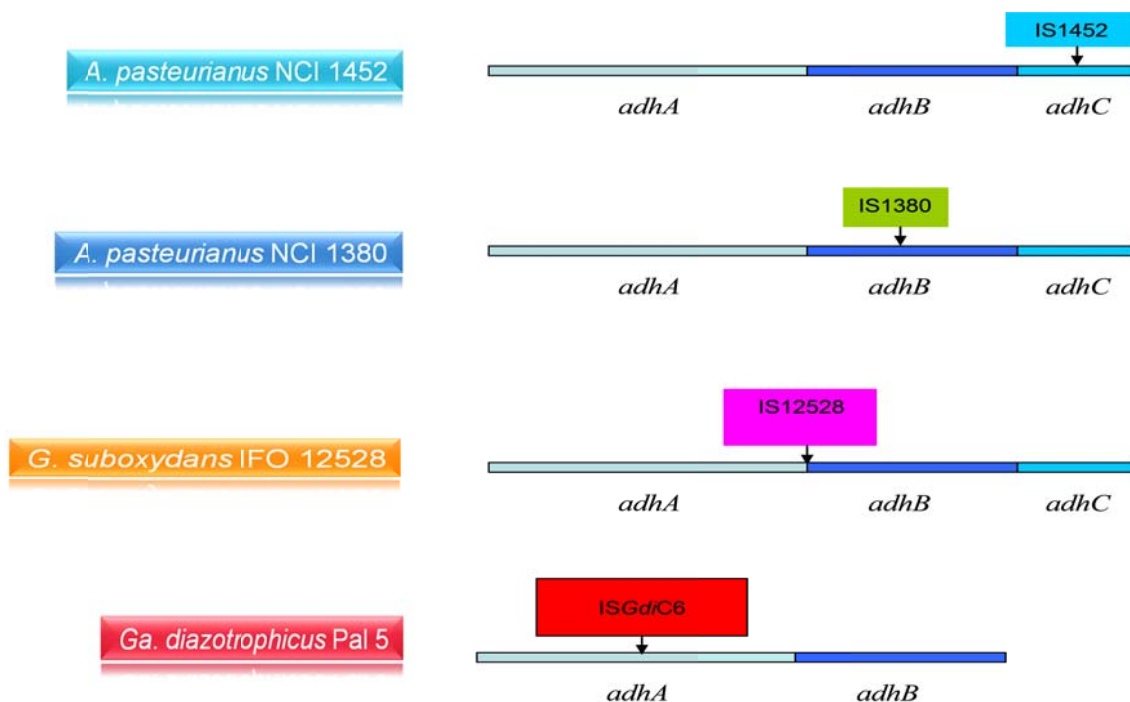


Figura 23. Secuencias de inserción que interrumpen el operon *adh* en diferentes especies de BAA.

La presencia de secuencias de inserción de la familia IS110 es frecuente entre fijadores de nitrógeno y bacterias simbióticas de plantas, como *Ga. diazotrophicus*. El tener estas características en común, podría favorecer la transferencia horizontal de IS's de esta familia entre estas bacterias y explicaría porque no se encuentran en otros miembros de la familia de BAA, que no son simbioses ni fijadores de nitrógeno.

IX. Conclusiones

- El análisis del tamaño de los genes del operón *adh* mostró que el gen *adhB*, que codifica para la subunidad II de la PQQ-ADH de la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*, no muestra una diferencia en su tamaño en relación a lo observado en la cepa silvestre.
- El análisis del tamaño de los genes del operón *adh* mostró que el gen *adhA* que codifica para la subunidad I (catalítica), de la PQQ-ADH de la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*, presenta un aumento en su tamaño de 1500 pb, en relación al mismo gen en la cepa silvestre. A esta IS la llamamos IS*Gad*C6.
- La presencia de la IS*Gad*C6 en el gen *adhA* de la mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*, fue corroborado por Southern blot, usando como sonda un amplificado de este gen.
- De acuerdo al análisis por Blast, la secuencia de inserción detectada pertenece a la familia IS110. Determinamos que tiene un 100% de identidad con la IS*Gdi*15, una secuencia de inserción de la misma familia detectada por homología de secuencias al analizar el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* en el proyecto DOE Joint Genome Institute.
- De acuerdo al análisis por Blast y a los resultados del Southern blot usando como sonda la IS*Gad*C6, existen 4 copias de esta IS en el genoma de *Ga.*

diazotrophicus, tanto en la cepa silvestre como en la mutante C6. De acuerdo al análisis utilizando las bases de datos, solo el gen *adhA* es interrumpido por una de dichas secuencias en la mutante C6.

- Este es el primer reporte en el que se detecta una IS de familia IS110 interrumpiendo un gen estructural en una bacteria de la familia de BAA; además, la IS*Gad/C6* aquí descrita es la primera secuencia de inserción detectada en el gen que codifica para la subunidad catalítica de la PQQ-ADH en esta familia de bacterias.
- Proponemos que la presencia de la IS*Gad/C6* interrumpiendo el gen *adhA*, es la razón por la que esta subunidad no se ensambla en la membrana bacteriana y por tanto, se observa la falta de actividad enzimática.
- La presencia de secuencias de inserción de la familia IS110 es frecuente entre fijadores de nitrógeno y bacterias simbióticas de plantas, como *Ga. diazotrophicus*. Esta característica podría favorecer la transferencia horizontal de secuencias de inserción entre estas bacterias y explicaría porque, a pesar de no encontrarse en otras bacterias de la familia de BAA, secuencias de esta familia se localizan en *Ga. diazotrophicus*.

X. Bibliografía

- [1] Antúnez Argüelles, E. (2007). "Función y biogénesis de la pirroloquinolina-quinona alcohol-deshidrogenasa (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Caracterización de una mutante PQQ-ADH." Facultad de Ciencias, UNAM. *Tesis de Licenciatura*.
- [2] Berg, D. E., & Howe, M. M. (1989). *Mobile DNA*. Washington, D.C. : American Society for Microbiology .
- [3] Bertalan, Marcelo; Albano, Rodolpho; de Pádua, Vânia; Rouws, Luc; Rojas, Cristian ; Hemerly, Adriana; Teixeira, Kátia; Schwab, Stefan; Araujo, Jean; Oliveira, André; França, Leonardo; Magalhães, Viviane; Alquéres, Sylvia; Cardoso, Alexander; Almeida, Wellington; Martins Loureiro, Marcio; Nogueira, Eduardo; Cidade, Daniela; Oliveira, Denise; Simão, Tatiana; Macedo, Jacyara; Valadão, Ana; Dreschsel, Marcela; Freitas, Flávia; Vidal, Marcia; Guedes, Helma; Rodrigues, Elisete; Meneses, Carlos; Brioso, Paulo; Pozzer, Luciana; Figueiredo, Daniel; Montano, Helena; Junior, Jadier; de Souza Filho, Gonçalo; Quintana Flores, Victor Martin; Ferreira, Beatriz; Branco, Alan; Gonzalez, Paula; Guillobel, Heloisa; Lemos, Melissa; Seibel, Luiz; Macedo, José; Alves Ferreira, Marcio; Sachetto Martins, Gilberto; Coelho, Ana; Santos, Eidy; Amaral, Gilda; Neves, Anna; Beatriz Pacheco, Ana; Carvalho, Daniela; Lery, Letícia; Bisch, Paulo; C Rössle, Shaila; Ürményi, Turán; Rael Pereira, Alessandra; Silva, Rosane; Rondinelli, Edson; von Krüger, Wanda; Martins, Orlando; Ivo Baldani, José; CG Ferreira, Paulo. (2009). Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10:450.
- [4] Coucheron, D. (1991). An *Acetobacter xylinum* Insertion Sequence Elements Associated with Inactivation of Cellulose Production. *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, No. 18: 5723-5731.
- [5] Escamilla, J., Contreras, M., & Flores-Encarnación. (1999). Los sistemas respiratorios bacterianos. *Mensaje bioquímico*, XXIII: 67-103.
- [6] Flores Encarnación, M., Contreras Zentella, M., Soto Urzua, L., Aguilar, G. R., Baca, B. E., & Escamilla, J. E. (1999). The Respiratory System and Diazotrophic Activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *Journal of Bacteriology*, 6987-6995.

- [7] Flores Encarnación, M., Sánchez Cuevas, M., & Ortiz Gutiérrez, F. (2004). Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 46, Núms. 1-2 January - March. 2004 April - June. 47 - 59.
- [8] Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., y otros. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 361-354.
- [9] Gómez Manzo, S. (Octubre 2007). "Papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol en *Gluconacetobacter diazotrophicus* pal5" Instituto de Fisiología Celular, UNAM. *Tesis de Doctorado*.
- [10] Gómez Manzo, S., Arreguín Espinosa, R., Contreras Zentella, M., & Escamilla Marván, E. (2005). Las Quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(1):28-37.
- [11] Gómez Manzo, S., Contreras Zentella, M., González Valdez, A., Sosa Torres, M., Arreguín Espinoza, R., & Escamilla Marván, E. (2008). The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 71–78.
- [12] Gómez Manzo, S., Solano Peralta, A., Saucedo Vázquez, J. P., Escamilla Marván, J. E., Kroneck, P. M., & Sosa Torres, M. E. (2010). The Membrane-Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*, 49 (11), pp 2409–2415.
- [13] González, B., Martínez, S., Chávez, J., Lee, S., Castro, N., Domínguez, M., y otros. (2006). Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome bb and cyanide-resistant cytochrome ba quinol oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1614-1622.
- [14] Greenberg, D., Porcella, S., Stock, F., Wong, A., Conville, P., Murray, P., y otros. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2609–2616.
- [15] Hanmoungjai, W., Chukeatirote, E., Pathom-aree, W., Yamada, Y., & Lumyoung, S. (2007). Identification of Acidotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Thailand Sources. *Research Journal of Microbiology*, 194-197.

- [16] Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S., & Fudou, R. (2004). *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2263–2267.
- [17] Kondo, K., & Horinouchi, S. (1997). Characterization of an Insertion Sequence, IS12528, from *Gluconobacter suboxydans*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 3: 1139-1142.
- [18] Kondo, K., & Horinouchi, S. (1997). A new insertion sequence IS1452 from *Acetobacter pasteurianus*. *Microbiology*, 143: 539-546.
- [19] Lery, L., Coelho, A., von Kruger, W., Gonçalves, M., Santos, M., Valente, R., y otros. (2008). Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics*, 1631-1644.
- [20] Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., y otros. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 813–818.
- [21] Loganathan, P., & Nair, S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1185–1190.
- [22] Lorowitz, W., & Clark, D. (1982). *Escherichia coli* Mutants with a Temperature-Sensitive Alcohol Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, Nov, p. 935-938.
- [23] Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson Educación, S. A.
- [24] Mahillon, J., & Chandler, M. (1998). Insertion Sequences. *Microbiology and Molecular Biology*, Vol. 62, No. 3, p. 725-774.
- [25] Muñoz Rojas, J., & Caballero Mellado, J. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. *Programa de ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno.*, 1-19.
- [26] Nelson, D. L., Cox, M. M., & Cuchillo, C. M. (2005). *Lehninger Principios de Bioquímica, cuarta edición*. Barcelona: Ediciones Omega.

- [27] Pan, B., & Vessey, J. K. (2001). Response of the Endophytic Diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on Solid Media to Changes in Atmospheric Partial O₂ Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 4694-4700.
- [28] Pedraza, R. O. (2008). Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 25-35.
- [29] Raspor, P., & Goranovic, D. (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Informa healthcare*, 101-124.
- [30] Saravanan, V., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M., & Sa, T. (2008). Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology*, 130-140.
- [31] Sherratt, D. J. (1995). *Mobile Genetic Elements*. Oxford, UK: Frontiers in molecular biology.
- [32] Soto Urzúa, L., & E. Baca, B. (2001). Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43:37-49.
- [33] Takemura, H., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1991). Novel Insertion Sequence IS1380 from *Acetobacter pasteurianus* Is Involved in Loss of Ethanol-Oxidizing Ability. *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, No 22: 7070-7076.
- [34] Velázquez Hernández, M., Baizabal Aguirre, V., Bravo Patiño, A., Cajero Juárez, M., & Valdez Alarcón, J. (2010). Efecto de la Mutación del Gen que codifica para la levansacarasa (LSDA) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la colonización de la caña de azúcar. *Ciencia Nicolaita*, 1-12.
- [35] Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International journal of Food Microbiology*, 15-24.
- [36] Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., y otros. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 823–829.
- [37] Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., y otros. (2006). Phylogenetic relationships between the genera *Swaminathania* and *Asaia*, with reference to the genera *Kozakia* and

Neoasaia, based on 16S rDNA, 16S-23S rDNA ITS and 23S rDNA sequences. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52, 289–294.