



00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

12

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

295451

IDENTIFICACION DE GENES DE *Azotobacter vinelandii* CUYA
TRANSCRIPCION AUMENTA BAJO CONDICIONES DE
ENQUISTAMIENTO.
CARACTERIZACION DEL GENE *aldA*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A
BIOL. MA. DEL SOCORRO GAMA CASTRO

TUTORA: DRA. GUADALUPE ESPIN OCAMPO

Cuernavaca, Mor.

Junio del 2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. GUADALUPE ESPIN OCAMPO.

DEDICATORIA

A mi familia:

Mi esposo, Mis papás, Mis hermanos y Mis sobrinos.

Con infinito Amor.

Gracias, por hacer tan agradable mi estancia en este mundo.

Gracias, porque sé que puedo contar incondicionalmente con cada uno de ustedes.

A mis amigos

Gracias, por estar pendientes de mí, en tiempos difíciles.

Gracias, por celebrar conmigo, en tiempos de alegría.

(Principalmente el año pasado)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guadalupe Espín, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y compartir conmigo su experiencia y conocimiento. Por ser excelente tutora y, sobre todo, por ser excelente persona.

A mi comité tutorial: Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. José Luis Puente y Dr. Enrique Merino. Por las valiosas aportaciones al presente trabajo.

Al jurado revisor de esta tesis: Dra. Guadalupe Espín, Dr. Edmundo Calva, Dr. Miguel Lara, Dr. Ricardo Grande y Dr. Guillermo Gosset, por el tiempo que se dieron para mejorar la presentación de este trabajo.

A la Biol. Soledad Moreno y a la M. en C. Josefina Guzmán por su valiosa colaboración en este trabajo.

Al Dr. Daniel Segura y a la Dra. Cinthia Nuñez por sus aportaciones durante la realización del proyecto. Muy en especial al Dr. Miguel Castañeda por impulsarme a iniciar esta maestría.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio, tanto del grupo de la Dra. Espín, como de la Dra. Soberón. Por el ambiente de trabajo tan agradable, generado por todos.

Al Dr. Julio Collado-Vides, por el apoyo brindada para la escritura de esta tesis. A los integrantes de su grupo, por impulsarme a obtener el presente grado.

A los investigadores que han formado parte importante en mi formación académica: M.V.Z. Rafael Falcón, Dr. Patricio Gariglio, Dra. Verónica Valverde, Dr. Alejandro Alagón, Dra. Rosana Sánchez, Dra. Guadalupe Espín y Dr. Julio Collado-Vides.

Al CONACYT por la beca que me otorgó.

A la UNAM

Y finalmente..... a DIOS.

INDICE

I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	2
Características de <i>A. vinelandii</i>	2
Polímeros producidos por <i>A. vinelandii</i> : Alginato y PHB.....	3
Fisiología y bioquímica del proceso de enquistamiento	9
Genética molecular del enquistamiento	10
Propiedades del quiste	10
Inducción del enquistamiento	11
Vía de degradación del butanol, un inductor del enquistamiento	12
Aldehído deshidrogenasas	14
III OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos particulares	17
IV MATERIAL Y METODOS	18
Cepas bacterianas y plásmidos	18
Medios y condiciones de cultivo	19
Mutagénesis, selección y aislamiento de mutantes	19
Transferencia de mutaciones	20
Ensayos de enquistamiento	20
Manipulaciones de ADN	21
Construcción del plásmido pSG9	21
Determinación de la actividad de aldehído deshidrogenasa	21
Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa	22
Análisis de secuencias	22
V RESULTADOS	23
Identificación de genes inducidos por butanol	23
Identificación de cepas que no se enquistan	24
Las mutantes que no se enquistan contienen el transposón <i>miniTn5lacZ</i>	25
Transferencia de mutaciones de las cepas SG2, SG9, SG21, SG23, SG27, SG36, SG49 y SG61 a la cepa ATCC9046.....	26
Clonación y secuenciación del gene interrumpido en la mutante SG9	27
La mutante SG36 también tiene interrumpido el gene <i>aldA</i>	31
La mutante SG9 no puede utilizar butanol como fuente de carbono	32
Crecimiento de la mutante SG9 en medio de cultivo con butirato	34
Ensayo de enquistamiento de la mutante SG9A inducido con hidroxibutirato	35

Actividad de aldehído deshidrogenasa	36
VI DISCUSION	38
VII CONCLUSIONES	41
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42

I. RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria de vida libre, la cual bajo condiciones ambientales adversas forma quistes resistentes a la desecación. En el laboratorio, la formación de estos quistes puede inducirse con butanol y con un producto de su degradación, β -hidroxibutirato (BHB). Se ha sugerido que este último es la señal para el inicio del proceso de enquistamiento, ya que es un metabolito normal de *A. vinelandii*, acumulado justo antes de iniciarse el enquistamiento.

En el presente, trabajo mediante una mutagénesis al azar con el transposón *miniTn5lacZ*, se identificaron 62 mutantes, las cuales contienen genes cuya expresión aumenta bajo condiciones de inducción del enquistamiento. De las 62 mutantes, en cinco de ellas el enquistamiento es disminuido, cuando es inducido con butanol, y en dos de ellas es completamente abatido.

Una de estas últimas mutantes (SG9A) contiene interrumpido el gene *aldA*, que codifica para una aldehído deshidrogenasa. Este gene es esencial para la formación de quistes cuando el enquistamiento se induce con butanol, ya que la aldehído deshidrogenasa participa en la vía de degradación de este alcohol, mediante la conversión de butanol a butiraldehído.

La actividad de *AldA* parece participar en el catabolismo de varios alcoholes, ya que la mutante SG9A no crece en medios de cultivo con butanol, etanol o hexanol como fuentes de carbono, además de que se encontró, mediante ensayos de actividad enzimática, que en esta mutante las actividades de acetaldehído como de butiraldehído deshidrogenasa están muy reducidas.

En este trabajo, se apoya la hipótesis que ha existido desde hace algunos años, que dice que la señal que induce el enquistamiento es el BHB, ya que la cepa SG9A, que contiene interrumpido el gene *aldA*, es capaz de enquistarse si se utiliza BHB como inductor.

II. INTRODUCCION

Una característica sobresaliente de las bacterias, es su rápido crecimiento cuando tienen nutrientes disponibles y condiciones apropiadas. Aunque quizá es aún más sobresaliente su habilidad para mantenerse viables bajo condiciones inapropiadas de crecimiento. Pues es muy frecuente que las bacterias se enfrenten a condiciones medioambientales adversas, como limitación de nutrientes, cambios de pH, estrés térmico y estrés oxidativo, entre otros. Por esto, algunas bacterias han desarrollado mecanismos altamente sofisticados, que les permite mantener su viabilidad bajo estas condiciones y así asegurar su sobrevivencia: tal es el caso de la formación de esporas en los miembros de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Mixococcus* (Piggot et al 1994.) y quistes en los miembros del género *Azotobacter* (Sadoff, 1975).

La esporulación y enquistamiento son fenómenos morfológicos de diferenciación celular muy similares, en donde la célula modifica su estructura para resistir condiciones adversas. Ambos han sido motivo de estudio para entender el proceso de diferenciación celular general, pues resultan ser un modelo relativamente simple.

El proceso de enquistamiento se ha estudiado principalmente en la bacteria *Azotobacter vinelandii*, un miembro del género *Azotobacter*. Esta bacteria, debido a su importancia industrial ha estado sujeta, desde hace ya varios años, a diferentes estudios, entre ellos el enquistamiento.

Características de *A. vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram negativa de vida libre, aeróbica estricta y capaz de fijar nitrógeno atmosférico, mediante tres diferentes sistemas de nitrogenasas que funcionan en diferentes condiciones de oxigenación (Kennedy y Toukdurian, 1987). Su habitat natural es el suelo, y tiene la capacidad de formar quistes resistentes a la desecación. Posee múltiples copias de su genoma, al crecerla en medio rico durante la fase estacionaria llega a tener 80 o más (Sadoff et al.,

1979; Nagpal et al 1989) y es un buen receptor de ADN foráneo: se le puede introducir de forma lineal o circular (plásmido) por transformación o por conjugación, además tiene la capacidad de incorporar ADN en su genoma por recombinación.

El ciclo de vida de *A. vinelandii*, que ha sido observado por microscopía de luz, presenta una fase vegetativa y una latente (Fig 1). Las células vegetativas son de forma bacilar y móviles mediante flagelos peritricos. Después de que se induce el enquistamiento, la célula pierde su movilidad y sufre una última división celular, dando lugar a dos células esféricas y de menor tamaño, las cuales son encapsuladas por una capa interna (intina) y una capa externa (exina), formándose así el quiste maduro. Cuando las condiciones medioambientales son favorables, el quiste inicia el proceso de germinación, emergiendo dos células móviles (Sadoff, 1975).

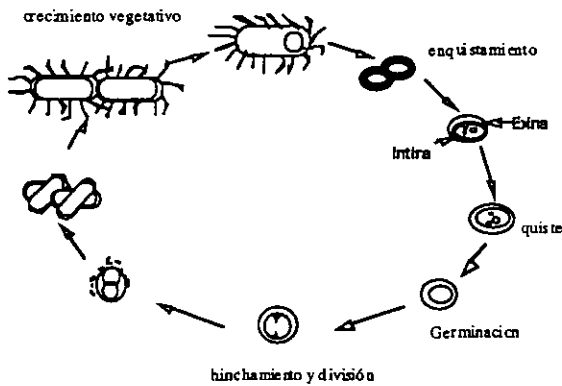


Figura. 1 Ciclo de Vida de *A. vinelandii*

Polímeros producidos por *A. vinelandii*: Alginate y PHB

A. vinelandii produce dos polímeros de importancia comercial,

alginato y polihidroxitbutirato (PHB), los cuales parecen jugar un papel importante en el proceso de enquistamiento.

El alginato es utilizado como agente estabilizante, espesante y viscosificante en la industria alimentaria. Este polisacárido es un copolímero lineal compuesto de residuos de ácido D-manurónico (M) y su epímero el ácido L gularónico (G), unidos por enlaces β 1-4. Puede estar constituido de bloques continuos de residuos M, de residuos G o de los dos residuos alternados (Clementi, 1998). Los bloques M y MG forman un alginato relativamente flexible, mientras los bloques G forman un alginato más resistente (Fig. 2, Atkins *et al* 1971). Se ha demostrado que la producción de alginato es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación celular, ya que mutantes que tienen bloqueada esta ruta biosintética son incapaces de formar quistes maduros.

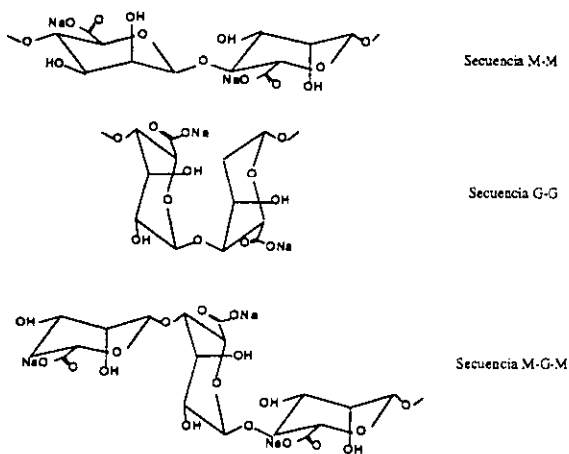


Figura 2. Estructura de los bloques homopoliméricos M y G, y los bloques heteropoliméricos MG, de la molécula de alginato (Clementi, 1998).

La genética molecular de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* se ha comenzado a estudiar desde hace ya varios años, y se han

identificado varios genes biosintéticos, de los cuales la participación de sus productos en la ruta para la biosíntesis de alginato se ilustra en la Figura 3 (Gacesa, 1998). En la Figura 4 se muestra el arreglo de estos genes en el genoma de *A. vinelandii* (Campos *et al.*, 1996, Mejía-Ruiz *et al.*, 1997a, 1997b, Vázquez *et al.*, 1999, Lloret *et al.*, 1996).

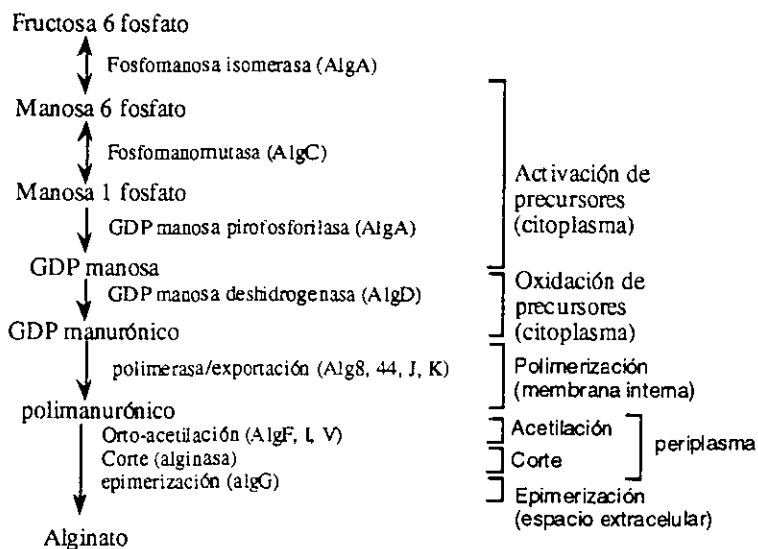


Figura.3 Ruta para la biosíntesis de Alginato. Los productos de los genes que participan en esta vía, se encuentran señalados entre parentésis.

También se han identificado algunos genes cuyos productos regulan la biosíntesis de alginato, entre los cuales se encuentran los genes *gacS*, *gacA*, *algR*, *algU* y *mucA*, *mucB* y *mucC* (Fig. 4). *gacS* y *gacA* codifican para una proteína membranal, histidín cinasa, y para un regulador de respuesta, respectivamente, que pertenecen al sistema de transducción de señales de dos componentes (Castañeda *et al.*, 2000). *algR* codifican para un regulador de respuesta, también perteneciente a la familia de reguladores de dos componentes (Nuñez *et al.*, 1999). *algU* codifica para una proteína que actúa como factor sigma alternativo (Martínez-Salazar

et al., 1996). Los genes *muc* regulan de manera negativa la producción de alginato (Martinez-Salazar et al., 1996, Nuñez et al, 2000), y en *P. aeruginosa* se ha demostrado que los genes *mucAB* codifican para factores antisigma, los cuales secuestran a AlgU mediante una interacción proteína-proteína (Schurr et al., 1996), el producto del gene *mucD* presenta homología con proteasas serínicas (Boucher et al., 1996). Del gene *mucC* no se conoce su función.

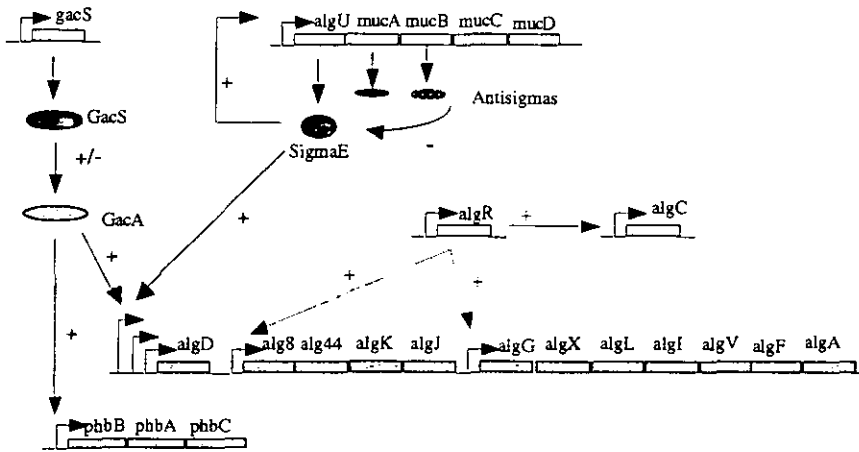


Figura.4 Arreglo genético de los genes estructurales y reguladores de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

Además de regular la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, se ha demostrado que los productos de estos genes están regulando, de manera independiente, el proceso de enquistamiento (Moreno et al, 1998; Nuñez et al, 1999).

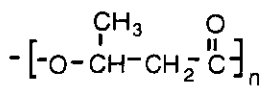


Figura 5. Estructura química del Poli-β-hidroxibutirato.

El PHB es un homopolímero constituido por monómeros de β -hidroxibutirato (Fig. 5). Este polímero, que es un poliéster, es usado como sustituto de plásticos, con la ventaja de que es biodegradable. Este poliéster se acumula en forma de gránulos intracelulares, como reserva de energía y de carbono para ser utilizados por la célula bajo períodos de limitación de nutrimentos en el medio (Dawes, 1990). Se ha observado una acumulación de PHB antes de iniciarse el proceso de enquistamiento y se ha encontrado una relación directa entre la cantidad acumulada del polímero antes del inicio del proceso de diferenciación celular y el número de quistes formados, además se ha observado una disminución gradual de PHB al avanzar la maduración del quiste (Stevenson y Socolofsky, 1996), sugiriendo que el metabolismo del PHB está involucrado en la formación de quistes (Fig 6).

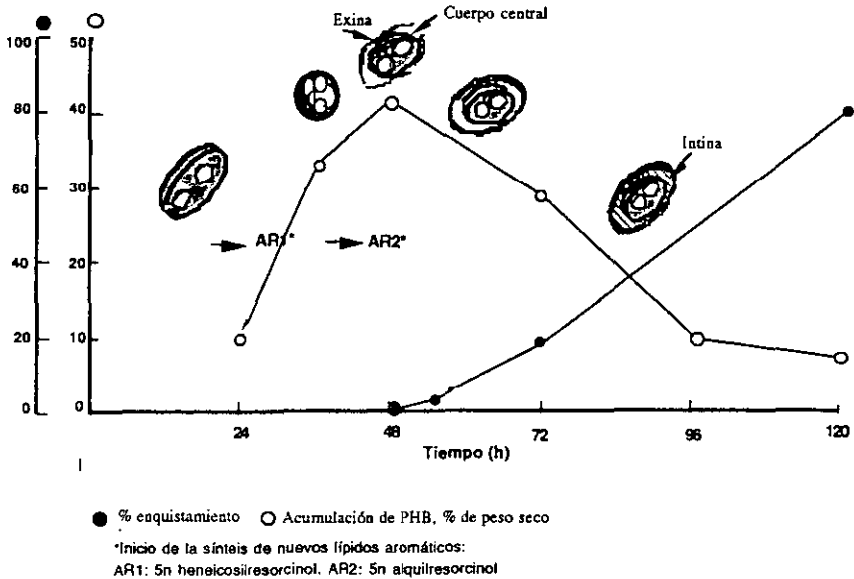


Figura 6. Esquema de algunos eventos metabólicos y morfológicos, durante el proceso de enquistamiento inducido con β -hidroxibutirato.

En *Azotobacter vinelandii* se ha descrito ya la vía de producción de PHB, la cual se ilustra en la Figura 7, en donde la enzima β -cetotiolasa cataliza la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA para dar acetoacetyl-CoA, el cual es reducido por la acetoacetyl-CoA reductasa a D(-)- β -hidroxibutiril-CoA, el cual es polimerizado por la actividad de la PHB sintasa (Senior y Dawes, 1973; Manchak y Page, 1994). Los genes que codifican para estas enzimas se caracterizaron en nuestro grupo: el gene *phbA* codifica para la β -cetotiolasa, el gene *phbB* codifica para la acetoacetyl-CoA y el gene *phbC* codifica para la PHB sintasa (Cruz, 2000), estos genes se encuentran juntos dentro del genoma de *A. vinelandii*. Los genes reguladores que parecen estar controlando la transcripción de estos genes son, los genes *phbR* y *gacA*.

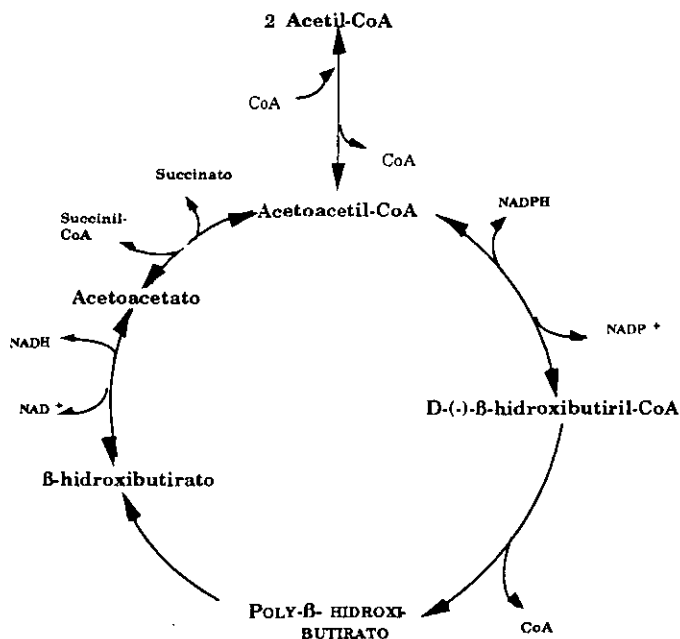


Figura 7 Vía metabólica de la síntesis del poli- β -hidroxibutirato en *A. vinelandii*.

Fisiología y bioquímica del proceso de enquistamiento

El enquistamiento es un proceso relativamente largo, involucrando una secuencia de eventos, muchos de los cuales han sido caracterizados enzimática y microscópicamente.

Se ha observado que luego de la inducción del enquistamiento, la célula sufre una división, después de la cual se detiene la síntesis de DNA, pero la síntesis de RNA continúa hasta doce horas después (Sadoff *et al.*, 1971). Después de una hora de añadir el inductor BHB, se induce la enzima BHB deshidrogenasa y, aproximadamente a las tres horas, la célula pierde su movilidad y deja de fijar nitrógeno. A las seis horas, se inicia la síntesis de los lípidos específicos del enquistamiento (Hitchins y Sadoff, 1973).

El proceso de enquistamiento requiere de un cambio de metabolismo de carbohidratos a metabolismo de lípidos, con la necesidad de la vía de gluconeogénesis para la producción de la glucosa, que forma parte del quiste, y de acuerdo con esto se han visto que se inducen proteínas específicas de esta vía como la aldolasa y la FDPasa. Otras proteínas que también son inducidas son la malato sintasa y la isocitrato liasa, de la vía del glioxilato (Hitchins y Sadoff, 1973).

Se sugiere que el cambio metabólico *per se* no induce el enquistamiento, puesto que este estado metabólico ocurre cuando se termina la glucosa del medio; sin embargo, bajo estas condiciones se ven muy pocos quistes. La especificidad de los inductores del enquistamiento (butanol, crotonato y BHB) sugieren que secuencias metabólicas únicas están involucradas en la formación del quiste. De alguna manera, los metabolitos del butanol controlan la formación de los componentes del quiste, y aun cuando intermediarios clave puedan existir deben ser transitorios, debido a que el 90% del BHB añadido es oxidado a CO₂ (Hitchins y Sadoff, 1973).

Genética molecular del enquistamiento

La diferenciación celular involucra un cambio drástico en las actividades biosintéticas de la bacteria, en la que muchos genes están involucrados. En los estudios realizados durante la esporulación, se ha observado la expresión de genes específicos durante este período y algunos genes que funcionan en la fase vegetativa, son apagados.

En la actualidad, el estudio del enquistamiento en *A. vinelandii* se ha inclinado hacia niveles bioquímicos y fisiológicos; pero muy poco se conoce de la genética molecular del mismo. Nuestro grupo de trabajo está interesado en conocer los genes, tanto estructurales como reguladores, que participan en este proceso de diferenciación celular. Hasta el momento, se ha logrado identificar algunos genes reguladores (*algU*, *mucAB*, *algR*, *gacA*, *gacS*) que además de regular la producción de alginato parecen estar regulando, de manera independiente, el proceso de enquistamiento.

Propiedades del quiste

Los quistes maduros de *A. vinelandii* son esféricos, refráctiles, inmóviles y miden 1.5 por 2.0 μm . Son resistentes a tratamiento ultrasónico, radiación ultravioleta y a la desecación (Vela y Cagle, 1969). Se ha visto, en el laboratorio, que estas células latentes son viables por más de diez años (Vela, 1974), sugiriendo que esto puede ser un atributo de sobrevivencia en la naturaleza. Sus principales componentes son un cuerpo central y dos capas rodeándolo, la exina y la intina (Fig.8). El cuerpo central es semejante a una célula vegetativa pero más denso y contiene gránulos de PHB. La exina es una estructura laminada muy densa y muy rígida, que parece ofrecer una gran protección física. La intina es menos densa y más homogénea (Socolofsky y Wyss, 1960; Hitchins y Sadoff, 1970; Lin and Sadoff, 1969b).



Figura 8. Quiste maduro de *A. vinelandii*. EX., exina, IN., intina, CB., cuerpo central., PHB., poli- β -hidroxibutirato.

Las capas intina y exina están compuestas principalmente de lípidos, proteínas y del exopolisacárido alginato. La exina contiene alginato rico en poligulurónicos, lo que la hace más rígida, mientras que la intina contiene un alginato rico en polimanurónicos. Además del alginato, se han encontrado otros carbohidratos formando parte de estas capas, como son la glucosa, manosa, xilosa y ramnosa (Lin y Sadoff, 1969).

El quiste contiene dos veces más lípido que la célula vegetativa, así como una mayor variedad de ácidos grasos. Contienen muy pocos fosfolípidos y el 82% de todos los lípidos son glicolípidos: los principales son los alquilresorcinoles y las alkilpironas, formando bicapas en las membranas del quiste (Reusch y Sadoff, 1979; Reusch y Sadoff, 1983).

Inducción del enquistamiento

Azotobacter vinelandii en la naturaleza, cuando se encuentra bajo condiciones ambientales adversas, inicia un proceso de diferenciación celular que genera los quistes. Este mismo proceso, que dura de 3 a 5 días; puede inducirse en el laboratorio.

La formación de quistes inicia durante la fase estacionaria tardía, cuando las células son crecidas en un medio que contiene glucosa. El porcentaje de enquistamiento en estas condiciones es menor de 1%; sin embargo, este proceso de diferenciación celular, puede ser inducido hasta un 100% cuando las células son crecidas en un medio que contiene etanol, n-butanol, β -hidroxibutirato (BHB) o crotonato, como única fuente de carbono (Lin y Sadoff, 1968). Cabe señalar que los inductores del enquistamiento son todos metabolizados por la bacteria y que los dos últimos son productos de la degradación del butanol.

De todos los inductores del enquistamiento probados en el laboratorio, se ha sugerido que el BHB puede funcionar como una señal para el inicio del proceso de diferenciación celular, ya que el BHB es un metabolito de *A. Vinelandii*. Frecuentemente su forma polimérica (PHB) se acumula en forma de gránulos brillantes, durante la fase estacionaria de las células vegetativas (Reusch y Sadoff, 1981), y es utilizado como fuente de carbono y energía durante el enquistamiento (Stevenson y Socolofsky, 1996). Además, se ha observado que la despolimerización del PHB es un prerrequisito para la formación del quiste (Reusch y Sadoff, 1981) (Fig. 6).

Se ha sugerido que cuando se induce el enquistamiento con BHB, la célula modifica su modelo sintético y metabólico, permitiendo la formación de las moléculas constituyentes del quiste, en grandes cantidades. Un ejemplo de ellas serían los "nuevos lípidos" específicos del quiste, ya que los lípidos son los principales productos metabólicos de la célula durante el enquistamiento y se ha demostrado que estos nuevos lípidos son derivados del metabolismo de BHB (Reusch y Sadoff, 1981; Su *et al.*, 1981)

Vía de degradación del butanol, un inductor del enquistamiento

Una de las bacterias en las que se conoce cual es la vía de degradación del butanol es *E. coli*, bacteria aeróbica facultativa. Cuando crece en un medio sin oxígeno puede fermentar azúcares, dando productos como ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico y etanol. El

precursor de estos productos de fermentación es ácido pirúvico, que es convertido a ácido láctico o a acetilCoA. El acetil CoA es metabolizado a una mezcla de ácido acético y etanol (Clark y Cronan, 1996).

Las dos actividades enzimáticas que producen etanol, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, son actividades duales de una sola proteína codificada por el gene *adhE*. *E. coli* también es capaz de utilizar el etanol como fuente de carbono y, durante este proceso, se ha observado la participación de las mismas enzimas utilizadas para la producción de etanol, indicando la reversibilidad de sus actividades (Clark y Cronan, 1996).

En *E. coli*, también se ha visto la participación de la proteína AdhE en la degradación del butanol. Así, cuando esta bacteria crece en un medio con butanol como única fuente de carbono, este alcohol es convertido a butiraldehído y, posteriormente, a butirilCoA. Estas dos reacciones son catalizadas por la enzima AdhE. Posteriormente, la oxidación de butirilCoA a CrotonilCoA es catalizada por la enzima FadE; la hidratación de crotonilCoA a acetoacetyl-CoA por FadB; y, finalmente, AtoB cataliza el rompimiento tiolítico de acetoacetyl-CoA, produciendo dos moléculas de acetil CoA. (Fig. 9). La vía de degradación del butirato se encuentra sobrelapada a la vía de degradación del butanol. El butirato es convertido a butiril-CoA por una transferasa codificada por los genes *atoAD* (Fig. 9) (Clark y Cronan, 1996).

Una vía semejante a la degradación de butanol en *E. coli*, pero en sentido contrario, se ha demostrado con mucho más detalle en la bacteria productora de butanol, *Clostridium acetobutylicum*, la cual es una bacteria gram positiva, anaeróbica estricta, formadora de esporas, la cual es capaz de fermentar una amplia variedad de azúcares, oligosacáridos y polisacáridos a butanol, acetona, etanol, butirato y acetato (Girbal *et al.*, 1995, Dürre *et al.*, 1995).

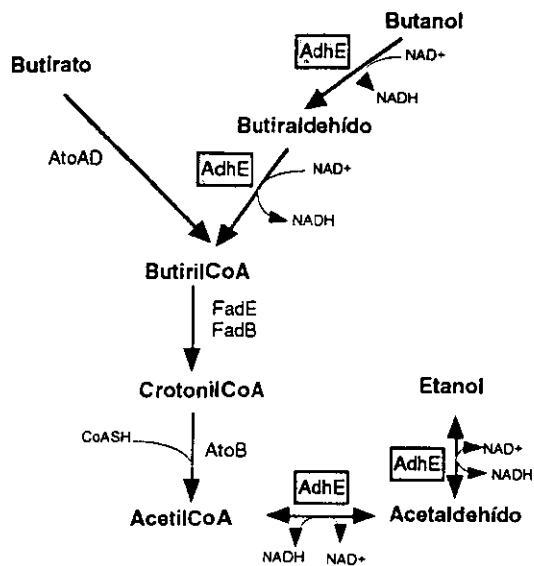


Figura 9. Vía de degradación de butanol y butirato en *E. coli*.

En la vía de formación de butanol y etanol en *Clostridium acetobutylicum*, se utilizan enzimas homólogas a las utilizadas en *E. coli*, también en esta bacteria encontramos contenidas, en una misma proteína (AAD) las actividades de alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa (Nair *et al.*, 1994) (Fig. 10).

Aldehído deshidrogenasas

Las aldehído deshidrogenasas catalizan la oxidación de aldehídos a sus correspondientes formas ácidas. Muchas de estas enzimas están involucradas en la desintoxicación y diferenciación celular; las más ampliamente estudiadas son las que oxidan acetaldehído, como son AcoD de *Alcaligenes eutrophus* (Priefert *et al.*, 1992) y AldA de *Aspergillus nidulans* (Pickett *et al.*, 1987), por mencionar algunos.

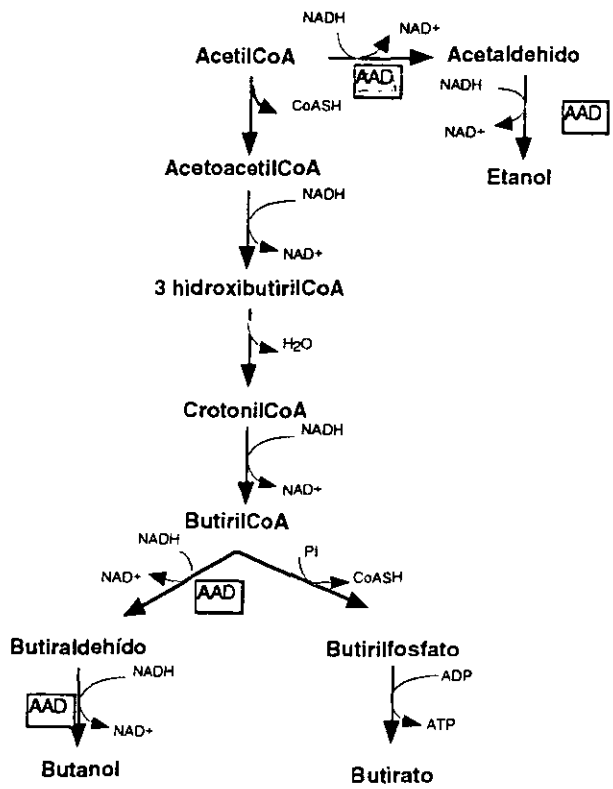


Figura 10. Vía de síntesis de butanol en *C. acetobutylicum*.

La actividad de aldehído deshidrogenasa está presente tanto en eucariontes como en procariontes, y usualmente, está involucrada en el metabolismo de alcoholes. Esta actividad puede ser dependiente e independiente de CoA y NAD(P) (Byers y Meighen 1984; Peterson y LaRue, 1982; Poels *et al.*, 1987) Parece ser que sólo en *E. coli* y en *Clostridium acetobutylicum*, la actividad de aldehído deshidrogenasa se encuentra en

una proteína que contiene también la actividad de alcohol deshidrogenasa. Estas actividades en otros organismos generalmente son encontradas en dos proteínas diferentes, pero de un tamaño menor. Mientras, que las proteínas AdhE y AAD contienen aproximadamente 890 aminoácidos, una típica alcohol deshidrogenasa tiene 300 aminoácidos y una aldehído deshidrogenasa 500 aminoácidos. También se ha observado que las proteínas AdhE y AAD, sólo en su región aminoterminal, presentan una alta similitud con aldehído deshidrogenasas, mientras que la región carboxilo terminal sólo presenta homología con alcohol deshidrogenasas de diferentes organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Nair *et al*, 1994; Goodlove *et al*, 1989; Kessler *et al.*, 1991). Por lo tanto, parece ser que la proteínas que contienen las dos actividades son una fusión de las dos proteínas con actividad individual.

III. OBJETIVOS

Debido a que no se habían identificado genes estructurales para el proceso de esquistamiento, además de que no se había propuesto alguna estrategia para identificar dichos genes, se plantearon los siguientes objetivos para el presente trabajo.

Objetivo general

Identificar genes que participan en el proceso de enquistamiento, cuando es inducido con butanol.

Objetivos particulares

- Construir un banco de mutantes en la cepa JG8 con el *minTn5-lacZ*.
- Identificar aquellas mutantes que tengan interrumpido algún gene cuya expresión aumente bajo condiciones de enquistamiento.
- Caracterizar al menos una mutante, en cuanto a su capacidad para enquistarse.
- Secuenciar el gene interrumpido en la mutante caracterizada.

IV. MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos.

Cepa	Características relevantes	Referencias
<i>A. vinelandii</i>		
ATCC9046	Altamente mucoide	Colección
JG8	<i>alg8::Tc</i> derivada de ATCC9046	Mejia_Ruiz <i>et al</i> 1997
SG9	<i>aldA::mini-Tn5</i> derivada de JG8	Este trabajo
SG9A	<i>aldA::mini-Tn5</i> derivada de ATCC9046	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5a	<i>supE44, alaCU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA</i>	Gibco BRL
S17.1Lpir	Expresa la proteína Lpir, por lo que es capaz de mantener plasmidos pUT	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
Plásmidos		
pBluescriptSK+	Vector de clonación	Stratagene

pUT-mini-Tn5lacZ	Plásmido que alberga el miniTn5lacZ, sólo replicable en cepas G-pir	De Lorenzo; <i>et al.</i> , 1990
pSG9	aldA:Tn5, derivado de pBluescriptSK+	Este trabajo
pMSD675	Cósmido, contiene el grupo de genes biosintéticos del alginato de <i>A. vinelandii</i> .	Campos <i>et al.</i> , 1996
pRK2013	ColE1-tra (RK2)-Km ^r	Figurski y Helinski, 1979

Medios y condiciones de cultivo.

Los cultivos de *A. vinelandii* se crecieron a 30°C, en medios Burk, cuya composición es la siguiente (g/l): K₂HPO₄, 0.8; KH₂PO₄, 0.2; Sacarosa, 0.2; Na₂SO₄, 0.183; MgCl₂.6H₂O 0.16; FeSO₄.7H₂O, 0.005; Na₂MoO₄.2H₂O, 0.0002; CaCl₂.2H₂O, 0.073. El pH se ajustó a 7.2. Este medio de cultivo fue suplementado con 2% de sacarosa (BS), ó 0.2% de butanol, ó 0.2% de etanol, ó 0.2% de hexanol, ó 0.2% de butirato, ó 0.2% de BHB.

Mutagénesis, selección y aislamiento de mutantes

Para llevar a cabo la mutagénesis al azar, se realizaron cruza biparentales entre la cepa receptora JG8 y la cepa donadora de *E. coli* S17.1Lpir/pUTminiTn5lacZ (Km^r) la cual alberga el trasposón miniTn5lacZ. El plásmido pUT, que contiene el miniTn5lacZ, se replica sólo en la presencia de la proteína Pi, la cual está presente en la cepa S17.1Lpir.

Las cruza se pusieron a crecer en un medio selectivo con

Kanamicina, para seleccionar las células a las que se les integró el transposón. Las colonias seleccionadas, se transfirieron a placas de Burk-Sacarosa con X-gal y Km, y se identificaron aquellas que presentaron un color azul, lo cual nos indicó que el transposón se encuentra abajo de un promotor, que hace factible la transcripción del gene *lacZ*.

Para la identificación de las cepas que contienen interrumpidos genes cuya expresión aumenta bajo condiciones de enquistamiento, se creció el banco de mutantes en Burk-Butanol con kanamicina y X-gal, se aislaron aquellas que presentaron un color azul más intenso, que el presentado en Burk-Sacarosa.

Transferencia de mutaciones

La transferencia de mutaciones de una cepa a otra se realizó utilizando el plásmido ayudador pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979). Las cepas receptoras fueron células competentes preparadas en BS, sin fierro ni molibdeno. A la cepa receptora se le agregó DNA de la cepa donadora de acuerdo a lo descrito por Page y Tigerstrom (1978). Posteriormente se seleccionaron las cepas mucoides resistentes a kanamicina.

Ensayos de enquistamiento.

Para lograr la formación de quistes de *A. vinelandii*, se utilizó n-butanol e hidroxibutirato como inductores del proceso de diferenciación celular, según el método reportado por Stevenson y Socolofsky (1966). Las células de un cultivo crecido durante 18 horas, en medio Burk con sacarosa al 2%, se cosecharon, se lavaron dos veces con MgSO₄ 10 mM y se sembraron en placas de medio Burk, con n-butanol o hidroxibutirato 0.2% como única fuente de carbono. Al cabo de cinco días, se recogieron las células de estos cultivos y se resuspendieron en 10 mM de MgSO₄. Se transfirieron alícuotas de esta suspensión, conteniendo aproximadamente 10⁶ células, a filtros Millipore HA de 0.45 µm y se secaron a 30° C por cinco días. Se determinó, por cuenta viable, tanto el número de células colocadas en los filtros, como el porcentaje de células resistentes a desecación (quistes), que se resuspendieron de los filtros secos.

Manipulaciones de ADN.

Los procedimientos estándar para purificación de ADN total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de ADN de geles de agarosa, ligación de ADN y transformación de *E. coli*, se realizaron según lo descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Las secuencias de ADN se determinaron por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Construcción del plásmido pSG9.

Para construir el plásmido pSG9 que contiene el gene *aldA*, interrumpido con *miniTn5*, un fragmento cromosomal *PstI* de 7.0 kb se clonó en el vector pBR322. El plásmido se amplificó en la cepa DH5 α : la selección del plásmido que ya contenía el inserto se realizó seleccionando transconjugantes de *E. coli*, kanamicina resistentes. La inserción del fragmento de DNA en el plásmido pSG9, se confirmó por patrón de restricción.

Determinación de la actividad de aldehído deshidrogenasa

Para determinar la actividad de aldehído deshidrogenasa, las células de *A. vinelandii* se crecieron hasta la fase estacionaria temprana en Burck-sacarosa. El cultivo se centrifugó, se lavó y se resuspendió en Burk-butanol, y se incubó 20 hrs en este medio. Posteriormente se colectaron las células por centrifugación, se resuspendieron en amortiguador fosfato pH 7.4 y se sometieron a sonicación. Esta suspensión se centrifugó a 14 000 g durante 5 min, y el sobrenadante se centrifugó durante 1.5 h a 192 000 g. El precipitado fue suspendido en sulfato de amonio y se centrifugó a 14 000 g. El precipitado resultante fue resuspendido en amortiguador fosfato pH 7.5 y dializado con el mismo amortiguador.

La actividad enzimática se hizo midiendo espectrofotométricamente la reducción de NAD a 340 nm. La reacción se inició al añadir el sustrato (butiraldedhído o acetaldehído). Como control, se midió la tasa de reducción de NAD sin la adición del sustrato. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima que redujo 1 nmol de NAD por min,

por mg de proteína.

Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa

Se centrifugó un volumen adecuado de cultivo de las células, crecidas en medio Burk-Sacarosa o Burk-Butanol a los tiempos indicados. Las células se lavaron con solución 10mM de $MgSO_4$, hasta que estuvieron libres de alginato. La cuantificación de β -galactosidasa se realizó por el método de Miller [1972], con algunas modificaciones en la etapa de lisis celular [Ferrari, *et al.*, 1985]. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM. Se tomó una cantidad adecuada de células y se trataron con lisozima (0.01%), incubándose a 37°C durante 5 minutos. Enseguida se le adicionó Tritón-X100 (0.1%) y se continuó con la determinación de β -galactosidasa según Miller. Las unidades reportadas son unidades Miller, que equivalen a los nmoles de orto-nitrofenol generados cada minuto a 28°C por mg de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis de secuencias

Las secuencias se compararon con las bases de datos GeneBank y SWISS PROT utilizando algoritmos BLASTN y BLASTX versiones 1.4 y 2.0, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990). Las comparaciones específicas con un gene o proteína en particular se realizaron con el programa Gene Works 2.5 (IntelliGenetics, Inc.). Este programa también se usó para la predicción de secuencias aminoácidas y otros análisis.

V. RESULTADOS

Identificación de genes inducidos por butanol

Para identificar genes que tuvieran alguna participación en el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*, se hizo una mutagénesis al azar en la cepa JG8 con el transposón *miniTn5lacZ*. La cepa JG8 es no mucoide ya que contiene interrumpido el gene *alg8*, un gene esencial en la biosíntesis del alginato. El transposón *miniTn5lacZ*, que se utilizó, tiene fusionado el gene *lacZ* al que no antecede un promotor. Además hacia abajo tiene un gene que genera resistencia a Kanamicina, que cuenta con su propio promotor.

Las mutantes se seleccionaron en un medio con kanamicina (Km) y X-gal. Se identificaron 3,200 colonias resistentes a kanamicina y de color azul, la resistencia nos indicaba que el transposón estaba integrado en el cromosoma, y el color azul que este transposón se encuentra abajo de un promotor, lo que hace factible la transcripción del gene *lacZ*. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, no se identificó ninguna mutante blanca, pero la cepa control JG8, que se creció en estas mismas condiciones, fue de color blanco.

Como sabemos que el butanol es un buen inductor del enquistamiento, pensamos que si se crecían las células en un medio que tuviera butanol como única fuente de carbono, se induciría o aumentaría la expresión de algunos genes cuyos productos están involucrados en el proceso de enquistamiento. Para comprobar esta hipótesis, las 3,200 mutantes se transfirieron a cajas con medio Burk X-gal y butanol, como única fuente de carbono. Lo que observamos fue que 62 de las colonias en este medio eran más azules, que cuando se crecían en medio Burk con X-gal y sacarosa como fuente de carbono. Este resultado sugería que los genes interrumpidos con el transposón, en estas mutantes, aumentaban su expresión cuando se inducía el enquistamiento, y que probablemente alguno de ellos sería esencial para este proceso de diferenciación celular.

Identificación de cepas que no se enquistan

La cepa padre (JG8) del banco de mutantes, tiene interrumpido el gene *alg8*, así que es incapaz de producir alginato y por lo tanto incapaz de producir quistes. Así que para poder someter a las 62 mutantes a un ensayo de enquistamiento, e identificar aquellas que tuvieran interrumpido algún gene esencial para este proceso, se tomaron las mutantes seleccionadas y se les transfirió el plásmido pMSD675 para recuperar la producción de alginato, ya que este plásmido contiene el gene *alg8* silvestre.

Del ensayo de enquistamiento resultó que ocho de las 62 mutantes no se enquistaron: a estas mutantes se les llamó SG2, SG9, SG21, SG23, SG27, SG36, SG49 y SG61 (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de enquistamiento de las mutantes SG. las cuales contienen el plásmido pSMD675. El enquistamiento se indujo con butanol.

Cepa	% de enquistamiento
SG2/pSMD675	<0.0001
SG9/pSMD675	<0.0001
SG21/pSMD675	<0.0001
SG23/pSMD675	<0.0001
SG27/pSMD675	<0.0001
SG36/pSMD675	<0.0001
SG49/pSMD675	<0.0001
SG61/pSMD675	<0.0001
JG8/pSMD675	0.4
ATCC9046	5.00

Las mutantes que no se enquistan contienen el transposón *miniTn5lacZ*.

Para verificar la presencia del transposón dentro del genoma de las cepas SG2, SG9, SG21, SG23, SG27, SG36, SG49 y SG61, se hizo un análisis tipo Southern Blot. Para esto se utilizó la enzima de restricción *Pst*I, que no corta el transposón, para poder ver así en el análisis bandas únicas. La hibridación se hizo utilizando como sonda el transposón *miniTn5lacZ*.

La sonda hibridó con bandas únicas y de cuatro tamaños diferentes entre las ocho cepas: 8.0 kb (SG61), 7.5 kb (SG2, SG21, SG23 y SG27), 6.5 kb (SG9 y SG36) y 6.0 kb (SG49) (Fig. 11). Esto nos indicó que el transposón está en sitios diferentes, en cuando menos cuatro de las mutantes, y posiblemente en cuatro diferentes genes.

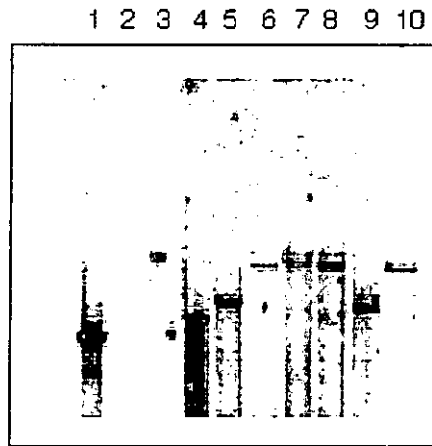


Figura 11. Análisis tipo Southern blot de las mutantes SG's. El DNA se digirió con la enzima de restricción *Pst*I y se hibridó con el *miniTn5lacZ*. Carriles:1. *miniTn5lacZ* (control positivo); 2. JG8 (control negativo); 3. SG61; 4. SG49; 5. SG36; 6. SG27; 7. SG23; 8. SG21; 9. SG9; 10. SG2.

Transferencia de mutaciones de las cepas SG2, SG9, SG21, SG23 SG27, SG36, SG49 Y SG61 a la cepa ATCC9046.

Debido a que existía una diferencia notable del porcentaje de enquistamiento de la cepa silvestre ATCC9046 y de la cepa JG8/pMSD675, siendo mucho mayor en la ATCC9046, se transfirieron cada una de las mutaciones a la cepa ATCC9046, generándose así las mutantes SG2A, SG9A, SG21A, SG23A, SG27A, SG36A, SG49A y SG61A. La transferencia de las mutaciones se verificó mediante un análisis tipo Southern blot (Datos no presentados). Estas mutantes fueron sometidas a un ensayo de enquistamiento.

Las mutantes que no se enquistaron fueron la SG9A, SG36A y SG49A, confirmándose que en estas cepas el transposón interrumpió algún gene esencial para el enquistamiento (Tabla 3). Por otro lado, en las mutantes SG21A, SG23A, SG27A y SG61A sólo se disminuyó este porcentaje.

Tabla 3. Porcentaje de enquistamiento de las mutantes SG'A. inducido con butanol.

Cepa	% de enquistamiento
SG2A	1.06
SG9A	<0.0001
SG21A	2.0
SG23A	11.0
SG27A	10.0
SG36A	<0.0001
SG49A	<0.0001
SG61A	8.0
ATCC9046	8.8

Clonación y secuenciación del gene interrumpido en la mutante SG9

De las tres mutantes que no se enquistan, al azar, se eligió una (SG9A) para caracterizarla y secuenciar el gene interrumpido por el transposón.

En el vector pBR329 se clonó un fragmento *Pst*I de 7.0 kb, de la mutante SG9A, el cual contiene insertado el transposón. El plásmido pSG9 generado (Fig. 12), fué utilizado para secuenciar 2290 pb de la secuencia de *A. vinelandii* que estaba en los dos extremos del transposón. La secuencia se determinó usando oligonucleótidos cuyo diseño se basó en la secuencia de los extremos del transposón.

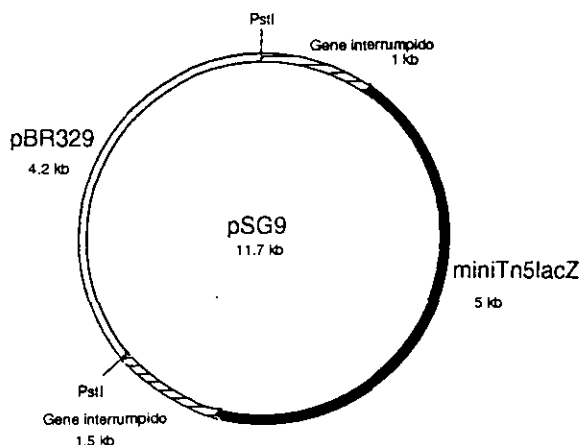


Figura 12. Plásmido pSG9. Contiene secuencia del gene *aldA*.

El análisis de esta secuencia identificó dos marcos de lectura abierta (ORFs) en orientación opuesta (Fig. 13), uno de ellos de 207 nucleótidos, al deducirse su correspondiente secuencia de aminoácidos, presentó

1 CTG CAG GCG CTC GCG GCG CTC CAG CAG GTG ACC GTG CTC CAG CAG GCT GGG CGT CAG CCG CTG CGA CCG
 69 Gln Leu Arg Glu Arg Arg Glu Leu Leu His Gly His Glu Leu Val Ser Pro Thr Leu Pro Gln Ser Pro
 70 GTC GAG CTG GTG CTG CTC CAG GCA GCG CAG CCA GGA GCG GGC GAT CGA GGG ATC GTT GGC CCG TOC GAT
 46 Asp Leu Gln His Gln Glu Leu Cys Arg Leu Trp Ser Arg Ala Ile Ser Pro Asp Asn Ala Pro Gly Ile
 acoR
 139 GGC CTT TCC CTC GGC CAG GGT TTT CAC CTG ATG AAC ATG GCG AAG CAT GCG GTT CGC TTG CAT TGT CAT
 23 Ala Lys Gly Glu Ala Leu His Thr Lys Val Gln His Val His Arg Leu Met Arg Asn Ala Gln Met Thr Met
 208 TGTGTCTCCGCACTGATCGGGGGGCGCTCCCGTACTGACCCACAGCATCGTCCAGCCGGGGCGGCTTTCGAATGGCGTCACGTCCGGCG
 300 CCGACCGATACCTGCAAGTGGCGACGACAAATGTACACCCCTGTTCACACCCCTGTACACAGGGTATCCCGCTCCACCCCCGAAAGCTGGC
 392 GCGAATCCGACAGGCACTGGGGTCTGGCACTCTGGCACACCCCTGTCTGTATCCATCCGACAGCTGTCTCTGGCGACTCCCCCGAAAGA
 ala
 484 CAGAACCACAAGAATCAGGAGAATTC ATG CCG TAT GCC CAT CTT GGC AGT GAA GGC GCC ATC GTT TCC TAG AAG
 Met Arg Tyr Ala His Pro Gly Ser Glu Gly Ala Ile Val Ser Tyr Lys
 559 GTC CCG TAC GGC AAC TAT ATC GCC GGA CAG TTC GTG CCT CCG GTG AAA GGC CAG TAC TTC ACC AAC AGC
 17 Val Arg Tyr Gly Asn Tyr Ile Ala Gly Gln Phe Val Pro Pro Val Lys Gly Gln Tyr Phe Thr Asn Ser
 628 TCG CCG GTC ACC GGC GAG GAA TTC ACC GAA TTC CCC CCG TOC AAG GCC GAG ATC GAG AAG GCA CTG
 40 Ser Pro Val Thr Gly Glu Glu Phe Thr Glu Phe Pro Arg Ser Thr Ala Glu Asp Ile Glu Lys Ala Leu
 697 GAC GCC GCC CAC GCC GCT GCC GGC GCC TGG GGC CGT ACC TCG GTG CAG GAG CCG GCC GCC CTG CTG
 63 Asp Ala Ala His Ala Ala Glu Ala Trp Gly Ala Trp Gly Arg Thr Ser Val Gln Glu Arg Ala Val Leu Leu
 766 AAG ATC GCC GAC CCG ATC GAG CAG AAC CTG GAA GTG CTG GCC GTC ACC GAA ACC TGG GAC AAC GCC AAG
 86 Lys Ile Ala Asp Arg Ile Glu Gln Asn Leu Glu Val Leu Ala Val Thr Glu Thr Trp Asp Asn Gly Lys
 835 CCG GTC CCG GAA ACC CTC AAC GCC GAC GTG CCG CTG TOC GCC GAC CAC TTC CGC TAC TAC GCC TGC
 109 Pro Val Arg Glu Thr Leu Asn Ala Asp Val Pro Leu Ser Ala Asp His Phe Arg Tyr Tyr Ala Gly Cys
 Tn51 Tn50
 904 ATC CCG GCC CAG GAA GGC AGC GCC GGC GAG ATC AAC GAG AAT ACC GTC GCC TAC CAC TTC CAC GAG
 132 Ile Arg Ala Gln Glu Gly Ser Ala Gly Glu Ile Asn Glu Asn Thr Val Ala Tyr His Phe His Glu
 970 CCG CTG GGC GTG GTC GGC CAG ATC ATC CCG TGG AAC TTC CCG CTG CTG ATG GCC GCC TGG AAG CTG GCC
 154 Pro Leu Gly Val Val Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Met Ala Ala Trp Lys Leu Ala
 1039 CCG CCG CTC GCC GCC AAC TGC ATC GTG CTC AAG CCG GCC GAG CAG ACC CCG CTG TCG ATC ACC GTG
 177 Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Cys Ile Val Leu Lys Pro Ala Glu Gln Thr Pro Leu Ser Ile Thr Val
 1108 CTG GTC GAA CTG ATC GGC GAC CTG CTG CCG CCG GGC GTG CTG AAC ATC GTC CAG GGC TTC GGC CGC GAG
 200 Leu Val Glu Leu Ile Gly Asp Leu Leu Pro Pro Gly Val Leu Asn Ile Val Gln Gly Phe Gly Arg Glu
 1177 GCC GGC GAG CCG CTG GCG ACC AGC AAG CCG ATC GCC AAG ATC GCT TTC ACC GGC TCC ACC CCG GTG GGC
 223 Ala Gly Glu Ala Leu Ala Thr Ser Lys Arg Ile Ala Lys Ile Ala Phe Thr Gly Ser Thr Pro Val Gly
 1246 GCG CAC ATC CTC AAG TGC GCC GCA GAA AAC ATC ATC CCG AGC ACC GTA GAG CTG GGC GGC AAA TOG CCG
 246 Ala His Ile Leu Lys Cys Ala Ala Glu Asn Ile Ile Pro Ser Thr Val Glu Gly Gly Lys Ser Pro
 1315 AAC ATC TTC TTC GAA GAC ATC ATG CAG GCC GAG CCG GCC TTC ATC GAG AAG GCT GCC GAA GGC CTG GTG
 269 Asn Ile Phe Phe Glu Asp Ile Met Gln Ala Glu Pro Ala Phe Ile Glu Lys Ala Ala Glu Gly Leu Val
 1384 CTG GCC TTC TTC AAC CAG GGC GAG GTG TGC ACC TGC CCG TCG CGC GCG CTG ATC CAG GAA TCC ATC TAC
 292 Leu Ala Phe Phe Asn Gln Gly Glu Val Cys Thr Cys Pro Ser Arg Ala Leu Ile Gln Glu Ser Ile Tyr
 1453 GAC GAC TTC ATG AAG GTC GTG ATG AAG AGC GTC GGC CAG ATC AAC CGC GGC ATC CCG CTG GAC ACC GAC
 315 Asp Asp Phe Met Lys Val Val Met Lys Lys Val Gly Gln Ile Lys Arg Gly His Pro Leu Asp Thr Asp
 1522 ACC ATG GTC GGT GCC CAG GCG TCC AGC CAG CAG TTC GAG AAG ATC CTC TCC TAC CTG GAG ATC GCC CGC
 338 Thr Met Val Gly Ala Gln Ala Ser Ser Gln Gln Phe Glu Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Glu Ile Ala Arg
 1591 GGC GAG GGC GCC GAG GTG CTG ACC GGC GGT GCC GCC GAA CGC CTG GAA GGC AGC CTG GCC AGC GGC TAT
 361 Gly Glu Gly Ala Glu Val Leu Thr Gly Gly Ala Ala Glu Arg Leu Glu Gly Ser Leu Ala Ser Gly Tyr
 1660 TAC ATC CAG CCG ACC CTG CTC AAG GGC CAC AAC AAG ATG CCG GTT TTC CAG GAG GAA ATC TTC CGC CCG
 384 Tyr Ile Gln Pro Thr Leu Leu Lys Gly His Asn Lys Met Arg Val Phe Gln Glu Glu Ile Phe Gly Pro
 1729 GTG GTC CCG GTC ACC ACC TTC AAG GAC GAG GCC GAG GCC CTG GOC ATC GCC AAC GAC ACC GAG TTC GGC
 407 Val Val Gly Val Thr Thr Phe Lys Asp Glu Ala Glu Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Glu Phe Gly
 1798 CTG GCC GCC GGC CTC TGG ACC CCG GAC ATC AAC CCG GCC TAC CCG ATG GGC CCG GGC ATC CAG GCC GGC
 430 Leu Gly Ala Gly Leu Trp Thr Arg Asp Ile Asn Arg Ala Tyr Arg Met Gly Arg Gly Ile Gln Ala Gly
 1867 CCG GTG TGG ACC AAC TGC TAC CAC CTG TAC CCG GCG CAC GCC GCC TTC GGT GGC TAC AAG AAG TCC GGC
 453 Arg Val Trp Thr Asn Cys Tyr His Leu Tyr Pro Pro Ala His Ala Ala Phe Gly Gly Tyr Lys Lys Ser Gly
 1936 GTC CCG GCC GAA ACC CAC AAG ATG CTC GAC CAC TAC CAG CAG ACC AAG AAC CTG CTG GTC AGC TAC
 476 Val Gly Arg Glu Thr His Lys Met Met Leu Asp His Tyr Gln Gln Thr Lys Asn Leu Leu Val Ser Tyr
 2005 GAC ATC AAC CCG CTG GGC TTC TGA TGCACGACCCCGCCCGCCCGCGACGGGGCCGGGACCGGATCGAGACGGTCTGGCGG
 499 Asp Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe * * *
 2088 AATCTCGCCGCAATCAGGGTAAACCTGGCCGATGGGAGTATCCCCCCACAGATGCCCGCGTCCGCGACCCCGCGAGCCAGCGGGARATC
 2180 GACCGCGCCCGCTGTGTGCAAGGTGCGCTTAAAAACAGACAAAACAGAGAGAGAAAAACCTCATGACGACGACCTTCTTCACTCCCTCGAC

Figura 13. Secuencia nucleotídica de la región genómica que contiene el gene *aldA* y el inicio del gene homólogo a *acoR*. También se presenta su correspondiente secuencia de aminoácidos deducida. La región donde se insertó el transposón está indicada (Tn51, Tn50).

homología a la proteína reguladora del catabolismo de acetoina AcoR, de *Alcaligenes eutrophus* (Krüger *et al*, 1992), la cual es un miembro de la familia NifA de activadores transcripcionales, conocidas como "enhancer binding proteins", requeridas para la transcripción de genes Sigma54-dependientes (Morett *et al*, 1993). Esta proteína homóloga a AcoR presentó una alta identidad (89%) con el activador transcripcional putativo PA4021 de *P. aeruginosa*, cuyo gene está localizado arriba y en dirección opuesta al gene que codifica para la aldehído deshidrogenasa putativa PA4022 (Stover *et al*, 2000).

El otro marco de lectura abierta codifica para un polipéptido de 506 aminoácido, con un peso molecular de 55,06 kDa. El transposón se insertó en este ORF entre los codones 135 y 137. Al analizar la secuencia derivada de aminoácidos, encontramos que este polipéptido presenta una alta similitud con la proteína aldehído deshidrogenasa de diferentes organismos. Con las proteínas que presenta una mayor similitud, son las aldehído deshidrogenasas de *P. Aeruginosa*, la aldehído deshidrogenasa putativa PA4022 (89%, Stover *et al*, 2000), y ExaC (88%, Schobert *et al*, 1999). También presenta similitud con AcDH-II de *A. eutrophus* (AcoD) (69%, Priefert *et al*, 1992), ThcA de *Rhodococcus sp.* (66%, Nagy *et al* 1995), AldB de *E. coli* (65%, Xu y Johnson, 1995), y AldA de *V. cholerae* (63%, Parsot y Mekalanos, 1991). Así, estos resultados sugieren que el gene interrumpido en la mutante SG9 codifica para una aldehído deshidrogenasa en *A. vinelandii*, y nosotros la llamamos AldA. En la Figura 14 se presenta un alineamiento de AldA con las proteínas que presentó una mayor similitud.

Importantes regiones que están altamente conservadas entre muchas aldehído deshidrogenasas de procariotes y eucariotes, también se encontraron en las regiones correspondientes en AldA de *A. Vinelandii*. Esto incluye dos residuos de aminoácidos, ácido glutámico (E262) y cisteína (C301), los cuales se han reportado por ser importantes para la actividad enzimática; y la region alrededor de estos aminoácidos también está conservada. Además, se identificó un posible motivo de unión a NAD GxGx(3)G entre las posiciones de 218-224 (Fig. 14).

AlcA Av	PRV FGSV AIUSV LAG I	R Q K	V P O	T N S I	V I	D E P T E R	D A S I L E K	AG	75									
ExaC2 Pd4022	PRV FGSV AIUSV LAG I	R Q K	V P O	T N S I	V I	O P T I A E F	D A S I L E K	AG	75									
ExaC Pa	LYL APQT L AVV D E S D	G C E E	V P O	T N S I	V I	O P T I A E F	D A S I L E K	AE	75									
AcDH-II Re	YMV E I A Q V S N P Q C C R	C R V	A C E	E S T T	V I	K O P P I R V	Q C Q W C A	FA	75									
Consensus	L.V.F.G. P A.V. L.E.S	G.C.E.E	V.P.O.T.N.S.I.V.I	.P..E.F		D.A.S.I.L.E.K	.A.	75										
AlcA Av	M C P A A L L E	E	E	I	V	E	L	N	D	I	S	E	F	C	N	E	N	150
ExaC2 Pd4022	M C P S N L L E	E	E	I	V	E	L	N	D	I	L	A	S	E	F	C	N	150
ExaC Pa	M C P S N L L E	E	E	I	V	E	L	N	D	I	L	A	S	E	F	C	N	150
AcDH-II Re	MTS R A N L N E	E	E	L	S	T	A	I	A	V	F	S	F	S	L	I	S	150
Consensus	M C P R A N L L E	E	E	E	I	V	E	L	N	D	I	A	S	E	F	C	N	150
AlcA Av																		225
ExaC2 Pd4022																		225
ExaC Pa																		225
AcDH-II Re																		225
Consensus																		225
AlcA Av																		300
ExaC2 Pd4022																		300
ExaC Pa																		300
AcDH-II Re																		300
Consensus																		300
AlcA Av																		375
ExaC2 Pd4022																		375
ExaC Pa																		375
AcDH-II Re																		375
Consensus																		375
AlcA Av																		450
ExaC2 Pd4022																		450
ExaC Pa																		450
AcDH-II Re																		450
Consensus																		450
AlcA Av																		506
ExaC2 Pd4022																		506
ExaC Pa																		506
AcDH-II Re																		506
Consensus																		506

Figura 14. Alineamiento de las aldehído deshidrogenasas de *A. vinelandii* AlcA, *P. aeruginosa* ExaC, ExaC2 y *A. eutrophus* AcDH-II. Los aminoácidos idénticos entre todas las proteínas se identifican por el sombreado. La flecha indica el sitio donde se insertó el transposón, los asteriscos señalan los aminoácidos importantes para la actividad catalítica. El posible sitio de unión a NAD está subrayado.

La mutante SG36 también tiene interrumpido el gene *aldA*

Para identificar alguna otra mutante, que al igual que la SG9, tuviera interrumpido el gene *aldA*, se hizo un análisis tipo Southern Blot de las ocho mutantes, usando el plasmido pSG9 como sonda. En el análisis de la mutante SG2, SG21, SG23, SG27, SG49 y SG61 la sonda hibridó con dos fragmentos de DNA, uno que contenía el transposón y otro que contenía el gene *aldA*; pero en las mutantes SG9 y SG36, la sonda hibridó con sólo un fragmento de DNA, que contiene tanto el transposón como el gene *aldA* (Fig. 15). Este resultado nos indicó que la mutante SG36 también tiene interrumpido el gene *aldA*, por lo tanto las mutantes SG9 y SG36 son iguales. Este resultado no nos sorprendió, debido que al hacer el Southern Blot para verificar la presencia del transposón en las mutantes, los fragmentos de DNA contra los que hibridó la sonda (*miniTn5lacZ*) fueron del mismo tamaño en la cepas SG9 y SG36.



Figura 15. Análisis tipo Southern blot de las mutantes SG's. El DNA se digirió con la enzima de restricción *PstI* y se hibridó con el plásmido pSG9. Carriles: 1. pSG9 (control positivo); 2. ATCC9046; 3. SG61; 4. SG49; 5. SG36; 6. SG27; 7. SG23; 8. SG21; 9. SG9; 10. SG2.

La mutante SG9 no puede utilizar butanol como fuente de carbono

La mayoría de las aldehído deshidrogenasas que presentaron similitud con *AldA* de *A. vinelandii*, están involucradas en la degradación de algún tipo de alcohol, generalmente etanol. Y debido a que nosotros identificamos la mutante SG9 en butanol, pensamos que la proteína *AldA* pudiera estar involucrada en la degradación del butanol; por esto decidimos ver si la mutante podía utilizar este alcohol como fuente de carbono. Por tal motivo, se hizo una curva de crecimiento de esta mutante, en un medio de cultivo con butanol como única fuente de carbono, resultando que no puede crecer en estas condiciones, lo que nos confirma la participación de la proteína *AldA* en la degradación del butanol (Fig. 16). Esta mutante también se creció en un medio con sacarosa como fuente de carbono, esto para tener un control positivo (Fig. 17).

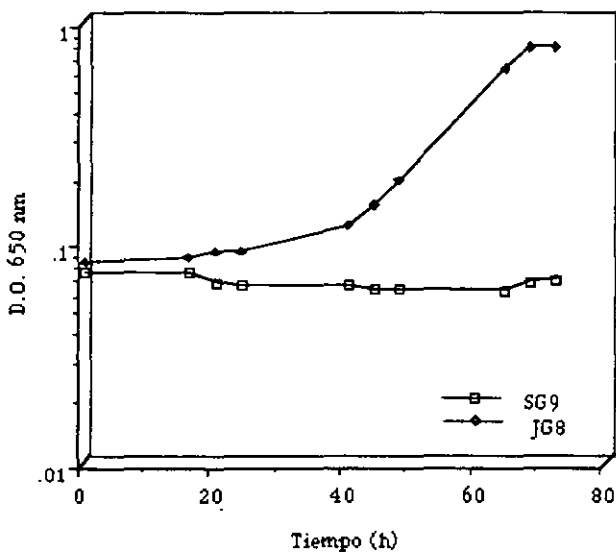


Figura 16. Crecimiento de la mutante SG9 y JG8 en Burk-Butanol.

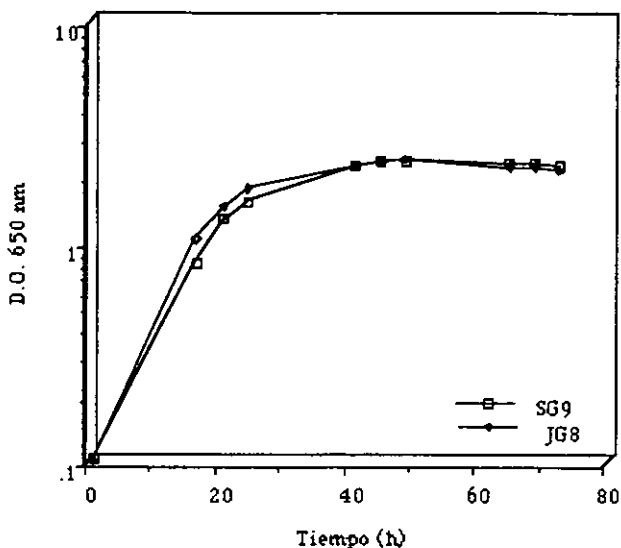


Figura 17. Crecimiento de la mutante SG9 y JG8 en Burk-Sacarosa.

También se confirmó la inducción de la transcripción bajo condiciones de enquistamiento del gene *aldA*, mediante la cuantificación de la actividad de β -galactosidasa, creciendo a la mutante SG9 tanto en sacarosa como en butanol como fuentes de carbono. Claramente se observó una inducción de la actividad de β -galactosidasa, bajo condiciones de inducción del enquistamiento (Fig.18).

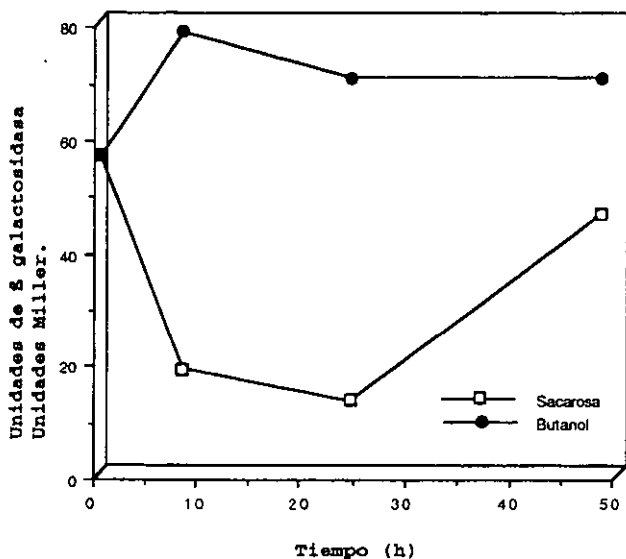


Figura 18. Efecto de la inducción del enquistamiento sobre la fusión transcripcional β -galactosidasa al gene *aldA*.

Crecimiento de la mutante SG9 en medio de cultivo con butirato

Una de las proteínas que pudieran tener homología funcional a la proteína *AldA* es la proteína butiraldehído deshidrogenasa de *Clostridium acetobutylicum*, la cual es necesaria para la formación de butanol, a partir de butiraldehído y éste de butiril CoA (ver Figura 10). Esta bacteria también produce butirato a partir de butiril CoA. Por otra parte, cuando a la bacteria *E. coli* se le da butanol o butirato como fuente de carbono, la degradación de los sustratos sigue la vía ejemplificada en la Figura 9, pero en sentido contrario, lo mismo que nosotros pensamos que ocurre en *A. vinelandii* cuando es crecida en butanol. Si éste fuera el caso, en la mutante SG9 estaría bloqueada la reacción que cataliza la aldehído deshidrogenasa (*AldA*), por eso la mutante no puede degradar el butanol. Sin embargo, si se pone a crecer la mutante en un medio que contenga butirato como fuente de carbono, sí debería crecer, por lo que se hizo una curva de crecimiento de la mutante SG9 en un medio con butirato.

Como se esperaba, esta mutante si creció en este medio, de manera similar a la cepa control JG8 (Fig. 19).

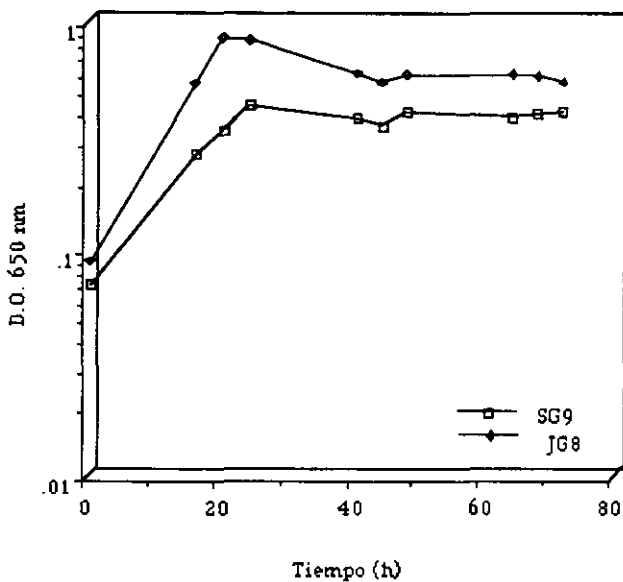


Figura 19. Crecimiento de la mutante SG9 y JG8 en Burk-Butirato.

Ensayo de enquistamiento de la mutante SG9A inducido con hidroxibutirato

La mutante SG9 no puede enquistarse cuando este proceso es inducido con butanol, debido a que no puede degradar este alcohol, por lo tanto además de no tener carbono para crecer y formar el quiste,

tampoco se puede generar lo que se ha sugerido que es la señal para iniciar el proceso de enquistamiento, el hidroxibutirato. Así que se hizo un ensayo de enquistamiento en esta mutante usando hidroxibutirato como fuente de carbono y como inductor del enquistamiento. Aunque con una reducida frecuencia, la mutante SG9 produjo quistes resistentes a la desecación (Tabla 4). Esto nos confirma que la mutante, con el gene *aldA* interrumpido, no produce quistes cuando el enquistamiento es inducido con butanol, porque no pueden degradar dicho alcohol.

Tabla 4. Porcentaje de enquistamiento de las mutantes SG9A, inducido con hidroxibutirato.

Cepa	% de enquistamiento	
	Butanol	BHB
ATCC9046	27.9	11.6
SG9A	<0.0001	1.3

Actividad de aldehído deshidrogenasa

La incapacidad de la mutante SG9A para crecer en butanol como fuente de carbono y la alta similitud de *AldA* con aldehído deshidrogenasas, sugiere que este gene codifica para una enzima con actividad de butiraldehído deshidrogenasa. Por lo tanto, decidimos hacer una ensayo de la actividad de esta enzima en extractos crudos de la cepa silvestre ATCC9046 y en la cepa mutante SG9A.

La actividad de butiraldehído deshidrogenasa, independiente de CoA, se detectó en la cepa silvestre, y una significativa reducción de dicha actividad se observó en la mutante SG9A (Tabla5).

AldA también presentó actividad de acetaldehído deshidrogenasa. De acuerdo con estos resultados, la cepa SG9A no crece con etanol ni hexanol como fuentes de carbono (datos no presentados).

Tabla 5. Actividad de aldehído deshidrogenasa en la mutante *aldA* de *A. vinelandii*.

Cepa	Aldehído deshidrogenasa (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)a	
	Butiraldehído	Acetaldehído
ATCC9046	75.03 ± 0.03	104.12 ± 3.09
SG9A	20.46 ± 1.46	23.65 ± 2.65

VI. DISCUSION

La construcción de un banco de mutantes, nos permitió identificar algunos genes que parecen tener participación en el proceso de enquistamiento. Este banco se hizo en la cepa JG8, con el transposón *miniTn5lacZ*. Debido a que este transposón contiene el gene *lacZ* al que no antecede un promotor, se esperaba encontrar colonias azules y blancas. En aquellas en que el transposón se insertara en un sitio que estuviera bajo la influencia de un promotor de *A. vinelandii* serian azules, y si se insertara en cualquier otro sitio serían blancas.

Se identificaron 3,200 colonias de color azul pero no se identificó ninguna colonia blanca. Este resultado puede ser debido a que en el inicio del transposón contenga una secuencia promotora que es reconocida solo en *A. vinelandii* y no en otros organismos en donde se ha usado este transposón. Así, en cualquier sitio donde se insertó el transposón, se transcribió el gene *lacZ*, independientemente de si estaba bajo la influencia de un promotor de *A. vinelandii* o no. En nuestro laboratorio, se construyó otro banco de mutantes con el mismo transposón en la cepa UW136, y tampoco se observó ninguna colonia blanca, lo cual apoya la hipótesis de que el *miniTn5lacZ* contiene una secuencia promotora, reconocida como tal solo en *A. vinelandii*. Actualmente, se conocen muy pocas secuencias promotoras consenso de esta bacteria por lo que no se pudo identificar el posible promotor al inicio del transposón.

El número de colonias del banco de mutantes (3,200), pudiera parecer no suficiente para abarcar todas las probabilidades de encontrar algún gene esencial para el proceso de enquistamiento, ya que *A. vinelandii* tiene aproximadamente 4 500 genes. Sin embargo, debido a que nosotros sabíamos que el enquistamiento era inducido con butanol, al mismo tiempo de ir construyendo el banco en un medio con sacarosa, fué transferido a un medio que contenía butanol como fuente de carbono. Así se identificaron 62 colonias en las cuales aumentaba la intensidad del color azul; todo parecía ser que en éstas, el transposón estaba insertado bajo la influencia de un promotor que aumentaba su actividad bajo condiciones que inducen el enquistamiento.

Las 62 mutantes se sometieron a un ensayo de enquistamiento y se identificaron ocho que no se enquistan. Al hacer estos ensayos de enquistamiento, se observó que la cepa JG8 presentaba un porcentaje de enquistamiento inferior al presentado por la cepa silvestre ATCC9046. Por esto, las mutaciones de las ocho mutantes se transfirieron a la cepa ATCC9046, generándose ocho nuevas cepas, de las cuales se observó que solamente tres de ellas no se enquistaban, SG9A, SG36A y SG49A.

Las otras cinco mutantes se enquistaron: dos de ellas (SG2A, SG21A) en un porcentaje menor que la silvestre, y las otras tres (SG23A, SG27A y SG61A) obtuvieron un porcentaje de enquistamiento igual o mayor al de la cepa silvestre, aunque no significativamente mayor, ya que en otros experimentos la cepa silvestre ha presentado estos mismos valores. Estas mutantes quizá tengan interrumpido algún gene que sólo parcialmente esté afectando el proceso de enquistamiento, o también pudiera ser que en estas mutantes aún existen copias silvestres del gene mutado, lo cual podremos saberlo en cuanto clonemos estos genes. Por lo anterior, sería muy interesante conocer qué genes están interrumpidos en estas mutantes, principalmente en la cepa SG49, en la cual, al igual que la SG9A, no se enquista cuando se utiliza butanol como inductor.

De la mutante SG9A se clonó y secuenció un fragmento de DNA que contenía el transposón, y se identificaron dos ORFs. El que está interrumpido por el transposón, codifica para una proteína que presenta alta similitud a nivel de secuencia de aminoácidos con las aldehído deshidrogenasas de diferentes organismos. El otro ORF, que está incompleto, presenta similitud con la proteína reguladora de la transcripción AcoR de *Alcaligenes eutrophus*. Interesantemente, en *P. aeruginosa* se encontraron dos genes aún no caracterizados (PA4022 y PA4022), los cuales son homólogos a *AldA* y *AcoR*. Tanto en *A. vinelandii* como en *P. aeruginosa* la organización física de estos genes es similar, están juntos y en dirección opuesta. Es muy posible que *AcoR* sea el activador transcripcional del gene *aldA*, ya que es muy frecuente encontrar a un gene que codifica para un regulador transcripcional junto a algún gene que esta bajo su control transcripcional. Además algo que apoya esto, es que en *A. eutrophus*, *AcoR* parece ser el activador transcripcional del gene de una acetaldéhído deshidrogenasa (Krüger *et al* 1992). Posterior a este trabajo, se ha continuado con la caracterización

del gene *aldA*, y se encontró que la transcripción es iniciada a partir de un único promotor Sigma54 dependiente. También ya se clonó el gene silvestre y se hizo un ensayo de complementación con este gene, en la mutante SG9A.

Las aldehído deshidrogenasas generalmente están involucradas en el metabolismo de alcoholes, y ya se han identificado en *E.coli* y *C. acetobutanicum* enzimas con esta actividad, las cuales participan en el metabolismo particular de butanol. Debido a la alta similitud de *AldA* con aldehído deshidrogenasas, además de la evidencia de que la mutante SG9 no crece en un medio que contiene butanol como fuente de carbono, pero sí crece en un medio con butirato, decidimos hacer un ensayo de actividad de aldehído deshidrogenasa en la mutante SG9. Como se esperaba, nos encontramos con una significativa disminución de la actividad enzimática en esta mutante comparada con la cepa silvestre. Debido a que en la mutante SG9 no desapareció totalmente la actividad de aldehído deshidrogenasa, se sugiere que existen cuando menos otra proteína con dicha actividad.

Los ensayos de actividad se hicieron usando como sustrato dos tipos de aldehído, butiraldehído y acetaldehído, los resultados fueron similares para ambos sustratos, lo que nos indica que la actividad de *AldA* no es específica para butanol, más bien parece que tiene alguna participación en el catabolismo de varios alcoholes, lo cual se confirma cuando se observó que la mutante SG9 no creció en medios de cultivo con butanol, etanol o hexanol como fuentes de carbono.

Aunque se conoce que el butanol es un inductor del enquistamiento, parece ser que este no funciona propiamente como una señal para iniciar el proceso de diferenciación celular, y este podría inducir el enquistamiento porque es convertido a BHB u otro metabolito relacionado. Así, cuando se induce con butanol el enquistamiento en la mutante SG9, no se enquista porque no puede degradar el butanol y por lo tanto además de que no genera sus productos de degradación como BHB, tampoco tiene carbono ni energía para la formación del quiste. Cuando se usa como inductor el BHB, sí se enquista la mutante SG9A, sugiriendo que el BHB u otro metabolito relacionado a éste funcionan como señal del inicio de enquistamiento.

VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se identificaron 62 mutantes, que tienen interrumpido algún gene cuya transcripción es aumentada bajo condiciones de inducción del enquistamiento con butanol.

En cinco de estas mutantes, el gene interrumpido pudiera participar en el proceso de diferenciación celular, ya que el enquistamiento es disminuido en esta mutantes cuando este es inducido con butanol.

Dos de estas mutantes tienen interrumpido un gene esencial para el proceso de enquistamiento, inducido con butanol. Una de ellas se caracterizó, la mutante SG9A, la cual tiene interrumpido el gene *aldA* que codifica para una proteína con actividad de aldehído deshidrogenasa. Esta mutante no crece en medios de cultivo con butanol, etanol y hexanol como fuentes de carbono; tampoco presentó actividad de butiraldehído y acetaldehído deshidrogenasa. A pesar de que esta mutante no se enquista cuando se usa butanol como inductor, si se usa el inductor BHB sí se enquista.

Arriba y en dirección contraria del gene *aldA*, se identificó un marco de lectura abierto que codifica para un proteína, que pudiera ser el regulador transcripcional de *aldA*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Atkins ED, Sheehan JK.** 1971. The molecular structure of hyaluronic acid. *Biochem J.* 125:92P.
- Altschul S. Gish W., Miller W., Myers E. y Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Boucher, C. J., J. Martínez-Salazar, M. J. Schurr, M. H. Mudd, H. Yu and V. Deretic.** 1996. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serin protease HtrA. *J. Bacteriol.* 178: 511-523.
- Byers D. y Meighen E.** 1984. *Vibrio harvery* aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 259:7109-7114.
- Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. LLoret, S. Moreno, C. Nuñez, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- Castañeda M., Guzmán J., Moreno S. y Espín G.** 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-B-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.
- Clark D. y Cronan J.** (1996). Two-Carbon compounds and fatty acids as carbon sources: Neidhardt, F. (Editor in Chief) *et al., Escherichia coli* and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. ASM PRESS WASHINGTON, D.C. p.343-357
- Clementi, F.** 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17:327-361.
- Cruz T.** 2000. Caracterización del gen *phbB* de *Azotobacter vinelandii* involucrado en la producción del poliéster natural polihidrxibutirato. Tesis de licenciatura. Instituto de Biotecnología UNAM.

Dawes, E. A. 1990. Novel microbial polymers: an introductory overview. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers* ed. Dawes, E. A. pp3-16. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.

Dürre P., Fischer R., Kuhn A., Lorenz K. Schreiber W., Stürzenhofecker B., Ullmann S., Winzer K. y Sauer U. 1995. Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:251-262.

Ferrari E., Howard S. y Hoch J. 1985. Effect of sporulation mutations on subtilisin expression, assayed using a subtilisin- β -galactosidase gene fusion. In J. A. Hoch and P. Setlow (ed.), *Molecular biology of microbial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 180-184.

Figursky, D. H. and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1648-1652.

Gacesa, P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiol.* 144:1133-1143.

Girbal L., Croux C., Vasconcelos I. y Soucaille P. 1995. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:287-297

Goodlove P., Cunningham J. Parker J. y Clark D. 1989. Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. *Gene* 85:209-214.

Hitchins V y Sadoff H. 1970. Morphogenesis of cyst in *Azotobacter*

vinelandii. J. Bacteriol. 104:492-498.

Hitchins, V. and H.L. Sadoff. 1973. Sequential metabolic events during encystment of *A. vinelandii*. J. Bacteriol. 113: 1273-1279.

Kennedy, C. and A. Toukdarian. 1987. Ann. Rev. Microbiol. 41 pp 227-258.

Kessler D., Leibrecht I. y Knappe J. 1991. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. FEBS Lett. 281:59-63.

Krüger, N., and A. Steinbüchel. 1992. Identification of *AcoR*, a regulatory gene for the expression of genes essential for acetoin catabolism in *Alcaligenes eutrophus* H16. J. Bacteriol. 174:4391-4400.

Lin L y Sadoff H. 1968. Encysment and Polymer Production by *Azotobacter vinelandii* in the Presence of B-Hidroxybutyrate. J. Bacteriol. 95:2336-2343.

Lin, L.P. y Sadoff, H.A. 1969. Chemical composition of *A. vinelandii* cysts. J. Bacteriol. 100: 480-486.

Lin, L.P. y Sadoff, H.A. 1969-b. Preparation and ultrastructure of the outer coats of *A. vinelandii* cysts. J. Bacteriol. 98: 1335-1341.

LLoret, L., R. Barreto, R. León, S. Moreno, J. Martínez-Salazar, G. Espín, and G. Soberón-Chávez. 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. Mol. Microbiol. 21:449-457.

Manchak, J., and W. J. Page. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. Microbiology. 140:953-963.

Martínez-Salazar, J., S. Moreno, R. Nájera, J. C. Boucher, G.

Espín, G. Soberón-Chávez, and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA MucB MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178:1800-1808.

Mejía-Ruíz, H, J. Guzmán, S. Moreno, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997a. The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene* 199:271-277.

Mejía-Ruíz, H, S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997b. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 101-106.

Miller J. 1972. Experiments in molecular genetics. p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.

Moreno, S. , J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1998. Role of the alternative SigmaE factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii* *J. Bacteriol.* 180: 2766-2769.

Morett, E., and L. Segovia. 1993. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* 175:6067-6074.

Nagy I., Schoofs G., Compennolle F., Proost P., Vanderleyden J. y De Mot R. 1995. Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. Strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 177: 676-687.

Nagpal P, Jafri S, Reddy M, Das H. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 171:3133-3138.

Nair R, Bennett G y Papoutsakis E.1994. Molecular Characterization of an Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Gene from *Clostridium*

acetobutylicum ATCC824. J. Bacteriol. 176:871-885.

Núñez C., S. Moreno, G. Soberón-Chávez and G. Espín. 1999. The *Azotobacter vinelandii* Response Regulator AlgR is Essential for Cyst Formation. J. Bacteriol. 181.1: 141-148.

Núñez C., León, R., J. Guzmán., G. Espín, and G. Soberón-Chavez. 2000. Role of *Azotobacter vinelandii* mucA and mucC gene products in alginate production .J. Bacteriol. 182: 6550-6556.

Page, W. J. and M. von Tigerstrom. 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. Can. J. Microbiol. 24:1590-1594.

Parsot C. y Mekalanos C. 1991. Expression of the *Vibrio cholerae* gene encoding aldehyde dehydrogenase is under control of ToxR, the cholera toxin transcriptional activator. J. Bacteriol. 173:2842-2851.

Peterson J. y LaRue T. 1982. Soluble aldehyde dehydrogenase and metabolism of aldehydes by soybean bacteroids. J. Bacteriol. 151:1473-1484.

Pickett M., Gwynne D., Buxton F., Elliott R., Davies R., Lockington R. Scazzocchio C y Sealy-Lewis. 1987. Cloning and characterization of the *aldA* gene of *Aspergillus nidulans*. Gene 51: 217-226.

Piggot P., Moran C. y Youngman P. 1994. Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Poels P., Groen B. y Duine J. 1987. NAD(P)-independent aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*: a novel type of molybdenum-containing hydroxylase. Eur. J. Biochem. 166:575-579.

Priefert, H., N. Krüger, D. Jendrossek, B. Schmidt, and A. Steinbüchel. 1992. Identification and molecular characterization of the gene coding for acetaldehyde dehydrogenase II (acoD) of *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 174:899-907.

- Reusch, R. N., and H. L. Sadoff.** 1979. 5-n-alkylresorcinols from encysting *Azotobacter vinelandii* : Isolation and characterization. *J. Bacteriol.* 139:448-453.
- Reush R.N. and H.L. Sadoff.** 1981. Lipid metabolism durins encystment of *Azotobacter vinelandii* . *J. Bacteriol.* 145: 889-895.
- Reush R.N. and H.L. Sadoff.** 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cysts membrane. *Nature.* 302:269-270.
- Sadoff H.L., E. Berke and B. Loperfido.** 1971. Physiological studies of encystment in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 105: 185-189.
- Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 39:516-539.
- Sadoff H, Shimel B y Ellis S.** 1979. Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J. Bacteriol.* 138:871-877.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- Schobert, M., and H. Görisch.** 1999. Cytochrome c550 is an essential component of the quinoprotein ethanol oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and sequencing of the genes encoding cytochrome c550 and adjacent acetaldehyde dehydrogenase. *Microbiol.* 145:471-481.
- Schurr, M. J., H. Yu, J. M. Martínez-Salazar, J. C. Boucher, and V. Deretic.** 1996. Control of AlgU, a member of the SigmaE-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.*178:4997-5004.

Senior, P. J. y Dawes E. A. 1973. The regulation of poly-β-hidroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 134:1193-1201.

Socolofsky M y Wyss O. 1960. Cyst of *Azotobacter*. 81:946-954

Stevenson, L. H. and M.D. Socolofsky. 1966. Cyst formation and poly-β-hidroxybutic acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* 91: 304-310.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R.M., Smith, K.A., Spencer, D.H., Wong, G.K.S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S. and Olson, M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 (6799):959-964.

Su, Ch-J. R. N. Reush and H.L. Sadoff. 1981. Isolation and characterization of several unique lipids from *Azotobacter vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* 147: 80-90.

Vázquez, A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado y G. Espín. 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* alg GXLVIFA genes: characterization of *algF* mutants. *Gene.* 232: 217-219.

Vela, G y Cagle G. 1969. Formation of fragile Cysts by a strain of *Azotobacter chroococcum*. *J Gen. Microbiol.* 57:365-368.

Vela G.L. 1974. Survival of *A. vinelandii* in dry soil. *Appl. Microbiol.* 28:77-79.

Xu J. y Johnson R. 1995. *aldB*, an RpoS-dependent gene in *Escherichia coli* encoding an aldehyde dehydrogenase that is repressed by Fis and activated by Crp. *J. Bacteriol.* 177:3166-3175.