



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**Estudio del efecto de la sobreexpresión de  
los pequeños RNAs reguladores de la  
familia Rsm en la producción de alginato  
en *Azotobacter vinelandii*.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

**Q.C. Gabriela Fernanda May Compañ**

**ASESOR DE TESIS:**

**D.C. Miguel Castañeda Lucio**



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

---

---



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**Estudio del efecto de la sobreexpresión de  
los pequeños RNAs reguladores de la  
familia Rsm en la producción de alginato  
en *Azotobacter vinelandii*.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

Q.C. Gabriela Fernanda May Compañ

**ASESOR DE TESIS:**

D.C. Miguel Castañeda Lucio

## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria que produce polímeros de interés biotecnológico entre ellos encontramos los alginatos los cuales se utilizan en la industria farmacéutica y alimenticia para emulsificar, espesar, y dar viscosidad a soluciones acuosas. Gracias a lo anterior se ha generado interés en estudiar su biosíntesis y regulación. Su biosíntesis es regulada a través del sistema de doble componente GacS/GacA el cual está ligado a un sistema de regulación post – transcripcional Rsm. El sistema en *A. vinelandii* posee nueve pequeños RNAs (ocho de la subfamilia RsmZ y uno de la subfamilia RsmY), los cuales son reguladores positivos de la síntesis del alginato. En estudios previos se determinó que RsmZ1, al igual que RsmZ2 juegan un papel importante en la producción de alginato; en sus respectivas mutantes, disminuye aproximadamente el 80% de la síntesis del polímero. Sin embargo aún queda resolver la incógnita si los demás sRNAs de la familia Rsm también están involucrados en la producción del polímero. Con la finalidad de realizar la sobreexpresión constitutiva de los genes que codifican para los sRNAs de la familia Rsm se construyó el vector integrativo pUMAgyrAKm, el cual se generó intercambiando el promotor inducible *tac* del vector previamente construido pUMAKmtac , por el promotor constitutivo *gyrA*, nativo de *A. vinelandii*. A este vector se le clonaron individualmente cada uno de los siguientes genes: *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6* y *rsmY*, posteriormente se recombinaron en el genoma de la cepa silvestre (AEIV) en el *locus* neutro de recombinación (*meIA*). A estas recombinantes se les generó una mutación en el gen *gacA* y se midió en cada una de ellas la producción de alginato. La mutante *gacA* no expresa ninguno de los sRNAs de la familia Rsm; de esta forma al expresar de manera independiente de GacA un sRNA estamos viendo el efecto regulador de este sRNA en particular. Por medio de este sistema así construido fue posible sobreexpresar a los sRNAs a partir del promotor *gyrA*, y se determinó que los sRNAs RsmZ6 y RsmY, al igual que RsmZ1, regulan positivamente la producción de alginato.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	7
<i>Azotobacter vinelandii</i> .....	7
Características de crecimiento y ciclo de vida .....	7
Alginato .....	9
Biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i> .....	11
Genes involucrados en la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .....	13
Sistema de doble componente .....	14
El sistema de doble componente GacS/GacA.....	16
Características estructurales esenciales del sistema GacS/GacA .....	17
Sistema de regulación post–transcripcional Csr /Rsm .....	18
Transducción de señales por la vía Gac/Rsm .....	19
El Sistema de transducción de señales Gac/Rsm en <i>A. vinelandii</i> y su relación con la producción de alginato.....	21
JUSTIFICACIÓN .....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares .....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
Cepas y plásmidos .....	25
Medios de cultivo .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Construcción del vector integrativo pUMAgyrAKm.....	39
Clonación de los sRNAs RsmZ1, RsmZ2, RsmZ4, RsmZ5 y RsmZ6 en el vector integrativo pUMAgyrAKm.....	46
Clonación del sRNA RsmY en el vector pJET1.2/blunt .....	52
Clonación del sRNA RsmY en el vector integrativo pUMAgyrAKm.....	53
Sobreexpresión de RsmZ1, RsmZ2, RsmZ4, RsmZ6 y RsmY en <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	55
Generación de mutantes <i>gacA</i> en las que se sobre-expresan los sRNAs RsmZ1, RsmZ6 y RsmY61	
Producción de alginato en las mutantes AEIV Z1:: <i>gacA</i> -, AEIV Z6:: <i>gacA</i> -, AEIV XY2.3:: <i>gacA</i> - y AEIV Y3:: <i>gacA</i> -.....	64
CONCLUSIONES .....	65

PERSPECTIVAS .....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

## ÍNDICE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo.	23
2	Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.	32
3	Pares de oligonucleótidos utilizados para verificar los sRNAs clonados en el vector pUMAg $yrAKm$ y recombinantes en <i>A. vinelandii</i> .	33
4	Preparación de la curva de calibración de proteína.	36
5	Preparación de la curva de calibración de alginato.	37
6	Peso de los genes estructurales de los sRNAs de la subfamilia RsmZ estudiados en este trabajo.	44

## ÍNDICE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i> .	8
2	Proceso de enquistamiento de <i>A. vinelandii</i> .	9
3	Estructura química del alginato.	10
4	Diagrama de la biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i> .	12
5	Representación esquemática del complejo de polimerización/secreción que se extiende desde la membrana interna hasta la membrana externa.	13
6	Organización de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .	14
7	Esquematación de un sistema de dos componentes.	15
8	Cuadro Modelo de la vía de transducción de señales mediado por el sistema de doble componente GacS/GacA.	18
9	Esquematación de la relación del sistema de doble componente GacS/GacA y el sistema de regulación post - transcripcional Rsm en $\gamma$ - proteobacterias.	20
10	Estructuras secundarias de los sRNAs del sistema Rsm de la subfamilia RsmZ y RsmY en <i>Azotobacter vinelandii</i> .	22
11	Fenotipo de una mutante <i>gacA</i> , y sobreexpresión de RsmZ1 independiente a GacA.	23
12	Vector integrativo pUMAK $mtac$ .	24
13	Esquematación del montaje de transferencia para Southern blot.	36
14	Escisión del casete de Km del vector pUMAK $mtac$ .	40
15	Escisión del promotor <i>tac</i> y su represor <i>laqI</i> .	41
16	Amplificado del promotor <i>gyrA</i> de <i>A. vinelandii</i> .	41
17	Verificación de la construcción del vector integrativo pUMAg $yrAKm$ -.	42
18	Inserción del casete de Km al vector integrativo pUMAg $yrAKm$ -.	43
19	Clonación del casete de Km en el vector integrativo pUMAg $yrAKm$ -.	44
20	Orientación de la inserción del casete de resistencia a Km en el vector	45

	integrativo pUMAgyrAKm.	
21	Clonación de los sRNAs de la subfamilia RsmZ en el vector integrativo pUMgyrAKm.	46
22	Esquema de la clonación del sRNA RsmY en el vector pJET1.2/blunt.	51
23	Verificación de la clonación del gen <i>rsmY</i> en el vector pJET1.2/blunt.	52
24	Verificación de las construcciones pUMAgyrAKmrsmY3 y pUMAgyrAKmrsmXY2.3, por restricción.	53
25	Análisis tipo Southern, para verificar la clonación del gen <i>rsmY</i> .	55
26	Verificación de las recombinantes AEIVZ1, AEIVZ2, AEIVZ4, AEIVZ6 y AEIVY.	59
27	Fenotipo de las recombinantes de <i>A. vinelandii</i> con la sobreexpresión de <i>rsmZ1</i> , <i>rsmZ2</i> , <i>rsmZ4</i> , <i>rsmZ6</i> y <i>rsmY</i> (Y3 y XY2.3).	59
28	Expresión de los sRNAs Rsm en condiciones favorables para la producción de alginato.	60
29	Producción de alginato en las mutantes de cada uno de los sRNAs Rsm.	60
30	Verificación de la mutación en <i>gacA</i> en las recombinantes AEIV Z1, AEIV Z6 y AEIV Y3, XY2.3.	62
31	Fenotipo en cultivos sólido y líquido de las mutantes <i>gacA</i> en las recombinantes AEIV Z1, AEIV Z6 y AEIV Y3, XY2.3.	63
32	Producción de alginato de las mutantes AEIV Z6:: <i>gacA</i> , AEIV XY2.3:: <i>gacA</i> y AEIV Y3:: <i>gacA</i> utilizando a AEIV Z1:: <i>gacA</i> como control.	65

## INTRODUCCIÓN

### Género *Azotobacter*

El género *Azotobacter* forma un grupo de bacterias fácilmente reconocibles y ampliamente distribuidas en suelo y agua. *Azotobacter* es caracterizado morfológicamente por su gran tamaño y por la forma variable de sus células que algunas veces semejan levaduras o algas unicelulares, y fisiológicamente por su forma de vida estrictamente aerobia y su crecimiento abundante en un medio apropiado libre de nitrógeno combinado. El género comprende al menos tres especies bien definidas *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter agile*, probablemente una cuarta, *Azotobacter beijerinckii*. (Kennedy *et al.*, 2005. Bergey's Manual of Systematics Bacteriology)

### *Azotobacter vinelandii*

#### Características principales

*A. vinelandii* es una  $\gamma$ -proteobacteria, pertenece a la familia de las *Pseudomonadaceae*, es gram negativa, aerobia, pleomórfica, poliploide y fijadora de nitrógeno. Bajo ciertas condiciones el microorganismo entra en etapa de enquistamiento produciendo células metabólicamente latentes las cuales son análogas a las endosporas de *Bacillaceae* siendo más resistentes que las células vegetativas para agentes químicos y físicos deletéreos.<sup>76, 70</sup>

Además esta bacteria produce alginato, un polisacárido lineal compuesto por ácido manurónico y su epímero el ácido gulurónico y es esencial para la formación del quiste. Este polímero es excretado al medio durante la fase vegetativa, bajo estas condiciones, el alginato se ha propuesto que actúa como barrera protectora contra la difusión de oxígeno, metales pesados y confiere protección contra condiciones ambientales adversas.<sup>40, 42, 49, 51, 22, 6, 47</sup>

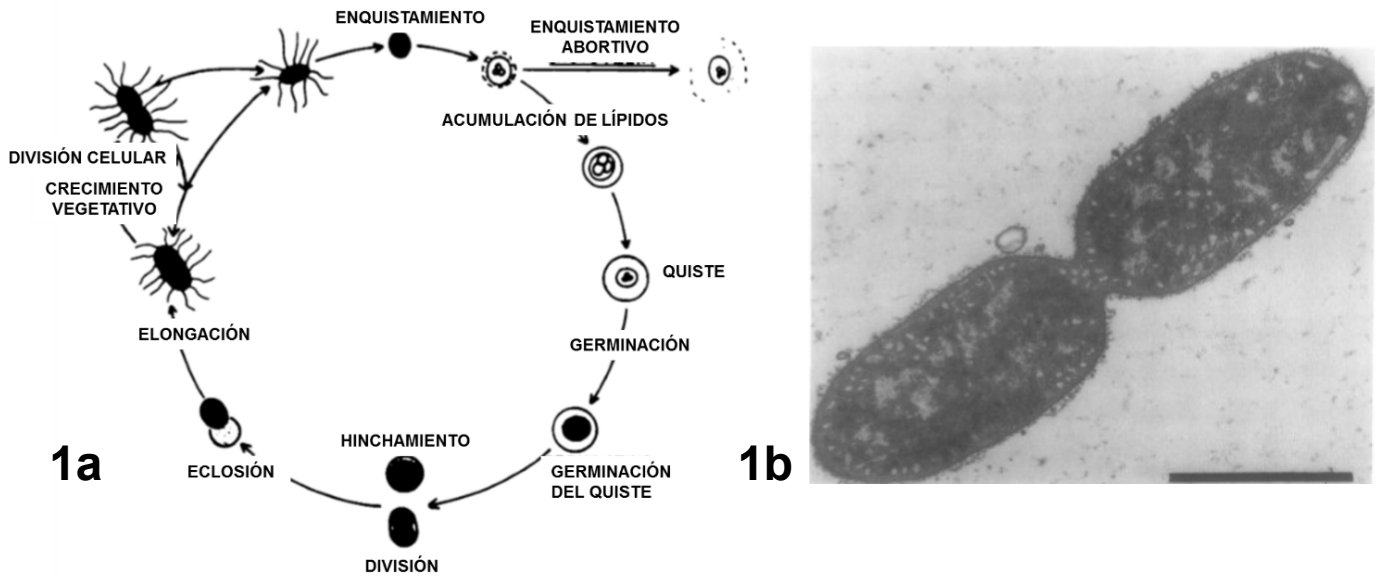
Así mismo, *A. vinelandii* tiene otra característica interesante, bajo condiciones desequilibradas de crecimiento, esta bacteria produce poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), un polímero de la familia de poliésteres polihidroxialcanoatos (PHAs), los cuales son sintetizados por una amplia gama de especies bacterianas y de arqueas para formar materiales de reserva de carbono y energía.<sup>2, 22</sup>

#### Características de crecimiento y ciclo de vida

*A. vinelandii* es un organismo aerobio obligado y crece en un tiempo de 2.5 a 3 horas en medio Burk libre de nitrógeno y adicionado con 0.2 – 1% de glucosa, puede crecer en manitol, ramnosa y otros carbohidratos así como en una gran variedad de ácidos orgánicos y algunos alcoholes, pero la cantidad de quistes usualmente son menores al 0.1% de la población celular. Dependiendo de la fuente de carbono u otras condiciones de cultivo, el PHB se puede acumular en células vegetativas y el grado de enquistamiento en aquellos cultivos está relacionado con los niveles intracelulares de PHB.<sup>70</sup>

Por otro lado, cuando las células crecen en medio Burk libre de nitrógeno conteniendo niveles subletales de n-butanol (0.2%) el crecimiento es lento pero el enquistamiento completo ocurre a las 120 horas.<sup>70</sup>

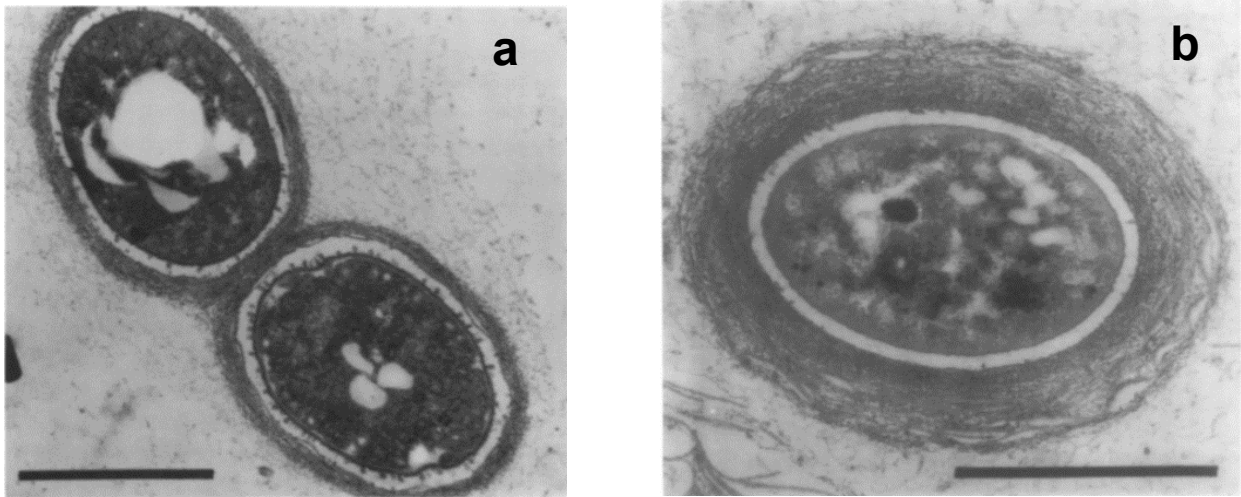
El ciclo de vida de *A. vinelandii* se ha observado mediante microscopía de luz blanca y se presenta esquemáticamente en la Fig. 1a. Las células vegetativas de estas especies son móviles por medio de flagelos peritricos, y estas células que experimentan división tienen una forma de maní típica. (Fig 1b).



**Fig. 1** Ciclo de vida de *A. vinelandii*. **a)** Diagrama esquemático del ciclo de vida de *A. vinelandii*. **b)** Célula vegetativa de *A. vinelandii* cerca de completar su división celular, la línea negra representa 1.0 µm (Sadoff et al, 1975).

Después de la inducción del enquistamiento, las células pierden movilidad, se vuelven un poco esféricas y su pared se vuelve más gruesa después de un periodo de horas y el desarrollo del quiste se vuelve ópticamente refráctil. (Fig 2a)

El proceso morfogenético produce una célula en reposo, cuyo cuerpo central es envuelto en una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina. La acumulación de lípidos en el cuerpo central consiste en PHB, culminando con la formación de un quiste maduro Fig 2b.<sup>70</sup>



**Fig. 2** Proceso de enquistamiento de *A. vinelandii*. **a)** Fase temprana del desarrollo del quiste 12 horas post-inducción. **b)** Quiste maduro de *A. vinelandii*, la línea negra representa 1.0  $\mu\text{m}$  (Sadoff *et al*, 1975).

Durante el enquistamiento, la síntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas es inducido, estos lípidos se vuelven parte de la membrana y también son componentes estructurales de la exina del quiste.<sup>65, 69</sup>

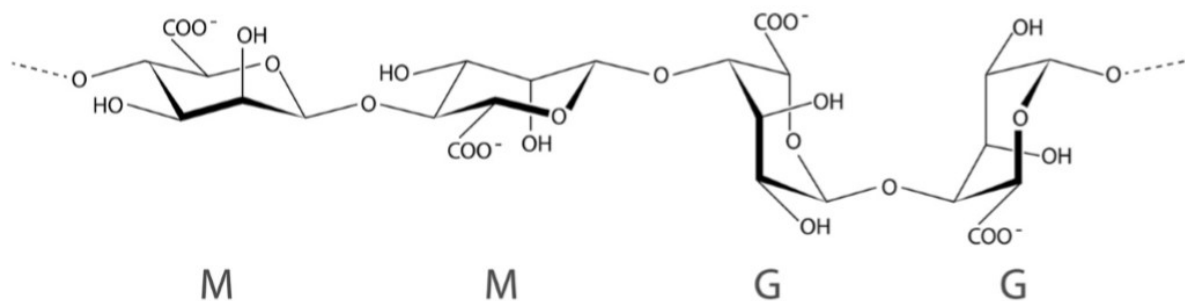
La formación del quiste requiere de la producción de alginato, y la capa extracelular es muy resistente y está formada de altas concentraciones de alginato.<sup>6, 29</sup>

La capa más externa de alginato llamada exina tiene un alto contenido de residuos de ácido gulurónico unidos constitutivamente, lo cual resulta en una estructura de alginato con mayor rigidez.<sup>29</sup>

Una vez que el ambiente es propicio para que la célula germine, toman la conformación desde bacilos hasta células en forma de cocos, y se les puede observar como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable.<sup>21</sup>

### **Alginato**

Los alginatos representan una familia de exopolisacáridos compuestos por cantidades variables de ácido  $\beta$  – D – manurónico y su epímero C5 ácido  $\alpha$  – L – gulurónico unidos por enlaces  $\beta$ 1 – 4. Estos azúcares son distribuidos en bloques continuos de ácido manurónico (M), de ácido gulurónico (G), o residuos alternos de ácido manurónico y gulurónico (MG), Fig. 3.<sup>61, 63, 64</sup>



**Fig. 3** Estructura química del alginato M = Residuos de manuronato, G = Residuos de guluronato (Hay *et al.*, 2013).

Los alginatos son sintetizados por algas café y por bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*.<sup>62, 64</sup> La distribución de los residuos como monómeros y en particular la presencia de bloques de ácido gulurónico se encontraron de manera similar en alginatos de algas y en *A. vinelandii*, mientras que los que se encontraron en *Pseudomonas* eran diferentes pues carecían de bloques de ácido gulurónico.<sup>75, 64</sup>

Estas diferencias estructurales dan lugar a diferentes propiedades del material reflejando las diferentes funciones biológicas de los alginatos. En el alga café y en los quistes de *A. vinelandii*, el alginato forma parte de la pared celular, mientras que en *Pseudomonas* contribuye a la formación de la matriz de biopelículas.<sup>37</sup>

Los alginatos forman una familia importante de biopolímeros de interés biotecnológico y científico, presentan una amplia gama de aplicaciones, actuando como estabilizante, gelificante, emulsionante, entre otros, en diferentes campos de la industria, principalmente en la alimenticia y farmacéutica.<sup>22</sup>

Se ha incrementado el descubrimiento de nuevas aplicaciones para estos polímeros, un ejemplo de ello es la utilización de este como una fuente de fibra soluble. A pesar de que los alginatos extraídos de algas son relativamente baratos, tienen diversos problemas en lo que respecta a su producción, los cuales limitan su uso en diferentes contextos de interés, especialmente en las industrias farmacéutica y química, en donde los polímeros con composición muy bien definida son requeridos. La principal problemática está dada por no poder manipular o controlar las propiedades como tal del polímero, ya que estas están dadas por las condiciones ambientales, su hábitat, la época en la que se reproducen las algas y esto define las características moleculares del mismo.<sup>22</sup>

Muchas de las características de los alginatos de las bacterias son compartidas con las de los alginatos de las algas, es por eso que ambos pueden ser utilizados para las mismas aplicaciones, así como, en contextos más sofisticados, sin embargo, a diferencia de los polímeros de las algas, en las bacterias, dichos compuestos sufren un proceso de acetilación y generalmente tienen una masa molecular mayor; esta relación (acetilación – masa molecular) afecta directamente

la viscosidad y otras propiedades reológicas de soluciones del polímero, esto determinaría su utilidad en aplicaciones específicas en el área alimenticia y farmacéutica.<sup>22</sup>

*Azotobacter vinelandii*, a diferencia de *Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria de suelo no patógena, la cual puede ser utilizada en el desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción de alginato, estas características, al igual que el interés del papel que este juega en la formación del quiste, ha motivado el estudio de varios aspectos que conciernan la producción de este polímero en *A. vinelandii*.<sup>22</sup>

### **Biosíntesis del alginato en *A. vinelandii***

El precursor intracelular activado de la biosíntesis de alginato es el ácido GDP-manurónico. Las fuentes de carbono son oxidadas a Acetil-CoA, el cual entra al ciclo de Krebs, proveyendo al intermediario oxalacetato, este es convertido por la vía de gluconeogénesis a fructosa 6-fosfato siendo este el metabolito inicial de la síntesis, este es isomerizado por la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa/guanosina difosfomanosa pirofosforilasa, (PMI-GMP o AlgA) produciendo manosa -6 -fosfato la cual es convertida a manosa -1-fosfato por la enzima fosfomanomutasa (PMM o AlgC), nuevamente la enzima PMI-GMP (AlgA) cataliza la conversión de manosa-1-fosfato a GDP manosa, posteriormente esta última es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) a ácido GDP-manurónico, esta reacción es irreversible. La polimerización del ácido GDP manurónico es llevada a cabo por la proteína Alg8, una manuronato polimerasa (MP), al igual que por la proteína Alg44, se ha propuesto que la polimerización y secreción a través de la membrana, se encuentra simultáneamente acoplada. Para producir estructuras biológicamente activas, las cadenas de polimanuronato sufren una serie de modificaciones post-polimerización llevadas a cabo por proteínas periplasmáticas. El alginato es escindido del complejo biosintético, enzimáticamente por la liasa AlgL, la cual corta el enlace glucosídico 1 - 4 por  $\beta$  -eliminación. A pesar de que AlgL se requiere para una producción normal de alginato, puede no ser esencial para la polimerización en la síntesis de este polímero. Sin embargo, se ha hipotetizado sobre su función como una proteína que controla el tamaño del polímero, o proporcionando piezas pequeñas de alginato para preparar la reacción de polimerización.<sup>64</sup>

Este polímero es modificado por un complejo de acetilación comprendido por 4 proteínas, AlgI es una O - acetil - transferasa unida a la membrana, que transfiere un grupo acetilo de un donador de acetilos citoplasmático desconocido (Franklin et al.m 2004). AlgJ está unido a la membrana interna (Franklin & Ohman, 2002), mientras que AlgX es parte de la alginato sintasa, y el complejo de transporte, además contiene un módulo de unión a carbohidratos, y se ha demostrado ser capaz de acetilar manuronatos *in vitro* (Baker *et al.*, 2014). AlgF es necesario para la acetilación (Franklin & Ohman, 1993). Sin embargo, aún se desconoce que

función en particular tiene (Helga E. 2015). Juntos forman un complejo enzimático que cataliza la acetilación parcial de los residuos de ácidos manurónicos poliméricos, la cual ocurre ya sea en la membrana interna o en el periplasma después de la polimerización del polimanuronato y algunos de los residuos no acetilados, son epimerizados a guluronato por una manuronato epimerasa (ME o AlgG) y después son exportados a través de la membrana externa mediante la proteína formadora del poro AlgE (Fig. 4).<sup>52, 22</sup>

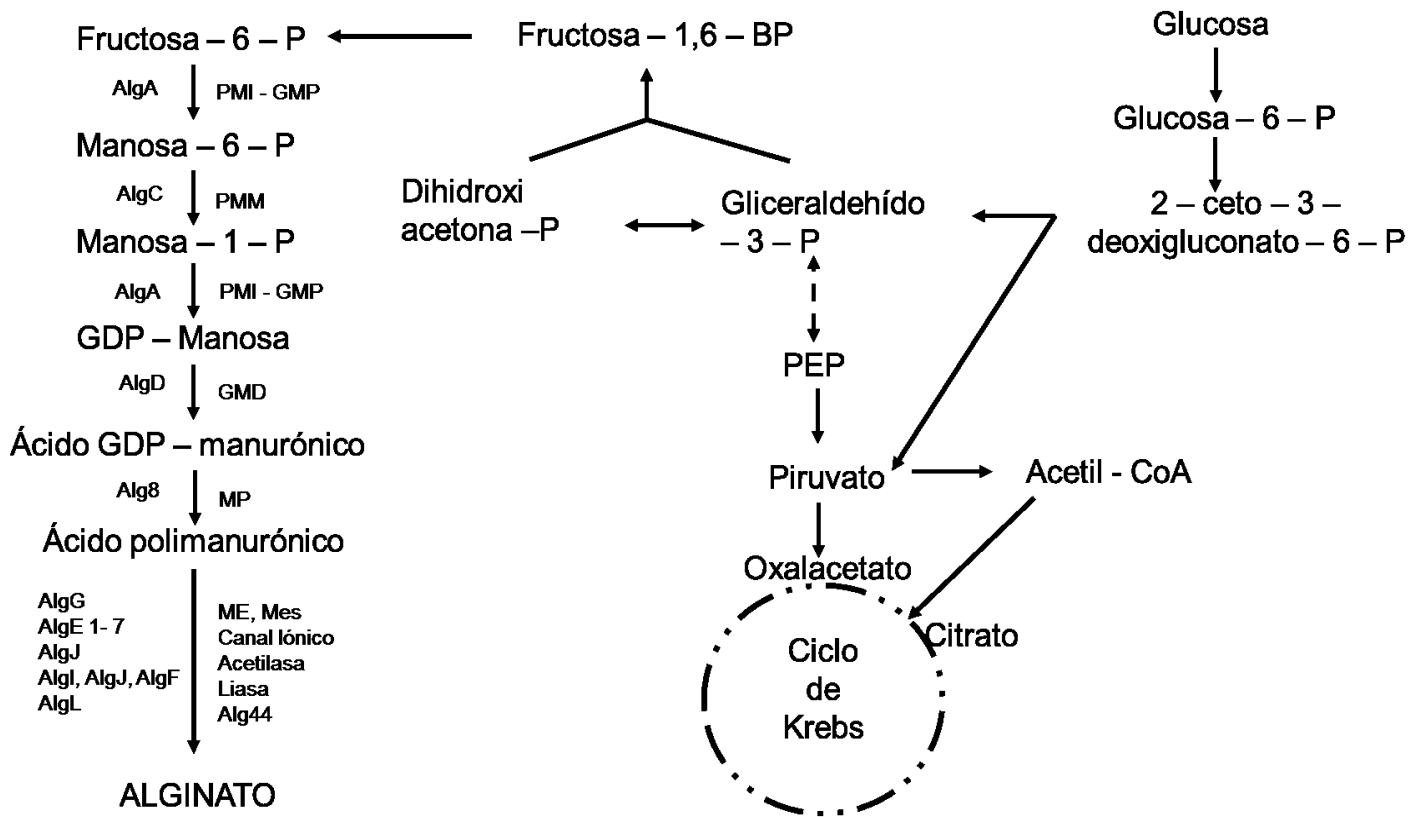
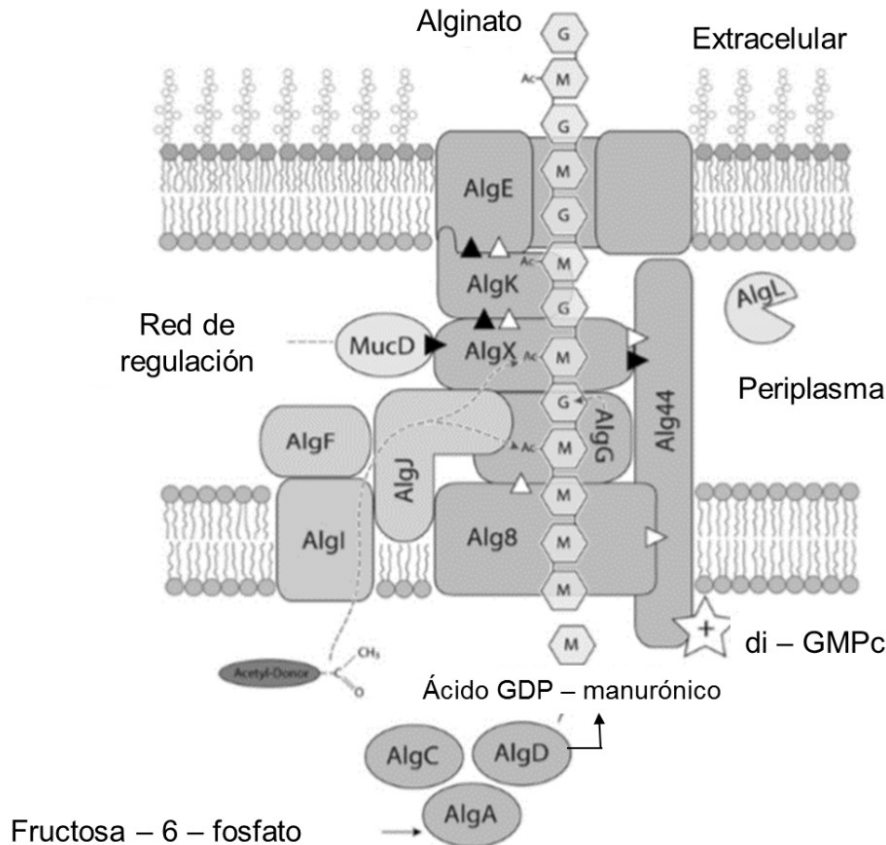


Fig. 4 Diagrama de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* (Adaptado de Galindo *et al.*, 2007).

En el caso de *A. vinelandii*, el polímero exportado es convertido a alginato como producto final por una familia de 7 epimerasas extracelulares homólogas secretadas (AlgE1-7). Estas epimerasas son esenciales para la formación de quistes maduros. Se piensa que las proteínas AlgG, AlgK, AlgX y AlgL forman un andamiaje periplásmico el cual guía al polímero a través del periplasma, para posteriormente ser secretado a través de la membrana externa (Fig. 5).<sup>22</sup>

La biosíntesis puede ser dividida en cuatro etapas: síntesis de precursores como sustrato, polimerización y transporte a través de la membrana citoplasmática,

modificación en el periplasma y por último tránsito y exportación a través de la membrana externa.<sup>52</sup>



**Fig. 5** Representación esquemática del complejo de polimerización/secreción que se extiende desde la membrana interna hasta la membrana externa. La acetilación por AlgI, AlgJ (AlgV), AlgF, AlgX y la epimerización por AlgG se demuestran mediante líneas discontinuas. Las interacciones se representan mediante triángulos, los de blanco indican una estabilidad mutua, y los triángulos negros representan interacciones directas (Adaptado de Hay *et al.*, 2013).

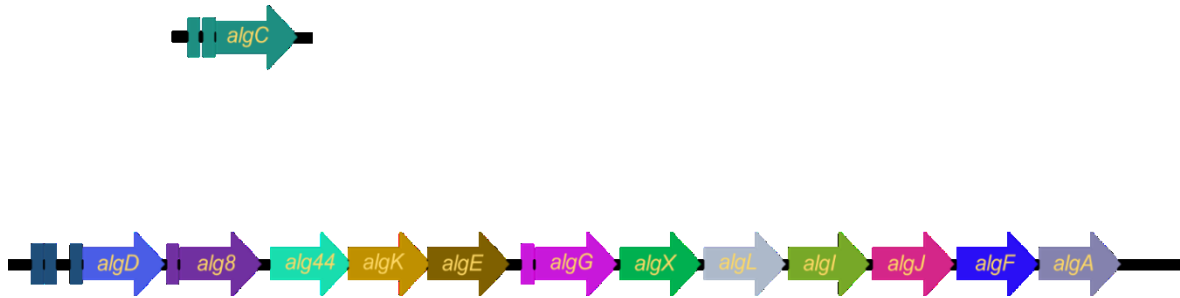
### Genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*

Los genes involucrados en la biosíntesis de alginato son prácticamente idénticos entre *Pseudomonas* y *Azotobacter* aunque difieren en su organización transcripcional, su regulación y función.<sup>28, 52</sup>

Todos los genes centrales involucrados en la biosíntesis de alginato, excepto uno, se encuentran en un único operón de 12 genes descrito inicialmente por Chitnis y Ohman (1993): *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE* (*algJ*), *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ* (*algV*), *algF* y *algA* (los nombres de los genes de *Pseudomonas* se muestran con los genes correspondientes a *Azotobacter* en paréntesis).<sup>13, 28</sup>

El clúster de genes de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* está organizado por lo menos en cuatro unidades transcripcionales *PalgD*, *Palg8-algK*, *PalgG-X-L-V-I-F-A* y *PalgA*. (Fig. 6) Los genes están bajo el control de un promotor río arriba del gen *algD*, a pesar de que existe alguna evidencia que sugiere que hay promotores internos alternativos en el operón.<sup>73, 74, 45, 55</sup>

El gen *algC* no se localiza dentro de este operón y también está involucrado en la biosíntesis de ramnolípidos y lipopolisacáridos.<sup>27, 86, 54, 28</sup>



**Fig. 6** Organización de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* (Adaptado de Galindo *et al.*, 2007).

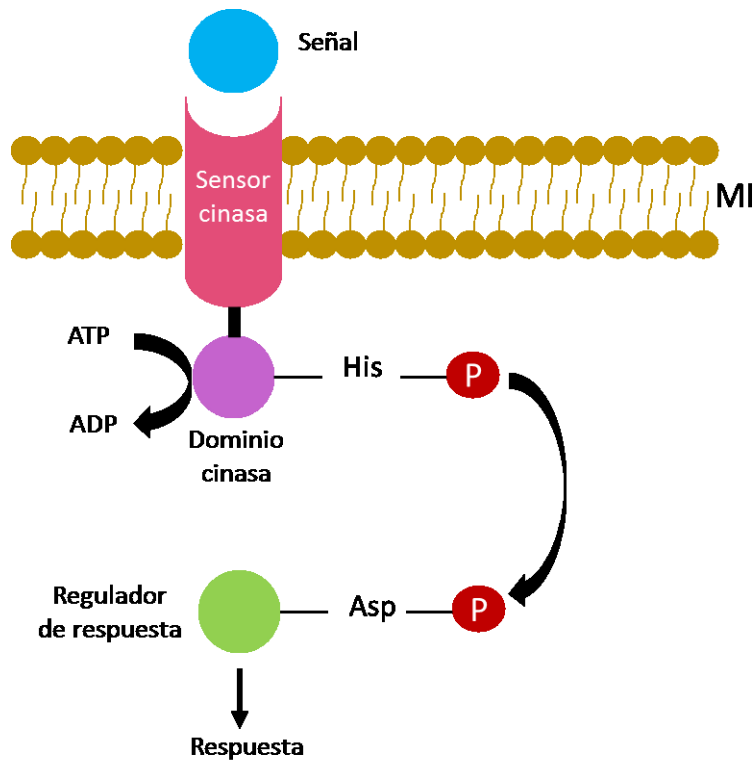
### **Sistema de doble componente**

Los sistemas de dos componentes están ampliamente distribuidos en bacterias y en algunos eucariotas, este sistema ayuda a los organismos a adaptarse a diferentes condiciones y a colonizar nichos ecológicos específicos en respuesta a señales ambientales, y traducir la información a factores transcripcionales, los cuales a su vez pueden activar la expresión de uno o más genes que permiten que la bacteria se adapte rápidamente a las condiciones ambientales.<sup>30, 12</sup>

La transducción de señales de dos componentes forma la maquinaria central de señalización en bacterias, en respuesta a estímulos, mayormente a nivel extracelular. Las señales pueden ser abióticas como el pH, la temperatura u osmolaridad, o bióticas; algunas señales se producen por el huésped, otras son sintetizadas por la misma densidad poblacional bacteriana, a esta última se le conoce como quorum sensing.<sup>38, 30</sup>

El sistema de dos componentes está comprendido por una cinasa detectora y un regulador de respuesta. El dominio de entrada de la cinasa detectora reconoce una señal específica del ambiente, la cual resulta en la activación del dominio cinasa y su autofosforilación en el dominio transmisor de la cinasa detectora, con un residuo de histidina conservado. El dominio de transmisor de la cinasa detectora, interactúa con el dominio receptor del regulador de respuesta, catalizando la transferencia de fosfato a un residuo de aspartato conservado en el dominio receptor. La fosforilación del regulador de respuesta, activa su dominio de

salida, resultando en cambios conformacionales en el regulador de respuesta que ayudan a mediar actividades biológicas específicas, incluyendo la unión a DNA y regulación transcripcional (Fig. 7).<sup>4</sup>



**Fig. 7** Esquematización de un sistema de dos componentes (Adaptado de Bretl *et al.*, 2011).

Las cinasa detectora y los reguladores de respuesta normalmente se identifican en sus dominios conservados y su habilidad para mediar eventos de transducción de señales mediante fosforilación. Las cinasa detectoras están comprendidos por un dominio de detección y uno o más dominios transmembranales conectados por una región de unión flexible a una región receptora citoplasmática que contiene un motivo de dimerización y un dominio cinasa. Además, el dominio cinasa puede dividirse en dos subdominios, uno que contiene el sitio más conservado de fosforilación con una histidina (caja H), y el otro que contiene cuatro regiones de aminoácidos altamente conservados (cajas N, D, F y G) que en conjunto forman un complejo de unión a ATP. Los reguladores de respuesta también están organizados en módulos discretos funcionales que incluyen un dominio receptor N – terminal que contiene un ácido aspártico altamente conservado, el cual sirve como un sitio de fosforilación y dominio de unión a DNA C–terminal.<sup>4</sup>

La iniciación de eventos de transducción de señales, entre las cinasa detectoras y los reguladores de respuesta, esta mediado por el seguimiento en el reconocimiento del estímulo ambiental de la r cinasa detectora. Cuando se establece el reconocimiento de la señal, las cinasas detectoras normalmente se dimerizan y autofosforilan *in trans* en el único residuo de histidina conservado

presente en la cinasa detectora. La transferencia de este fosfato por la cinasa detectora al residuo de ácido aspártico conservado, en el dominio receptor del regulador de respuesta afín, resulta en alteraciones en su conformación que promueve la unión a DNA y regulación transcripcional, unión a RNA, interacciones proteína – proteína u otras actividades enzimáticas. Además de servir como donantes de fosforilo, ciertas cinasas detectoras también funcionan como fosfatasas, una actividad que ayuda a regular los niveles de activación del sistema.<sup>4</sup>

Aunque muchos sistemas usan el fosforrelevo lineal de una cinasa a un regulador respuesta, algunos utilizan vías más complicadas involucrando señales ramificadas como la quimiotaxis o múltiples componentes fosforilados como la esporulación o adaptación a condiciones anaeróbicas.<sup>38</sup>

La química, de la vía de transducción de señales de un sistema de dos componentes básica, involucra tres reacciones de fosfotransferencia y dos fosfoproteínas como intermediarios.

- Autofosforilación:  $\text{HK} - \text{His} + \text{ATP} \rightarrow \text{HK} - \text{His} \sim\text{P} + \text{ADP}$
- Fosfotransferencia:  $\text{HK} - \text{His} \sim\text{P} + \text{RR} - \text{Asp} \rightarrow \text{HK} - \text{His} + \text{RR} - \text{Asp} \sim\text{P}$
- Segunda fosforilación:  $\text{RR} - \text{Asp} \sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RR} - \text{Asp} \sim\text{Pi}$

El grupo Pi – fosforil en el ATP es el primero en transferirse a la histidina conservada de la cadena lateral de la histidina cinasa. Posteriormente el regulador de respuesta cataliza la transferencia de este grupo fosforil del residuo de histidina a un residuo conservado de ácido aspártico en la cadena lateral en su propio dominio regulador. Finalmente, el grupo fosforilo se transfiere del residuo de ácido aspártico al agua en una reacción de hidrólisis. Las tres reacciones requieren iones metálicos divalentes,  $\text{Mg}^{2+}$  siendo el catión más relevante in vivo.<sup>77</sup>

### **El sistema de doble componente GacS/GacA.**

La cinasa GacS llamado inicialmente LemA, fue descrita por primera vez en *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* cepa B728a como un factor esencial para la manifestación de lesión por esta cepa patogénica en hojas del frijol.<sup>30</sup> El regulador de respuesta GacA se describió por primera vez en la cepa biocontrol CHA0 de *Pseudomonas fluorescens* como un activador global de la producción de antibióticos y cianuro. En esta cepa se requiere a GacA para actividad antifúngica. GacS y GacA han sido caracterizados en una gran variedad de bacterias gram negativas.<sup>30</sup> Evidencia de que GacS y GacA son compañeros en un sistema de dos componentes se obtuvo genéticamente en *P. syringae* pv. *syringae* y después se confirmó en otras bacterias y la confirmación bioquímica de que GacA es el regulador de respuesta afín a la cinasa GacS, se demostró con una

fosfotransferencia *in vitro* de BarA homólogo a GacS a UvrY homólogo de GacA en *Escherichia coli* K – 12.<sup>57, 30</sup>

Se ha encontrado que este sistema controla una serie de fenotipos, incluyendo patogenicidad, capacidad para promover el crecimiento vegetal, supervivencia, producción de metabolitos secundarios como antibióticos, señales de quorum sensing y toxinas, movilidad, formación de biopelículas, sistemas de secreción, polisacáridos extracelulares, proteínas secretadas y enzimas.<sup>12</sup>

### **Características estructurales esenciales del sistema GacS/GacA**

GacS pertenece a una clase de cinasas histidínicas no ortodoxas, la cual tiene un transmisor de fosfato, un receptor y un dominio de salida de fosfotransferencia de histidina (Hpt).<sup>59, 30</sup> Basado en similitud de secuencias, muchos dominios funcionales se pueden postular en GacS (Fig. 8) En la parte del extremo N-terminal, el dominio sensor, existen dos segmentos transmembranales potenciales separados por un asa periplásmica, la cual es una característica común de muchos sistemas de dos componentes cinasa histidínica. Adyacente al segundo dominio transmembranal, se encuentran dos secuencias anfipáticas en el dominio de unión de GacS. Estas secuencias se propone que interactúan una con otra cuando una señal ambiental desencadena la activación de la proteína induciendo un cambio conformacional en el extremo C-terminal citoplasmático, favoreciendo además la autofosforilación.<sup>67, 84</sup> Justo a esta región de unión anfipática se encuentra el primer dominio transmisor, con un residuo conservado de histidina autofosforilable. (H1), en este dominio se alternan  $\beta$  – plegadas y  $\alpha$  – hélices, las cuales son muy importantes para la dimerización de las sensor cinasas. Después del evento de autofosforilación, el grupo fosfato se transfiere a un residuo de aspartato (D) del primer dominio receptor en GacS y subsecuentemente al residuo de histidina (H2), perteneciendo al dominio carboxilo – terminal Hpt en GacS, este dominio actúa como un segundo transmisor, que transfiere el grupo fosfato a un aspartato conservado del regulador de respuesta GacA. La defosforilación y por consiguiente la inactivación del sistema GacS/GacA puede estar acompañado de manera similar pero en el aspecto contrario, terminando con la liberación de fosfato inorgánico en el citoplasma, como se ha visto en ArcB.<sup>24, 25</sup> La fosforilación provoca dimerización de FixJ de *Sinorhizobium meliloti*, un regulador de respuesta relacionado a GacA y su dimerización se requiere para una mayor afinidad de unión del regulador de respuesta con el DNA blanco.<sup>16</sup> Así ambos componentes del sistema GacS/GacA deben activarse como dímeros. GacA, como cualquier otro regulador de respuesta contiene un motivo hélice – vuelta – hélice involucrado con la unión a DNA.<sup>30</sup>

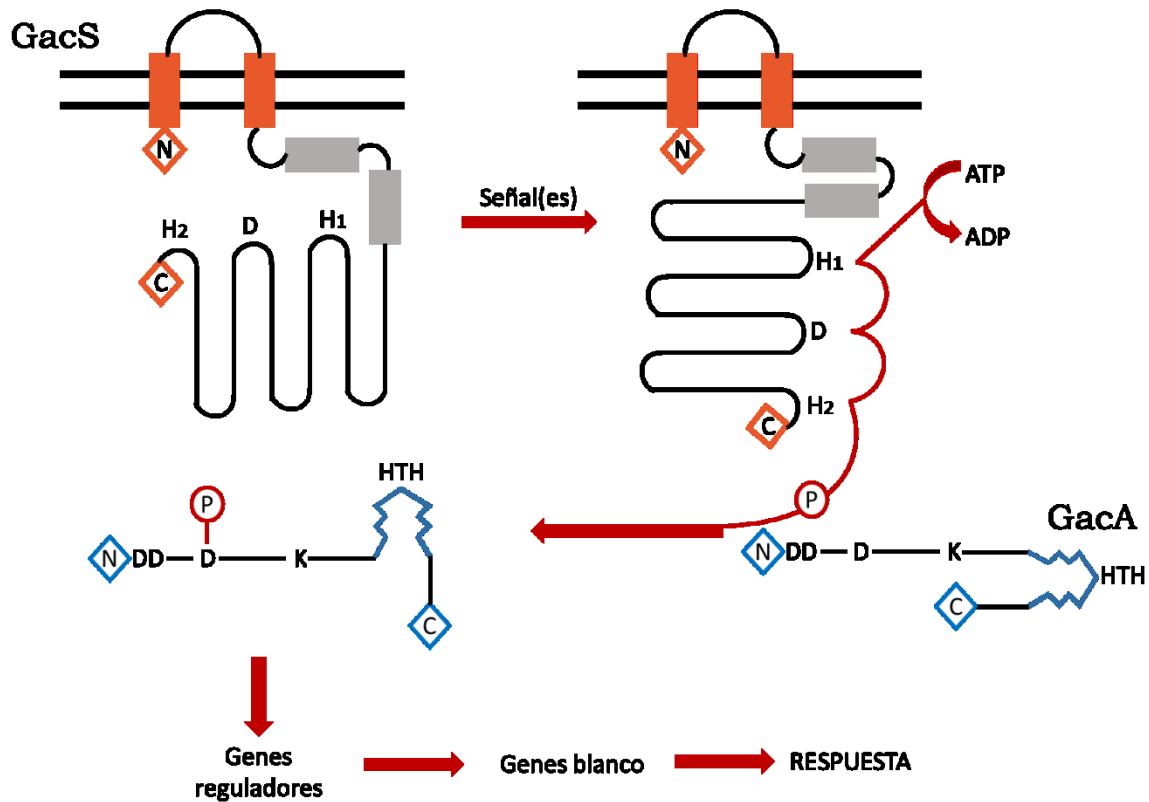


Fig. 8 Cuadro Modelo de la vía de transducción de señales mediado por el sistema de doble componente GacS/GacA (Adaptado de Heeb & Hass, 2001).

### Sistema de regulación post-transcripcional Csr /Rsm

La regulación post-transcripcional desempeña un papel importante en la coordinación de las redes de expresión génica. Predominan dos tipos de sistemas post-transcripcionales en las  $\gamma$  – proteobacterias; RNAs que actúan en *trans* que utilizan a la proteína chaperona Hfq, para aparearse con los RNAs blanco y a través de la reclusión de la RNAsaE por Hfq, ellos pueden seleccionar al RNAm para su degradación, y otro grupo importante son los pequeños RNAs no codificantes (sRNAs) que no actúan directamente con los RNAsm blanco pero funcionan secuestrando a la proteína represora (CsrA/RsmA), la cual altera la traducción y/o estabilidad del RNAm blanco, así los sRNAs no codificantes dejan libre el sitio de unión a ribosoma de los RNAs mensajeros, activando el inicio de la traducción, a estos sistemas se les conoce como Csr (carbon storage regulator) o Rsm (repressor of stationary – phase metabolites).<sup>68, 19</sup>

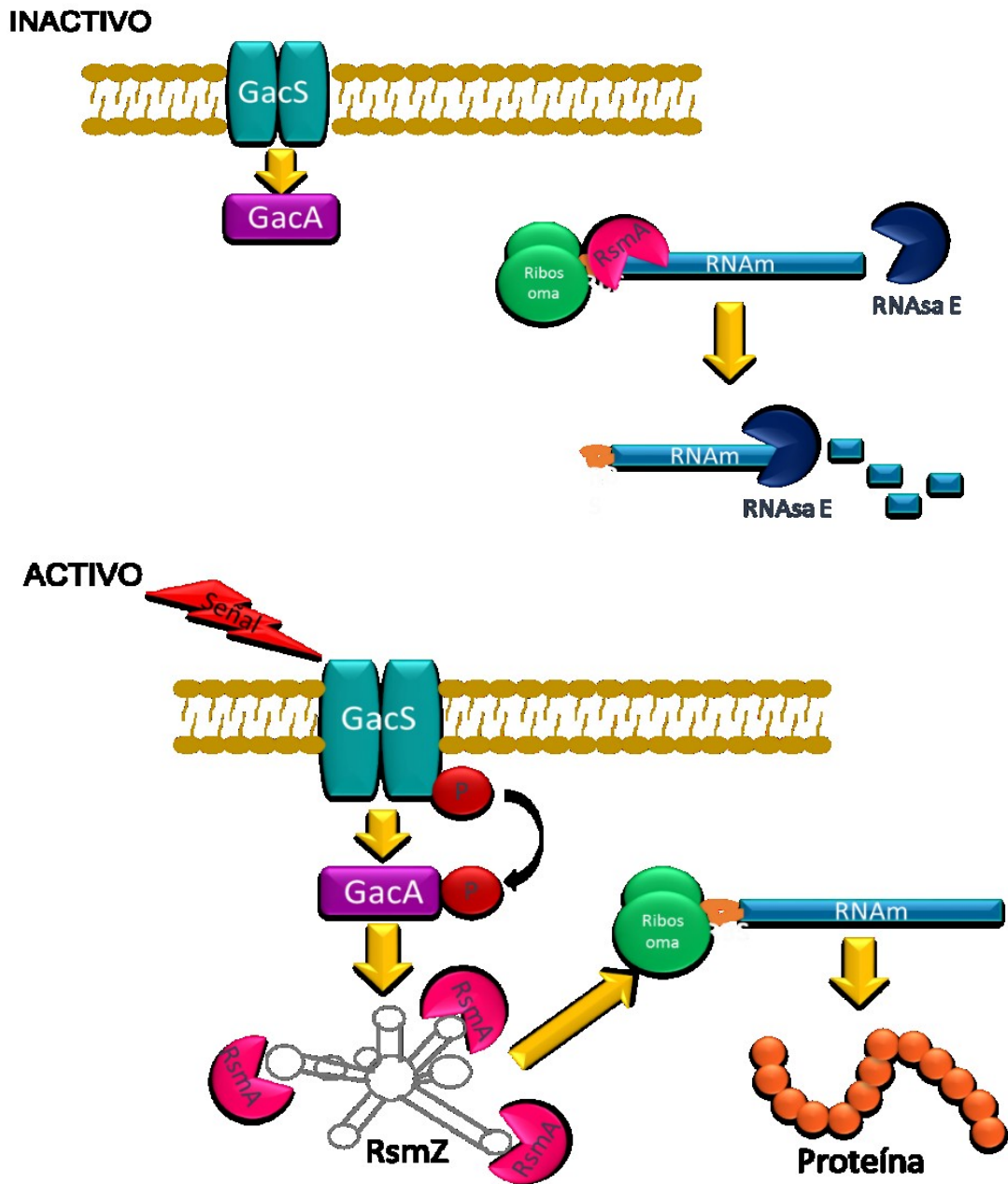
CsrA/RsmA es un regulador post-transcripcional, que se une a sus RNAm blanco y regulan su estabilidad y traducción. Esta proteína actúa de manera negativa en la mayoría de los casos, llevando a la degradación de los transcritos. CsrA es regulado a nivel post-transcripcional por dos sRNAs llamados CsrB y CsrC en *E. coli*. Estos pequeños RNAs se componen por múltiples sitios de unión a CsrA, los cuales atrapan a la proteína inhibiendo su actividad.<sup>80</sup> CsrA es un regulador global,

que regula muchas vías, como metabolismo central del carbono, movilidad y formación de biofilm, virulencia y patogénesis, quorum sensing y respuesta a estrés oxidativo, aunque existen diferencias pequeñas dependiendo de las especies bacterianas estudiadas. Muchos homólogos han sido identificados en otras especies bacterianas, en especies relacionadas como *Erwinia carotovora* y *P. aeruginosa*, CsrA es llamada RsmA o RsmE, *P. fluorescens* tiene dos homólogos de CsrA (RsmA y RsmE), en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* se han identificado cuatro homólogos a CsrA, en el caso de *P. fluorescens*, los autores proponen que ellos deben tener funciones redundantes.<sup>80</sup> El sistema Rsm está compuesto a su vez por dos o más sRNAs que gracias a su estructura secundaria de tallo y asa en donde tienen motivos de unión a la proteína RsmA, interactúan con esta secuestrándola y contrarrestando su actividad represora.<sup>39</sup>

### **Transducción de señales por la vía Gac/Rsm**

Lapouge y colaboradores en el 2008 propusieron que el sistema Gac y Rsm forman parte de una vía de transducción de señales en  $\gamma$ -proteobacterias. Evidencia experimental ha demostrado que el sistema de doble componente GacS/GacA controla positivamente la transcripción de genes de sRNAs pertenecientes al sistema Rsm en muchas especies bacterianas. Presuntamente GacA se une directamente a una secuencia llamada caja GacA (TGTAAGNNATNNCTTACA), presente río arriba de los sRNAs homólogos al sistema Rsm.<sup>39, 47, 33, 36</sup> Una de las evidencias experimentales que soporta lo anteriormente dicho es que la sobreexpresión de RsmZ o PrrB en plásmidos multicopia pueden suprimir las mutaciones en *gacS* o *gacA* en ambas cepas.<sup>1, 31, 81</sup> Una vía de transducción de señales similar ocurre en *Erwinia carotovora*, donde el sistema GacS/GacA promueve la expresión del gen *rsmB*, el cual codifica para un pequeño RNA que interactúa con la regulación mediada por RsmA de muchos RNAm blanco.<sup>44, 15, 11, 81</sup> Igualmente en *E. coli* el sistema GacS (BarA)/GacA (UvrY) controla positivamente los niveles de los sRNAs CsrC y CsrB, este último forma un complejo con la proteína CsrA (RsmA) formando una ribonucleoproteína, reduciendo así las cantidades de CsrA, evitando así la degradación de RNAm blanco.<sup>43, 78, 58, 82</sup> De manera general el sistema GacS/GacA actúa en conjunto con el sistema de regulación post – transcripcional Rsm.

GacS recibe la señal del ambiente se fosforila y fosforila a su vez a su regulador de respuesta GacA, este ahora activa y regula la transcripción de los pequeños RNAs reguladores (RsmZ, RsmX, RsmY) que mediante los motivos de unión a RsmA la secuestran y permiten que los RNAs mensajero blanco se traduzcan satisfactoriamente (Fig. 9).<sup>47</sup>



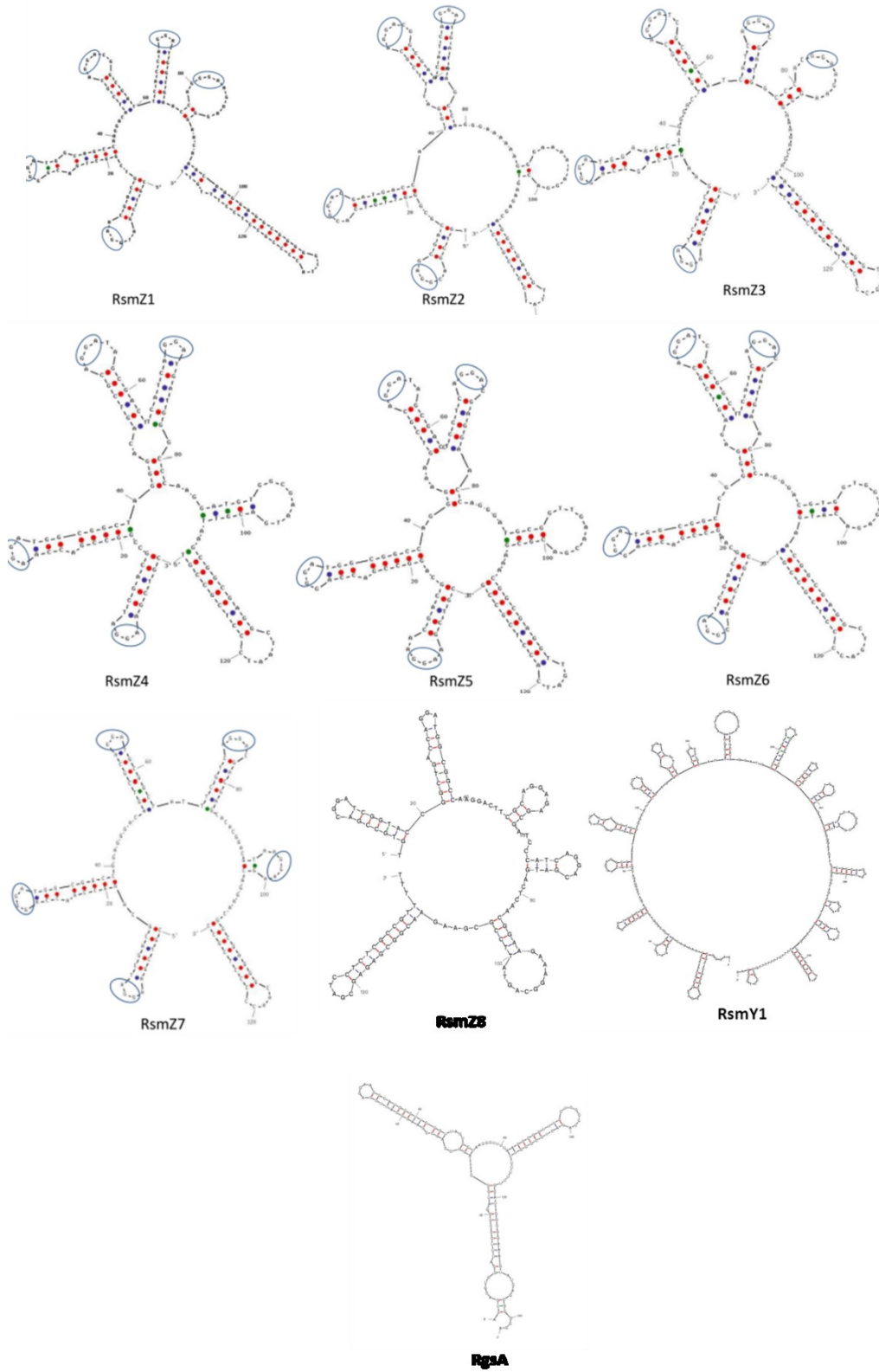
**Fig. 9** Esquematización de la relación del sistema de doble componente GacS/GacA y el sistema de regulación post – transcripcional Rsm en  $\gamma$  – proteobacterias.

## **El Sistema de transducción de señales Gac/Rsm en *A. vinelandii* y su relación con la producción de alginato**

La cinasa histidínica GacS controla la producción de alginato en *A. vinelandii*. Se ha visto que en mutantes *gacS* y *gacA* la transcripción del gen *algD* se reduce significativamente durante la fase exponencial y se suprime por completo en la fase estacionaria.<sup>7, 8</sup> En el 2011, Manzo y colaboradores, llevaron a cabo la búsqueda de genes homólogos de *rsmZ* y *rsmA* en la secuencia del genoma de la cepa DJ de *A. vinelandii*, utilizando como referencia el gen *rsmZ* de *P. fluorescens* debido a la cercanía filogenética con *Azotobacter*.<sup>72, 47</sup> Esto permitió identificar siete sRNAs homólogos de la subfamilia RsmZ (RsmZ1–RsmZ7) y dos de la subfamilia RsmY (RsmY1, RsmY2). Sin embargo, Terán – Melo (2011), por medio de un análisis de hibridación tipo de *Northern blot* reveló que *rsmY1* y *rsmY2* constituían un solo gen de mayor tamaño a los sRNAs de la subfamilia RsmZ. Posteriormente, Hernández–Eligio y colaboradores en 2012, examinaron la secuencia de *rsmY1* y *rsmY2*, y no encontraron ninguna secuencia consenso del promotor en la región intergénica de 89 nucleótidos entre los dos genes, y mediante el aislamiento de RNA con un primer del extremo 3' de *rsmY2* se obtuvo cDNA, este se amplificó con primers del extremo 5' de *rsmY1* y el extremo 3' de *rsmY2* dando como resultado un fragmento de alrededor de 300 pb, confirmando así que es un único gen de la subfamilia RsmY.<sup>79, 32</sup> Finalmente se identificó un sRNA más de la subfamilia RsmZ llamado RsmZ8 que cumple con los mismos criterios de estructura y secuencia [López–Pliego 2014 datos no publicados]. Estructuralmente, estos sRNAs tienen forma de tallo y asa con motivos GGA en las aspas, lo cual les confiere su funcionalidad (Fig. 10).

Con la misma búsqueda de genes homólogos de este sistema, se identificó únicamente un gen homólogo a *rsmA*, y mediante hibridación tipo Southern blot solamente se detectó un fragmento de DNA usando como sonda el gen *rsmA* de *P. aeruginosa*. La secuencia de la caja de pegado a GacA, TGTAAG-N6-CTTACA, está presente en las regiones promotoras de todos los genes de los sRNA Rsm, y la transcripción de *rsmZ1* y *rsmZ2* es dependiente de GacA. Además, se ha demostrado que el sistema Gac/Rsm controla la expresión del gen *algD*, la enzima clave en la síntesis de alginato en la cepa AEIV de *A. vinelandii*, igualmente se ha demostrado que la proteína RsmA se une a la región no traducible 5' del RNAm de *algD*, actuando así como un represor de la traducción y también se une a los sRNAs RsmZ1 y RsmZ2.<sup>47</sup> Teniendo conocimiento de la relación que existe entre el sistema Gac/Rsm y la transcripción del gen *algD*, se determinó la participación que tienen RsmZ1 y RsmZ2 en la producción de alginato, en donde se observó que mutantes en ambos sRNAs, disminuyó hasta en un 80% la producción de alginato, igualmente en una mutante doble, descendió la producción aproximadamente en el mismo porcentaje, por lo que se puede hablar de una actividad redundante para ambos sRNAs.<sup>47</sup>

También se demostró que la producción de alginato puede restablecerse en una mutante *gacA* a través de la expresión constitutiva de *rsmZ1* no dependiente de



**Fig. 10** Estructuras secundarias de los sRNAs del sistema Rsm de la subfamilia RsmZ y RsmY en *Azotobacter vinelandii* arrojados por el programa de predicción de estructura secundaria de RNA MFOLD (isidro – Coxca, 2015).

GacA, lo cual se realizó usando el plásmido pJB3Tc20 donde se clonó bajo el promotor *lac* al gen *rsmZ1*.<sup>47</sup>



**Fig. 11** Lado izquierdo, fenotipo de una mutante *gacA* en *A. vinelandii*. Lado derecho, restablecimiento de la producción de alginato con expresión constitutiva de *rsmZ1* (Martínez–Ortíz V.M. , 2004)

## JUSTIFICACIÓN

En estudios anteriores se ha demostrado que de los nueve sRNAs reguladores de la familia Rsm en *Azotobacter vinelandii*, RsmZ1, está involucrado en la regulación post-transcripcional de la síntesis de alginato, sin embargo aún queda por resolver el papel que juegan los otros ocho sRNAs dentro de la regulación de la síntesis de alginato, el responder la cuestión anterior ayudaría a conocer mejor el mecanismo de regulación de la síntesis de alginato, lo cual proporcionará más herramientas para generar cepas con mejores capacidades para la producción del mismo.

## HIPÓTESIS

Los RsmZ2–Z7 y RsmY, controlados por GacA, están implicados en la regulación a nivel post-transcripcional de la síntesis de alginato en *A. vinelandii*

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar el papel de los sRNAs reguladores de la familia Rsm en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

### Objetivos particulares

- 1) Generar cepas recombinantes en las que se sobre-expresen los genes que codifican para los sRNAs Rsm de manera independiente a GacA.
- 2) Determinar el efecto de la sobreexpresión de los sRNAs Rsm sobre la producción de aginato en la mutante *gacA*.

### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Debido a la poliploidía que presenta *A. vinelandii*, la bacteria no mantiene estable DNA extracromosomal. Por lo tanto nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de generar herramientas moleculares útiles para integrar material genético en locus neutros del cromosoma de la bacteria. De esta manera se generaron la familia de vectores integrativos pUMA. Uno de los vectores integrativos que ya se tienen es el pUMAKmtac (Fig. 12) el cual tiene como locus neutro de recombinación al gen *melA*, este gen es monocistrónico y codifica para una  $\alpha$ -galactosidasa, tiene además un promotor inducible *tac* junto con su represor *laqI* y se induce por medio de la adición de IPTG.

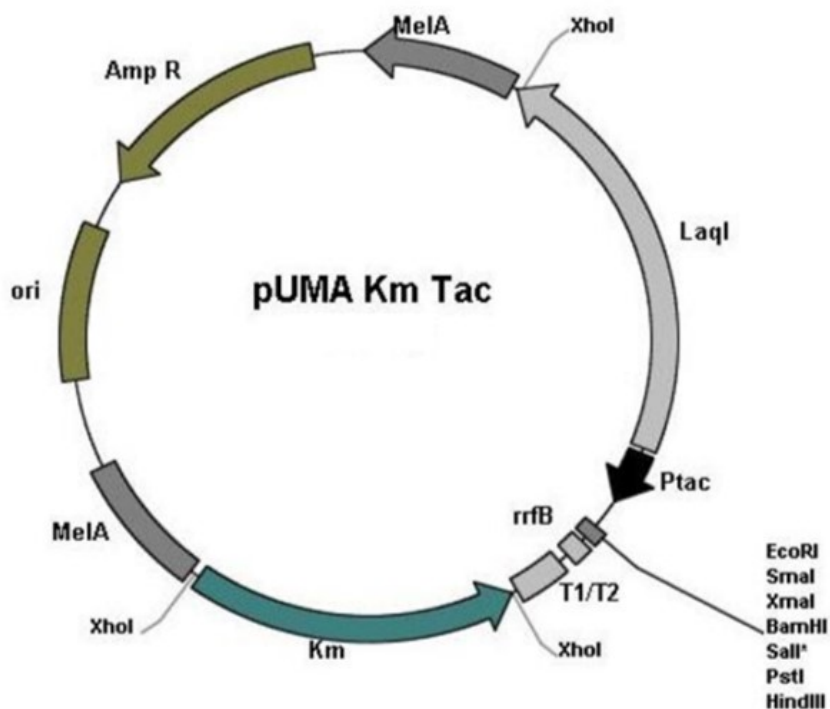


Fig. 12 Vector integrativo pUMAKmtac

Isidro Coxca (2015), utilizó este sistema para sobreexpresar a cada pequeño RNA de la familia Rsm en *A. vinelandii*, sin embargo cuando se estableció el efecto de la expresión de *rsmZ1* en una mutante *gacA*, no se restauró la síntesis de alginatos, lo cual se podría explicar por una actividad baja del promotor *tac*. Para verificar la hipótesis anterior se monitoreó al promotor *tac* con el gen reportero *gusA*, y efectivamente la expresión fue baja lo cual sugería que la expresión de *rsmZ1* no era suficiente para contrarrestar el efecto de RsmA. Con este antecedente se decidió idear una estrategia diferente, modificando el vector pUMAKmtac. Intercambiando al promotor *tac* por un promotor constitutivo *gyrA* nativo de *A. vinelandii*. Este promotor ya se ha probado anteriormente en *A. vinelandii* donde se han cointegrado plásmidos, mediante recombinación sencilla, que contienen genes bajo el control del promotor *gyrA*. Una vez generado el pUMAgyrAKm se usaría para clonar los sRNAs Rsm e integrarlos al cromosoma de la mutante *gacA* determinando el efecto de la sobre-expresión de los sRNAs en la síntesis de alginatos en ausencia de GacA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cepas y plásmidos

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

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo.

<b>CEPA <i>A. vinelandii</i></b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>REFERENCIA</b>
AEIV	Cepa silvestre resistente a ácido nalidíxico, también llamada cepa E	Larsen and Houg (1971)
AEIV <i>gacA</i>	Derivada de la cepa E con una mutación por inserción con un casete de Gm en el gen <i>gacA</i> .	Verónica Martínez V.M., (2004).
AEIV Z1.2	Cepa derivada de la E a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ1</i> .	Este trabajo
AEIV Z2.2	Cepa derivada de la E a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ2</i> .	Este trabajo
AEIV Z4.1	Cepa derivada de la E a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ4</i> .	Este trabajo
AEIV Z6.3	Cepa derivada de la E a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ6</i> .	Este trabajo

AEIV Y3	Cepa derivada de la E a la que se le integró la construcción pUMAg <sub>yrAK</sub> rsmY3.	Este trabajo
AEIV XY2.3	Cepa derivada de la E a la que se le integró la construcción pUMAg <sub>yrAK</sub> rsmXY2.3.	Este trabajo
AEIV Z1.2::gacA-	Cepa derivada de AEIV Z1.2 con la mutación en gacA.	Este trabajo
AEIV Z6.3::gacA-	Cepa derivada de AEIV Z6.3 con la mutación en gacA.	Este trabajo
AEIV Y3::gacA-	Cepa derivada de AEIV Y3 con la mutación en gacA.	Este trabajo
AEIV XY2.3::gacA-	Cepa derivada de AEIV XY2.3 con la mutación en gacA.	Este trabajo
<b>CEPA <i>Escherichia coli</i></b>		
E. coli DH5 $\alpha$	SupE44, lacU169, hsdR17, resA1, endA1, gyrA96, thi-1, rel1.	Gibco BRL
<b>PLÁSMIDOS</b>		
pBSL99	Plásmido que contiene casete de resistencia a kanamicina.	Alexeyev et al (1995)
pGEM T- Easy	Vector de clonación, lacZ resistente a ampicilina.	Promega®
pGEMrsmZ1	Vector de clonación, lacZ resistente a ampicilina, tiene clonado el gen rsmZ1.	Goiz Y. (2008).
pGEMrsmZ2	Vector de clonación, lacZ resistente a ampicilina, tiene clonado el gen rsmZ2.	Manzo J., (2008)
pGEMrsmZ4	Vector de clonación, lacZ resistente a ampicilina, tiene clonado el gen rsmZ4.	Domínguez P., (2011)
pGEMrsmZ5	Vector de clonación, lacZ resistente a ampicilina, tiene clonado el gen rsmZ5.	Domínguez P., (2011)

pGEMrsmZ6	Vector de clonación, <i>lacZ</i> resistente a ampicilina, tiene clonado el gen <i>rsmZ6</i> .	García L. (2011)
pJET1.2/Blunt	Vector de clonación resistente a ampicilina que contiene el sitio de multiclonación, así como un promotor T7 para la transcripción <i>in vitro</i> .	Thermo Scientific.®
pJET- <i>rsmY</i>	Vector de clonación derivado del pJET1.2/blunt que contiene clonado al sRNA RsmY.	Este trabajo.
pUMAKmtac	Vector integrativo Construido a partir del pUC19, donde clonó el gen <i>mela</i> de <i>A. vinelandii</i> , mediante un sitio <i>XhoI</i> nativo del gen <i>mela</i> se introdujo el <i>ptac</i> , <i>laqI</i> , el sitio de multiclonación y los terminadores provenientes del vector pYanni2. También se le incorporó un casete de resistencia a Km.	Morales E., (2013)
pUMAgyrAKm	Vector integrativo derivado del pUMAtacKm, donde se intercambió el promotor inducible <i>tac -laqI</i> , por el promotor constitutivo <i>gyrA</i> .	Este trabajo.
pUMAgyrAKmrsmZ1	Vector integrativo derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ1.	Este trabajo.
pUMAgyrAKmrsmZ2	Vector integrativo derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ2.	Este trabajo.
pUMAgyrAKmrsmZ4	Vector integrativo derivado del	Este trabajo.

	pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ4.	
pUMAgyrAKmrsmZ5	Vector derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ5.	Este trabajo.
pUMAgyrAKmrsmZ6	Vector derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ6.	Este trabajo.
pUMAgyrAKmrsmY3	Vector derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmY.(con orientación 5' → 3')	Este trabajo.
pUMAgyrAKmrsmXY2.3	Vector derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmXY2.3.(con orientación 3' → 5')	Este trabajo
pSAFA3	Plásmido con una mutación por inserción del casete de gentamicina en el gen <i>gacA</i> .	Castañeda et al; 2001.

### **Medios de cultivo**

#### *Luria Bertani (LB)*

Este medio de cultivo es empleado para *Escherichia coli*, y contiene peptona de caseína en una concentración de 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L.

#### *Burk – Sacarosa (BS)*

Este medio de cultivo se utiliza para el crecimiento de *Azotobacter vinelandii*, y contiene sacarosa 2% (40 g/L de medio), solución de buffer fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L), de la cual se agrega el 10% del volumen final al que se quiere el medio de cultivo, de las siguientes soluciones se agrega el 1% del volumen final al medio de cultivo, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 g/L y CaCl<sub>2</sub> 7.3 g/L, y finalmente se agrega el 0.00001% de las siguientes soluciones, FeSO<sub>4</sub> 5 g/L, MgCl<sub>2</sub> 160 g/L y NaMoO<sub>4</sub> 0.2 g/L. Todo esto se agrega al 80% de agua destilada del volumen final que se requiera o necesite con agar bacteriológico con una concentración de 15 g/L, previamente esterilizado.

### *Medio de competencia CM*

El medio CM se ocupa para obtener, como su nombre lo dice células competentes de *Azotobacter vinelandii*, puesto que son competentes naturales, al estresarlas con la privación de algunos nutrientes en el medio. Su reparación es muy similar al medio BS, solo que este no contiene ni FeSO<sub>4</sub>, ni NaMoO<sub>4</sub>.

### *Medio SOC*

Este medio de cultivo se utiliza para la recuperación de células después de la electroporación y obtener mayor eficiencia en la transformación, peptona de caseína 20g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 0.5 g/L y 950 ml de agua destilada, esto se mezcla y se adicionan 10 ml de KCl 250 mM, se ajusta el pH a 7 con NaOH 5N y se ajusta a un volumen de 1L, esterilizar y posteriormente se adicionan 5 ml de MgCl<sub>2</sub> 2M y se adicionan 20 ml de glucosa 1M a la solución anterior, finalmente se esteriliza.

### Técnicas

#### *Extracción plasmídica por lisis alcalina*

Esta se obtiene a partir de un cultivo de 5 ml de *E. coli* en LB incubado previamente a 37°C durante 12 hrs, posteriormente centrifugar las células a 6000 rpm durante 3 minutos, y se lavan con una solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pasar a tubos eppendorf de 1.5 ml y el paquete celular se resuspende en 150 µl e la solución I, la cual está compuesta por glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris – HCl 25 mM a pH 8 que se mantiene a 4°C, se le agrega inmediatamente la solución II que se prepara al momento, compuesta de NaOH 2N (35 µl), SDS 10% (35 µl) y agua destilada (280 µl), mezclar suavemente y dejar reposar en hielo 10 minutos, a continuación se agrega 250 µl de la solución III que contiene acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial a un pH de 4.8 y se dejan en hielo 20 minutos, después se centrifuga por 15 minutos, el sobrenadante se recupera y se coloca en un tubo eppendorf nuevo agregar el mismo volumen de isopropanol, dejar en hielo 5 minutos para que precipite y lavar 3 veces con etanol al 70%, a 13,000 rpm durante 2 minutos, quitar todo el sobrenadante y dejar secar la pastilla a 55 °C, agregar 30 µl de RNAsa diluida (2 µl/ml de H<sub>2</sub>O), e incubar 1 hr a 37°C.

#### *Extracción plasmídica por perclorato*

Al igual que en la anterior, se obtiene a partir de un cultivo de 5 ml de *E. coli* en LB previamente incubado a 37 °C por 12 hrs, se centrifugan las células a 6000 rpm durante 3 minutos, se lava el paquete celular con MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pasar a tubos eppendorf y resuspender en 175 µl de una solución TES compuesta por Tris 1M a pH 8.5, EDTA 0.1M a pH 8 ( y sacarosa 15%, e inmediatamente se agregan 25 µl de lisozima (10 mg/ml), dejar reposar en hielo durante 20 minutos, posteriormente agregar 400 µl de agua destilada helada y poner a 73°C durante 15 minutos, a continuación dejar en hielo 5 minutos y centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos, transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y agregar 600 µl de isopropanol y 60 µl de NaClO<sub>4</sub> 5M, mezclar y dejar de 10 a 15 minutos en hielo,

centrifugar 15 minutos a 13,000 rpm, después lavar la pastilla 3 veces con etanol al 70%, retirar todo el sobrenadante y dejarla secar a 55°C, agregar 30 µl de RNAsa diluida (2 µl/ml de H<sub>2</sub>O) e incubar 1 hr a 37°C.

*Restricción con las enzimas KpnI, EcoRI, XhoI, SmaI, Sall, BamHI, BglII, PstI y HindIII.*

Todas estas enzimas pertenecen a la marca Thermo Scientific® y se hicieron con las siguientes proporciones:

- DNA – 25 µl
- Buffer 5 µl
- H<sub>2</sub>O – 20 µl
- Enzima – 0.2 µl

Dependiendo la cantidad de DNA puede agregarse 0.1 ó 0.2 µl más de enzima, y en todas se deja 2 hrs a 37°C, excepto para restricciones parciales.

#### *Purificación de banda de un gel de electroforesis*

Se deja correr en una cámara de electroforesis, las restricciones de DNA de interés en geles de agarosa al 1%, con pozos para 50 µl aproximadamente, una vez obtenido el corrimiento, se tiñe el gel con una solución diluida de Bromuro de etidio (BET), se enjuaga en agua y se pasa a un transiluminador de luz UV, cortar la banda y colocarla en un tubo eppendorf, después ponerle el triple de peso en volumen de NaI 6M y dejar a 55°C que se disuelva totalmente el gel, una vez que se disuelva colocar 10 µl de sílica y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugar 2 minutos a 13,000 rpm, tirar el sobrenadante y lavar 3 veces con la solución de New Wash que contiene 1 µl de stock 10X, 9 ml de agua destilada y 10 µl de etanol absoluto, una vez realizados los lavados, retirar todo el sobrenadante y dejar secar la pastilla a 55°C, resuspender en 12 a 15 µl de agua destilada estéril, centrifugar 3 minutos a 13,000 rpm, finalmente retirar el sobrenadante con cuidado tratando de no tomar sílica y pasarlo a un nuevo tubo eppendorf.

#### *Desfosforilación de vectores de clonación*

Se realizó con la fosfatasa alcalina de Thermo Scientific® de la siguiente manera:

- DNA – 14 µl
- Buffer de fosfatasa – 2 µl
- Fosfatasa alcalina – 1 µl
- H<sub>2</sub>O – 3 µl

Esta mezcla se deja a 37°C durante 10 minutos, posteriormente para inactivar a la enzima se coloca a 75°C durante 5 minutos.

#### *Precipitación de DNA por glucógeno*

Esta técnica se utiliza para desaparecer o remover cualquier residuo de compuestos de una restricción, desfosforilación o ligación, teniendo así un mejor

resultado en los procesos siendo estos consecutivos. La precipitación se lleva a cabo de la siguiente forma:

- Glucógeno – 1  $\mu$ l
- Isopropanol – 500  $\mu$ l

Estas dos sustancias se agregan al DNA que se quiera limpiar y precipitar, después se deja a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, y posteriormente se centrifuga 15 minutos a 13,000 rpm, la pastilla que se observa se lava 3 veces con etanol al 70%, se deja secar a  $5^{\circ}\text{C}$  y finalmente se resuspende en 10 ó 12  $\mu$ l de agua destilada estéril.

#### Reacción de *ligación*

La T4 DNA Ligasa de Promega®, se utiliza para llevar a cabo ligaciones de un inserto de DNA a un vector de clonación, y se realiza con las siguientes proporciones:

- Vector – 4  $\mu$ l
- Inserto de DNA – 2 a 14  $\mu$ l
- ATP 1:10 – 2  $\mu$ l
- Buffer de Ligasa – 2  $\mu$ l
- Ligasa – 0.5  $\mu$ l

Esta mezcla se mantiene a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche, posteriormente se precipita con glucógeno y está lista para transformar, con células electrocompetentes, o quimiocompetentes.

#### *Células competentes de Escherichia coli DH5 $\alpha$*

#### **Electrocompetentes**

Se hace un pre-inóculo en 5ml de LB líquido de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  con ácido nalidíxico (0.1 g/ml) como antibiótico, se deja crecer toda la noche (12 hrs como máximo) a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación, posteriormente se toman 2.5 ml y se pone el inóculo en 200 ml de medio LB líquido sin antibiótico y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación nuevamente, hasta que se obtenga una D.O. de 0.6 leyendo en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 600 nm, una vez que se llegue a esta D.O. se deja enfriar el medio en hielo durante 20 minutos, pasar a tubos de policarbonato, centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , resuspender la pastilla en 200 ml de agua PISA® fría, dividido entre los tubos, se centrifuga nuevamente a  $4^{\circ}\text{C}$ , se vuelve a decantar y con el glicerol remanente se hacen alícuotas en tubos eppendorf de 50  $\mu$ l cada uno y almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Competentes químicas**

Se hace un pre-inóculo en 5 ml de medio LB líquido de la cepa DH5 $\alpha$  con su antibiótico (ácido nalidíxico, 0.1 g/ml), se deja crecer toda la noche, aproximadamente 12 hrs, posteriormente inocular 1 ml del pre – inóculo por cada 100 ml de LB líquido sin antibiótico e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , hasta obtener una D.O. de 0.4 ó 0.45 aproximadamente, transferir el cultivo a tubos de polipropilenglicol previamente fríos y continuar en hielo de 10 a 15 minutos, centrifugar 10 minutos a

4000 rpm a 4°C, posteriormente decantar el sobrenadante y agregar 50 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M fría y mantener 15 minutos en hielo, centrifugar nuevamente 10 minutos a 4000 rpm a 4°C, decantar el sobrenadante, resuspender la pastilla en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M con glicerol al 14% y hacer alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf y almacenar a -70°C.

### *Electroporación*

Se toman 10 µl de la muestra que se quiere electroporar (plásmido, ligación, vector de clonación, etc.), se mezcla con 50 µl de células electrocompetentes y se colocan en una celda de electroporación de tipo 2, se les da un pulso e inmediatamente se les agrega la misma celda 1 ml de medio SOC, se mezcla y se pasa a un tubo eppendorf de 1.5 ml, incubar en agitación a 37°C por 1 hr, a continuación se toman 200 µl de la electroporación y se plaquean con perlas de vidrio estéril en una placa de medio LB con su respectivo antibiótico de selección, dejar secar la placa e incubar a 37°C por 12 hrs.

### *Transformación con competentes químicas*

Colocar 10 µl de muestra que se quiere transformar en 200 µl de células competentes químicas, mantener en hielo por 20 minutos, después poner 2 minutos a 42°C e inmediatamente 2 minutos en hielo, agregar 1 ml de medio LB líquido e incubar 1 hr a 37°C en agitación, tomar 200 µl de la muestra y plaquear con perlas de vidrio estéril en una placa de medio LB con su respectivo antibiótico de selección, dejar secar la placa e incubar a 37°C por 12 hrs.

### *Maxi – Prep*

Esta se obtiene a partir de un cultivo de 50 ml de *E. coli* en medio LB líquido incubado previamente a 37°C durante 12 hrs, posteriormente pasara a tubos falcon, centrifugar las células a 6000 rpm durante 5 minutos, y se lavan con una solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, resuspender el paquete celular en 1.5 ml de la solución I la cual está compuesta por glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris – HCl 25 mM a pH 8 que se mantiene a 4°C, se le agrega inmediatamente la solución II que se prepara al momento, compuesta de NaOH 2N (350 µl), SDS 10 % (350 µl) y agua destilada (2.8 ml), mezclar suavemente y dejar reposar en hielo 10 minutos, a continuación se agrega 2.5 ml de la solución III que contiene acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial a un pH de 4.8 y se dejan en hielo 20 minutos, después se centrifuga por 15 minutos, el sobrenadante se recupera y se coloca en un tubo falcon de 15 ml estéril, agregar el mismo volumen de isopropanol, dejar en hielo 5 minutos para que precipite y lavar 3 veces con etanol al 70%, a 10,000 rpm durante 2 minutos, quitar todo el sobrenadante y dejar secar la pastilla a 55°C, agregar 200 µl de RNAsa diluida (4 µl/ml de H<sub>2</sub>O), e incubar 12 hrs o más a 37°C.

### *Células competentes de Azotobacter vinelandii*

De una placa fresca de la cepa de interés de *A. vinelandii* en medio BS, se resiembrar con estría en una placa de medio CM, con el fin de aislar una colonia y se incuba a 30°C por 48 hrs, posteriormente de esa placa, se resiembrar la colonia

aislada de forma masiva y se incuba a 30 °C durante 24 hrs, pasado este tiempo se recoge el tapete con un broche baco con cuidado de no llevarse agar, y se coloca en un tubo eppendorf estéril, se lavan con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM a 13,000 rpm durante 4 minutos, este proceso se repite cuantas veces sea necesario, hasta quitar todos los residuos de alginato, en el caso de cepas alginatosas, en caso contrario con una vez es suficiente, después se retira todo el sobrenadante y dependiendo de la cantidad del paquete celular se resuspende de 200 a 500 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, si se ocupan en ese momento, si se quieren utilizar después se recomienda guardar en glicerol al 10% con medio CM líquido a -70°C.

#### *Extracción de DNA genómico*

Lavar células de un cultivo fresco de *A. vinelandii* con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta que no tengan residuos de alginato, resuspender en 450 µl de solución TES 50/20, la cual contiene EDTA 0.22 M pH 8 y Tris 1M pH 7.5, inmediatamente agregar 50 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubar 30 minutos a 37°C, después agregar 30 µl de proteasa (10 mg/ml), y volver a incubar 30 minutos a 37°, pasado este tiempo agregar 50 µl de SDS al 10% y mantener durante 15 minutos a 37°C o hasta que la muestra se observe transparente, agregar 100 µl de NaCl 5 M, mezclar e incubar 10 minutos a 65 °C, posteriormente adicionar 80 µl de CTAB 10 % - NaCl 0.7 M previamente incubada a 65°C e incubar 20 minutos a la misma temperatura, agregar 600 µl de una solución cloroformo – alcohol isoamílico 24:1, vortexear y centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm, a continuación recuperar la fase de arriba y seguir el protocolo por sílica.

#### *Protocolo por sílica*

Se agregan 10 ml de sílica a la muestra y se deja reposar 10 minutos, centrifugar por 2 minutos y decantar el sobrenadante, posteriormente se lava 3 veces con 500 µl de la solución de New Wash y se resuspende con vortex, y centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos, después retirar todo el sobrenadante y dejar secar la pastilla a 55°C, resuspender en 30 µl de RNAsa diluida (2 µl/ml de H<sub>2</sub>O), e incubar 1 hr a 37°C, finalmente centrifugar a 13,000 rpm y tomar cuidadosamente el sobrenadante evitando tomar restos de sílica y pasar a un nuevo tubo eppendorf.

#### *Transformación de A. vinelandii*

Para esta técnica utilizamos 200 µl de células competentes de *A. vinelandii* de la cepa de interés y las mezclamos con 50 µl de Maxi – prep, el cual contiene el vector integrativo que queremos recombinar, esta mezcla se coloca en una placa de CM con cuidado y esparciéndola en el centro formando un círculo, se deja secar y se incuba por 48 hrs a 37°C, una vez pasado este tiempo se recoge el tapete celular con un broche baco evitando llevarnos parte del agar y se coloca en tubos eppendorf estériles, posteriormente se lavan las células con MgSO<sub>4</sub> 10 mM, quitando cualquier residuo de alginato, una vez limpio de alginato se resuspenden dependiendo la cantidad de paquete celular en 200 a 500 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, finalmente se plaquean con perlas de vidrio en placas de medio BS con antibiótico de selección, se dejan secar las placas y se incuban por 48 hrs a 30°C.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se utiliza para obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA específico, partiendo de un único fragmento original o molde, al tener una gran cantidad de copias, es una herramienta muy útil en biología molecular para identificación de organismos y microorganismos, y se basa en la utilización de secuencias pequeñas llamadas oligonucleótidos o primers, un ova de la cadena molde 5' → 3', y se llama primer delantero, y otro va de la cadena complementaria 5' → 3', y se llamado reverso, lo cual nos debe dar un fragmento específico de donde estos oligonucleótidos se aparean.

En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Tm por el fabricante
<b>DgyrAXhol (PgyrA)</b>	5'GCCTCGAGAGGGGCGGGCCGGCGCGGC3'	79.3°C
<b>REcoRIgyrA (PgyrA)</b>	5'CCCTTAAGAGCCGGGTTCTTTTACGTCA3'	63.5°C
<b>CrsmB5' (rsmZ1)</b>	5'GTCGATGGAACGACGTCGGCTGAC3'	72.29°C
<b>RsmCseq (rsmZ2)</b>	5'GTCGACGGAGCGACGCGGGTTGTC3'	75.12°C
<b>Eed (rsmZ4)</b>	5'AAGGCGTCGAAGGATCGACG3'	64°C
<b>Fed (rsmZ5)</b>	5'GTCGAAGGAACGACGCAGGC3'	66°C
<b>Ged (rsmZ6)</b>	5'CGTCGACGGTACCACGCAAGCC3'	72.2°C
<b>YeD (rsmY)</b>	5'GGGCGTCGCGCAGGAAGC3'	72°C
<b>XeR (rsmY)</b>	5'GTCCGCGGCTGAGTCCAA3'	68.2°C
<b>TacR (pUMAgyrAKm)</b>	5'CTCGAGAATAAGGGCGACACGGAAAT3'	60°C
<b>gacAD (Gm::gacA)</b>	5'ATTAGGGTGCTTGTGGTTCG3'	
<b>gacARv (Gm::gacA)</b>	5'GGACAAGCGTTTCCTGAGA3'	

Las condiciones empleadas se hicieron de acuerdo a los pares de oligonucleótidos utilizados, en este caso se emplearon:

Para amplificar el promotor *gyrA* de *Azotobacter vinelandii* se utilizaron DgyrAXhol – RecoRIgyrA, a una Tm de 61°C con un tiempo de extensión de 30 segundos, y 30 ciclos, dando un amplificado de 138 pb.

Para verificar la construcción de nuestro vector integrativo pUMAgyrAKm se utilizaron DgyrAXhol – TacR a una Tm de 58°C con un tiempo de extensión de 1 minuto y 30 ciclos, dando un amplificado de 722 pb.

Para verificar que se haya insertado cada uno de los genes de los sRNAs (*rsmZ1* – *rsmZ6* y *rsmY*) en el vector integrativo pUMAgyrAKm y confirmar recombinantes en *A. vinelandii*, se utilizó el oligonucleótido TacR para todos los sRNAs y su oligo delantero correspondiente con las siguientes condiciones, Tm de 60°C, con un tiempo de extensión de 45 segundos y 30 ciclos, excepto para *rsmZ5*, la Tm que se utilizó fue de 58.6°C, 45 segundos tiempo de extensión y 30 ciclos.

En la tabla 3 se especifican los pares de oligonucleótidos utilizados para amplificar a cada uno de los sRNAs clonados en el vector pUMAgyrAKm y el tamaño de su amplificado correspondiente.

**Tabla 3.** Pares de oligonucleótidos utilizados para verificar los sRNAs clonados en el vector pUMAgyrAKm, y recombinantes en *A. vinelandii*.

<b>PARES DE PRIMERS</b>	<b>TAMAÑO DEL AMPLIFICADO</b>
<b>rsmB5' – TacR</b>	744 pb
<b>RsmCseq – TacR</b>	808 pb
<b>Eed – TacR</b>	736 pb
<b>Fed – TacR</b>	736 pb
<b>Ged – TacR</b>	795 pb
<b>YeD – TacR</b>	964 pb

Para clonar el gen *rsmY* en el vector de clonación pJET1.2/blunt se utilizaron los oligonucleótidos YeD – XeR a una Tm de 60°C con un tiempo de extensión de 30 segundos por 30 ciclos dando un amplificado de 380 pb.

Finalmente para confirmar las mutantes del gen *gacA* en *Azotobacter vinelandii*, se utilizaron los oligonucleótidos *gacAD* – *gacARv* con una Tm de 60°C, un tiempo de extensión de un minuto y medio y 30 ciclos, el gen silvestre tiene un peso de 773 pb, y la mutación en el gen *gacA* fue por inserción con un casete de gentamicina, que tiene un peso de 900 pb, por lo tanto si se llevó a cabo la mutación debe dar un amplificado de 773 pb del gen *gacA* + 900 pb del casete de Gm, dando un peso total de 1673 pb.

#### *Southern blot*

Esta técnica permite identificar secuencias de DNA específicas, las cuales han sido digeridas con enzimas de restricción y se realiza hibridando el DNA de estudio con una secuencia de DNA conocida marcada radiactivamente, esta nos permite saber si lo que estamos hibridando coincide con la secuencia de DNA conocida. Primeramente el DNA de interés debe ser cortado con la enzima de restricción que libera el fragmento que queremos estudiar, después se debe correr la muestra (de 5 a 10 ml) en un gel e agarosa al 1%, posteriormente se tiñe el gel con bromuro de etidio, y se toma una foto en el transiluminador de luz UV, colocando una regla y marcando el 0 en el pozo, esto nos sirve de guía para saber a qué altura han corrido las bandas del marcador de peso molecular, después debemos darle un tratamiento de desnaturalización al gel, para que se facilite la transferencia a la membrana. A continuación, se monta el material de transferencia,

se hace un tratamiento de prehibridación y finalmente se hibrida y revela la muestra.

### Desnaturalización

Para la desnaturalización necesitamos las siguientes soluciones, HCl 0.15 N, NaOH 0.5 M/ NaCl 1.5 M y Tris 0.5 M/ NaCl 1.5 M. Primero se hace un lavado con HCl 0.15 N en un recipiente limpio y con agitación durante 15 minutos, después se retira esta solución y se le agrega la solución de NaOH 0.5 M/ NaCl 1.5 M, con la cual se harán dos lavados de 20 minutos, cambiando la solución de lavado, posteriormente se retira esa solución y se agrega la solución de Tris 0.5 M/ NaCl 1.5 M y se hace exactamente lo mismo, 2 lavados de 20 minutos cada uno, cambiando la solución de lavado entre un tiempo y otro, por último se retira todos los residuos de la solución de lavado.

### Transferencia

Se debe montar el material para la transferencia de la siguiente manera. (Fig. 13)

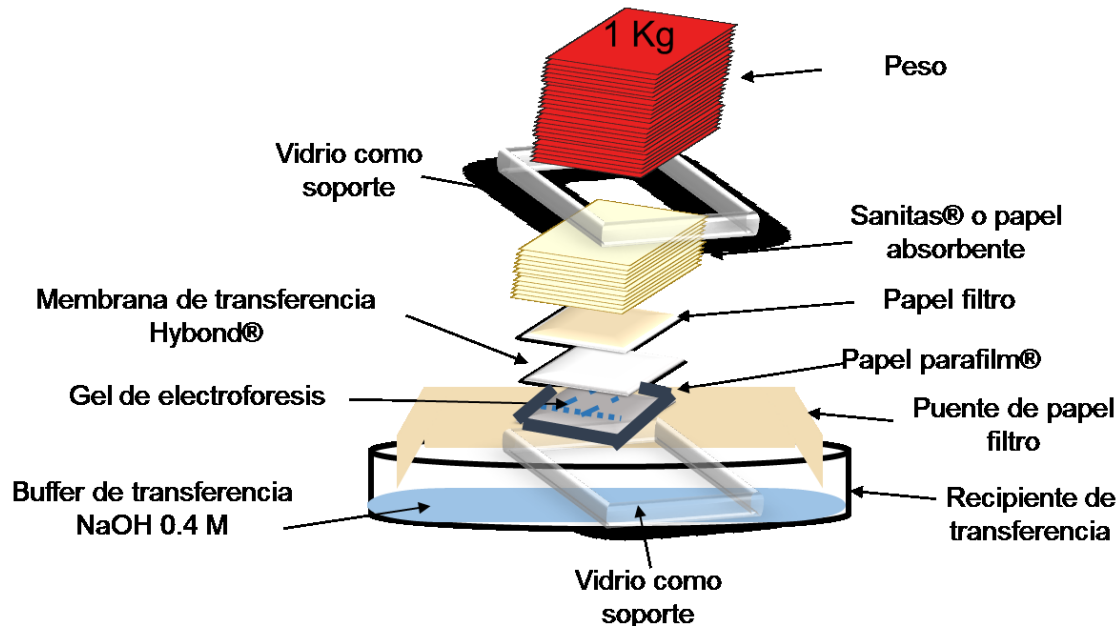


Fig. 13 Esquemización del montaje de transferencia para Southern blot.

El vidrio inferior actúa como soporte para cada montaje, el papel filtro que semeja un puente debe cubrir completamente el tamaño del gel de electroforesis y debemos poner suficiente cantidad de buffer de transferencia (NaOH 0.4 M), para que suba por capilaridad por el papel filtro, posteriormente se coloca el gel desnaturalizado, en este paso tenemos que bloquear alrededor del gel con tiras de papel parafilm® o papel para revelar reciclado e inmediatamente se coloca la membrana de transferencia Hybond del mismo tamaño que el gel, con cuidado de no formar burbujas, en caso de formarse, se puede tomar una pipeta y pasarla por

encima como un rodillo, después se coloca papel filtro de la medida de la membrana de transferencia, se coloca una cantidad suficiente de Sanitas® o papel absorbente, finalmente se coloca otro vidrio como soporte superior, se coloca 1Kg de peso o más, puede ser un libro y por último se equilibra con un nivelador y deja toda la noche, si es posible se hace un cambio del papel absorbente.

### **Prehibridación**

Después de haber desmontado el materia de transferencia, se toma la membrana con pinzas y se fija con luz UV por 10 minutos, en este tiempo se puede verificar que se haya transferido el DNA a la membrana tiñiendo el gel con BET, si se transfirió, no debe haber rastro de marcaje. Una vez fijada la membrana, se le hacen dos lavados de 30 minutos en un recipiente limpio y con agitación con una solución llamada SSC 20X, compuesta por NaCl 3M y citrato de sodio 300 mM a un pH de 7, la cual controla la astringencia de la membrana, en este lapso de tiempo adelantamos para precalentar la incubadora donde se llevará a cabo la prehibridación a 65 °C, y preparar al momento la solución de prehibridación en un tubo falcon, esta solución contiene Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, SDS 10% y albumina al 1%, igualmente se precalienta a 65°C. Se debe tener un control de marcaje, para eso se realizan diluciones 1:10 (25 ng, 2.5 ng y 0.25 ng) con el DNA a marcar, y se coloca una pequeña gota de cada dilución en un fragmento de membrana aparte evitando que las gotas se junten, esto con la finalidad de probar la eficiencia de la marca o sonda, esta también se fija por 5 minutos con luz UV, posteriormente se coloca tanto la membrana de estudio, como la membrana control, con pinzas en un tubo para hibridación con cuidado de no formar burbujas y el DNA quede cara adentro del tubo para que al girar esté en contacto con la solución, se coloca en la incubadora con agitación constante y se mantiene ahí durante 4 horas. Una vez cumplido el tiempo se agrega la sonda marcada radiactivamente, previamente descongelada, y se deja igualmente a 65°C, 12 horas en agitación constante. Después se desecha el líquido radiactivo en caso de ya no utilizar la sonda, se agregan 10 ml al tubo de hibridación de una solución 2X SSC, 0.1 % SDS durante 30 minutos, se debe verificar que aún tenga marca, si es así se debe lavar 2 veces con 0.1X SSC, 0.1% SDS durante 30 minutos, de preferencia en agitación, igualmente debemos volver a verificar si aún existe marca, de lo contrario continuar lavando, una vez que está lista se envuelve en plástico adherible y se coloca junto a una película de rayos X dentro de una caja que la aísla de la luz, esta registra las posiciones donde hibridó el DNA marcado con el DNA de estudio, una vez expuesto, se revela dando lugar a una autorradiografía.

#### *Cuantificación de alginato por el método del Carbazol*

Se inoculan 25 ml de medio BS sin antibiótico, esto se hace por triplicado y se estandariza el preinóculo a partir de la misma cantidad de células, se incuba a 30 °C por 48 hrs, posteriormente se centrifuga el cultivo y se colecta el sobrenadante en tubos de 15 ó 50 ml, se lavan las células con una solución de EDTA 0.01M, se agita vigorosamente y se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos, se vuelve a colectar el sobrenadante en tubos de 15 ó 50 ml. Después se separan las células y se determina la proteína por el método de Lowry, así pues una porción del

sobrenadante se precipita con 2 volúmenes de isopropanol, se observará un precipitado blanco, la cantidad de sobrenadante a precipitar depende del grado de mucoidía de la cepa en cuestión, es importante anotar que fracción del sobrenadante se someterá a precipitación, este precipitado se recupera por centrifugación y se resuspende en un volumen adecuado de agua o una solución de NaCl 0.85%.

Nota: En este estudio se modificó el método, puesto que en BS líquido no hubo producción de alginato, por lo tanto se procedió hacer a partir de placa, igualmente por triplicado con la misma cantidad de inóculo para cada placa, se recogió el tapete celular y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, se resuspendió en 1 ml de BS líquido, y se procedió a centrifugar a 7000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocó en tubos de 15 ml, después se volvió a lavar el paquete celular con EDTA 0.01M y se colecta nuevamente el sobrenadante para colocarlo en el tubo de 15 ml, la precipitación del sobrenadante se hace exactamente que en el método en matraz, al igual que la determinación de proteína, sin embargo en este caso se hizo una dilución 1:5 para poder determinar la cantidad de proteína sin salirnos de los valores de la curva, la cual se mide a 625 nm, con una solución Stock de albumina sérica bovina con concentración de 2 mg/ml (Tabla 4).

**Tabla. 4** Preparación de la curva de calibración de proteína.

<b>Tubo</b>	<b>µl de sol. Stock</b>	<b>µl de H2O</b>	<b>[ ] mg/ml</b>
<b>1</b>	BLANCO	200 µl	0
<b>2</b>	1	199 µl	2
<b>3</b>	2	198 µl	4
<b>4</b>	4	196 µl	8
<b>5</b>	8	192 µl	16
<b>6</b>	16	184 µl	32
<b>7</b>	32	168 µl	64
<b>8</b>	64	136 µl	128

Una vez obtenido nuestro precipitado, se procede a medir por el método del carbazol, primeramente se depositan 1.5 ml de una solución de ácido sulfúrico – boratos la cual se prepara de la siguiente manera, la solución de boratos contiene 24.7 g de ácido bórico, 10.9 g de KOH en un volumen final de 100 ml, la solución de ácido sulfúrico – boratos tiene 975 ml de ácido sulfúrico y 25 ml de solución de boratos, esta solución se prepara un día antes y se deja agitando toda la noche. Después se colocan 175 µl de la solución problema de alginato sobre la superficie de la solución anterior. Paralelamente a las muestras se corre una curva estándar de alginato (Tabla 5) con las siguientes concentraciones 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, y 0.025 mg alginato/ ml de solución, se añaden 100 µl de carbazol al 0.1% (1 g de carbazol en 100 ml de etanol), y se vortexea cuidadosamente. Esta reacción se coloca en un baño de agua a 50°C por 30 minutos. Se desarrolla un color rosa. Se retiran los tubos del baño y se dejan que tomen la temperatura ambiente, el

color es estable de 1 – 2 horas. Se leen las muestras calibrando el espectrofotómetro a 530 nm, se reportan las lecturas en base en la curva de calibración, la producción específica de alginato, en mg de alginato / mg de proteína.

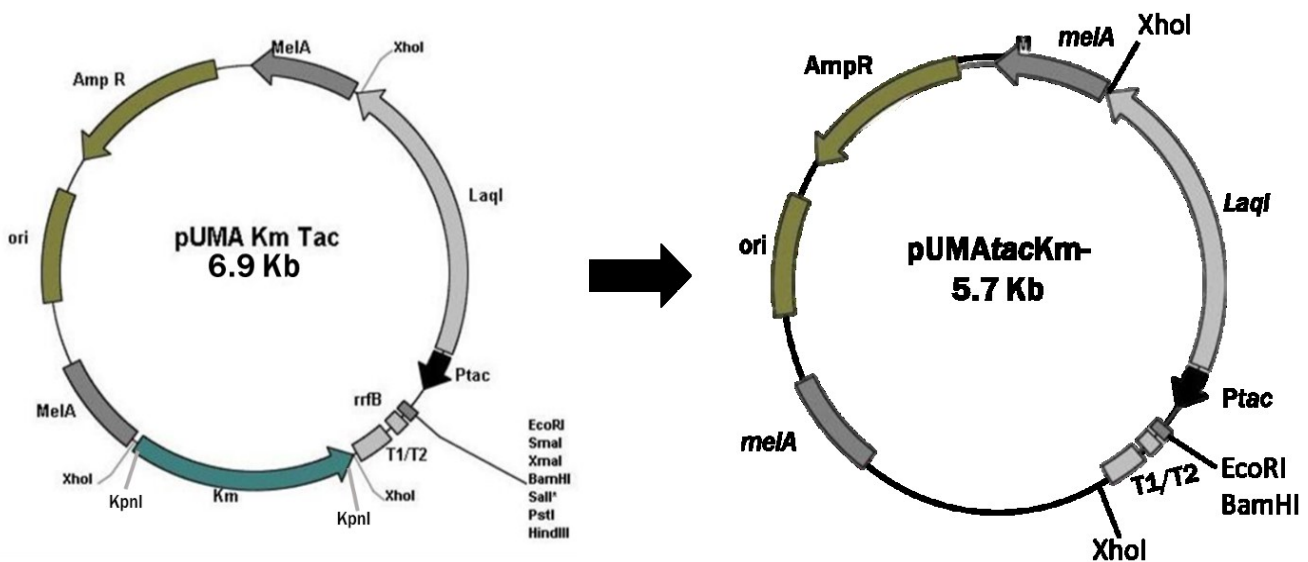
**Tabla. 5** Preparación de la curva de calibración de alginato

Tubo	µl de sol. Stock	µl de H2O	[ ] mg/ml
1	175	0	0.5
2	140	35	0.4
3	105	70	0.3
4	70	105	0.2
5	35	140	0.1
6	17.5	157.5	0.05
7	8.75	166.25	0.025

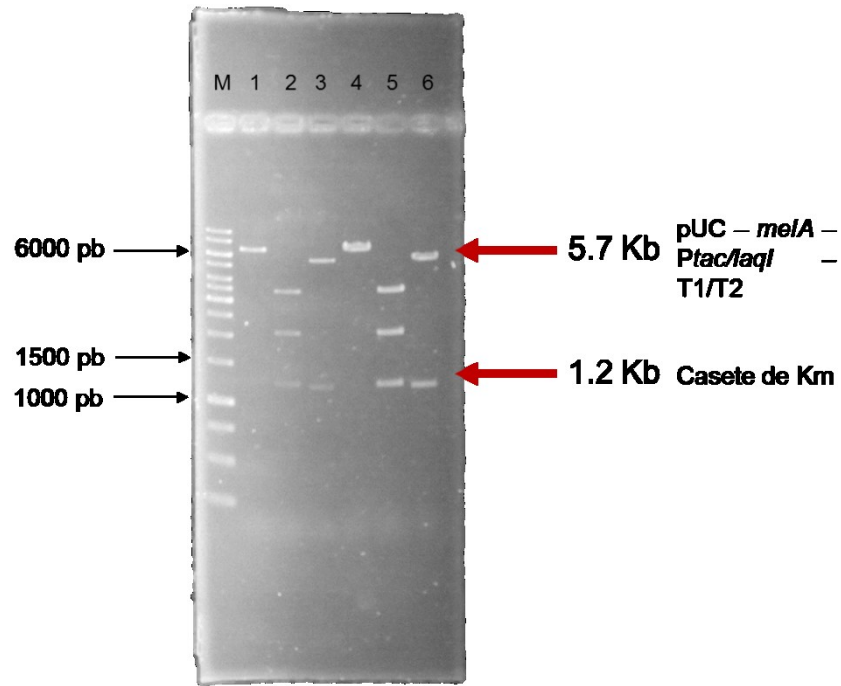
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Construcción del vector integrativo pUMA<sub>g</sub>yrAKm

Esta construcción se obtuvo a partir del vector integrativo pUMA<sub>at</sub>acKm (Fig. 12) con un peso de 6.9 kb. Primeramente se procedió a retirar el casete de resistencia a kanamicina con la enzima de restricción *KpnI* (Fig 14 a, b), esto con la finalidad de facilitar la manipulación, puesto que este vector tiene 3 sitios *XhoI*, dos de ellos se encuentran en el casete de Km (Km). Además el promotor *tac* y el represor *laqI* tienen un peso similar al casete de resistencia, los primeros tienen un peso de 1.5 kb en conjunto, mientras que el casete de Km pesa 1.2 kb.

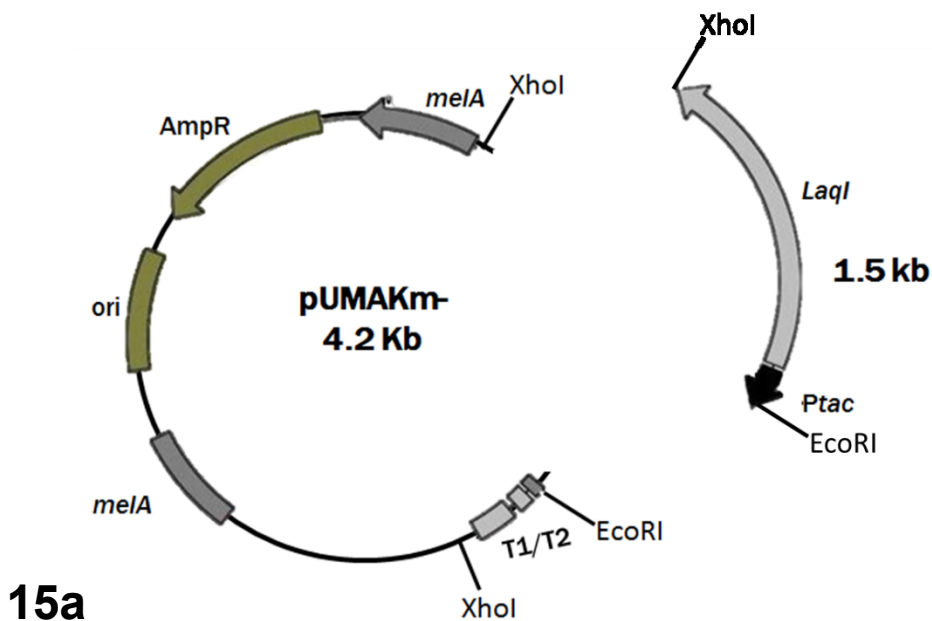


14b

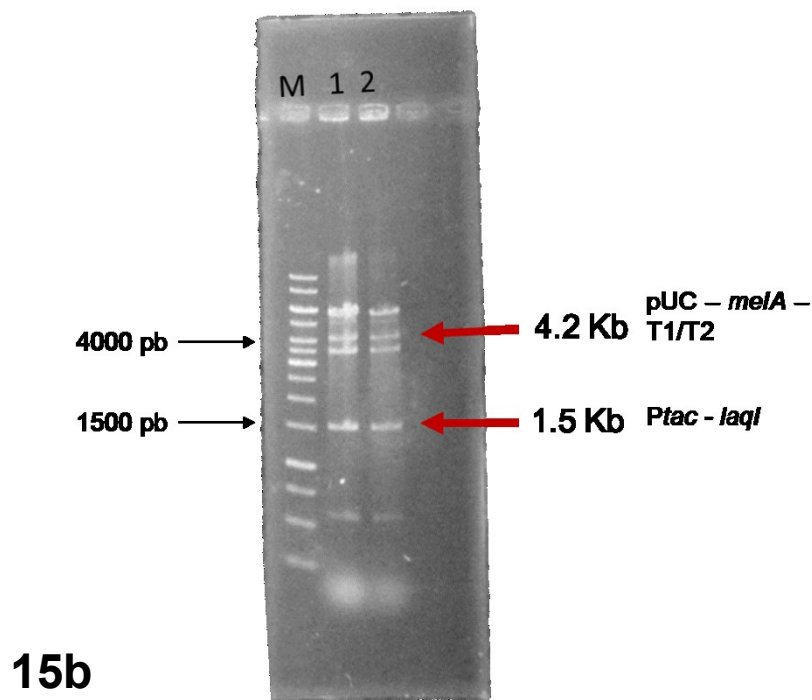


**Fig. 14** Escisión del casete de Km del vector pUMAtacKm. **a)** Esquema de la escisión. **b)** Corrimiento electroforético de los cortes correspondientes al vector pUMAtacKm- y el casete de Km. En los carriles 1 y 4 corte con la enzima *EcoRI*, dando un linealizado de 6.9 Kb, en los carriles 2 y 5 restricción con la enzima *XhoI*, dando 3 fragmentos uno de 3.7 (pUC – *melA*), otro de 2.0 Kb (*ptac-laqI*-T1/T2) y otro de 1.2 Kb (casete de Km), por último en los carriles 3 y 6 corresponde a la restricción con la enzima *KpnI*, liberando el fragmento de 1.2 Kb del casete de Km

Una vez escindido el casete de Km, se religó el vector con peso de 5.7 kb. A este plásmido se le retiró el promotor *tac* y el represor *laqI* mediante un corte total con *EcoRI* y posteriormente se agregó directamente la enzima *XhoI* por 10 minutos, obteniendo así un corte parcial, ya que aún tenía dos sitios *XhoI*; se obtuvo una banda de 4.2 kb (Fig. 15 a, b).



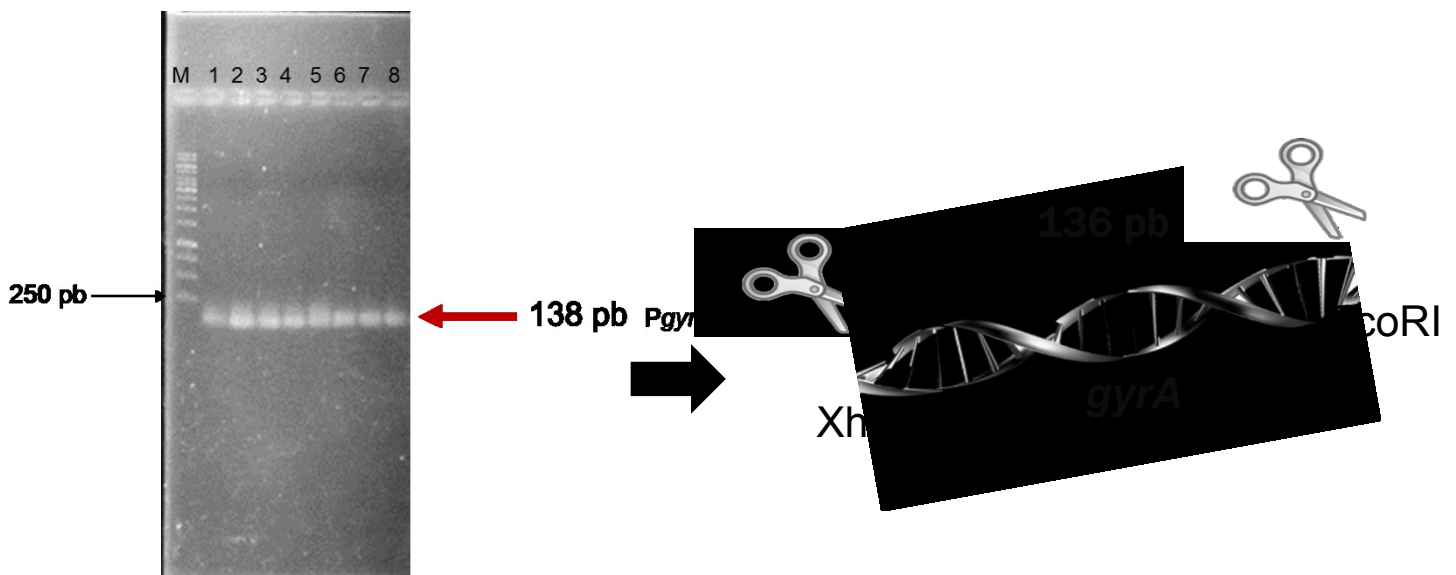
15a



**15b**

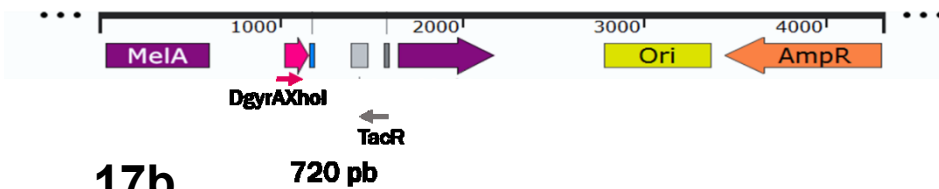
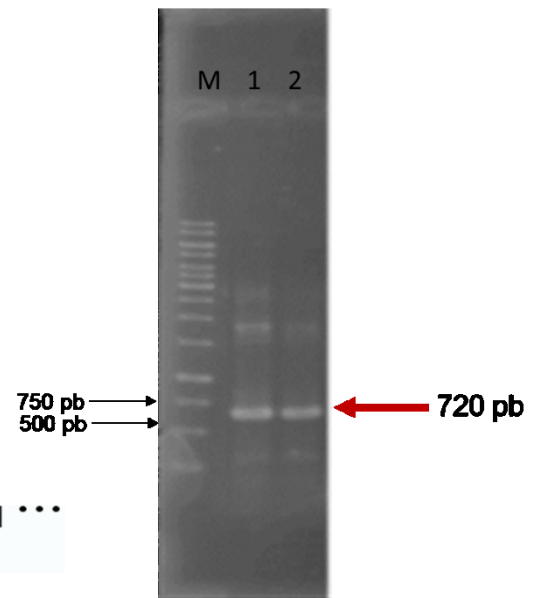
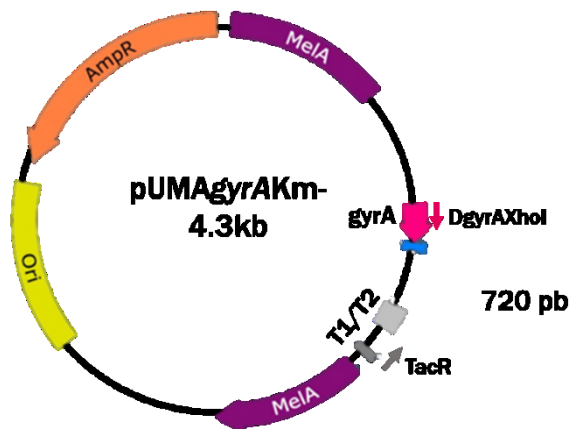
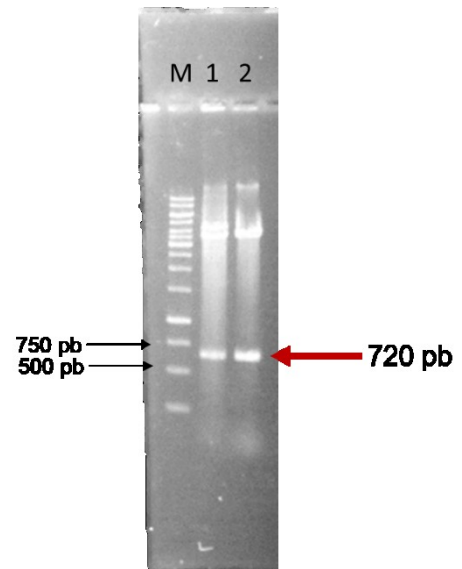
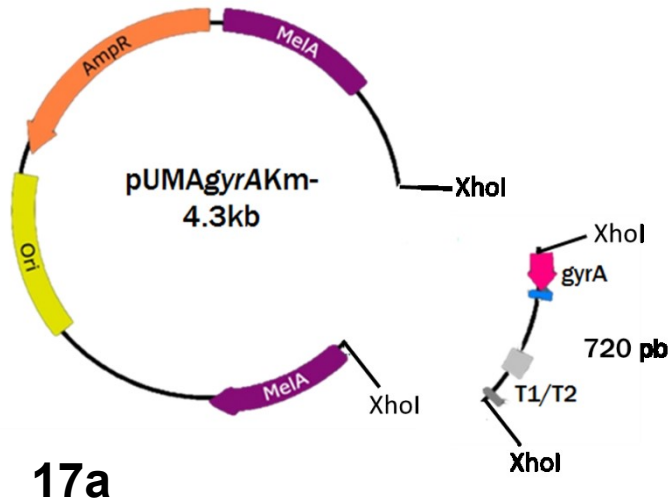
**Fig. 15 a)** Esquema de la escisión del promotor *tac* y su represor *laqI* con corte *EcoRI* – *XhoI*. **b)** Corrimiento electroforético de los cortes parciales para la escisión del promotor *tac* y su represor *laqI* del vector pUMAKm-

Esta banda se purificó y se ligó con el amplificado del promotor *gyrA*, nativo de *A. vinelandii*, este amplificado se obtuvo con los primeros que tienen sitios de corte *EcoRI* – *XhoI* (Fig. 16) especificados en Materiales y Métodos.



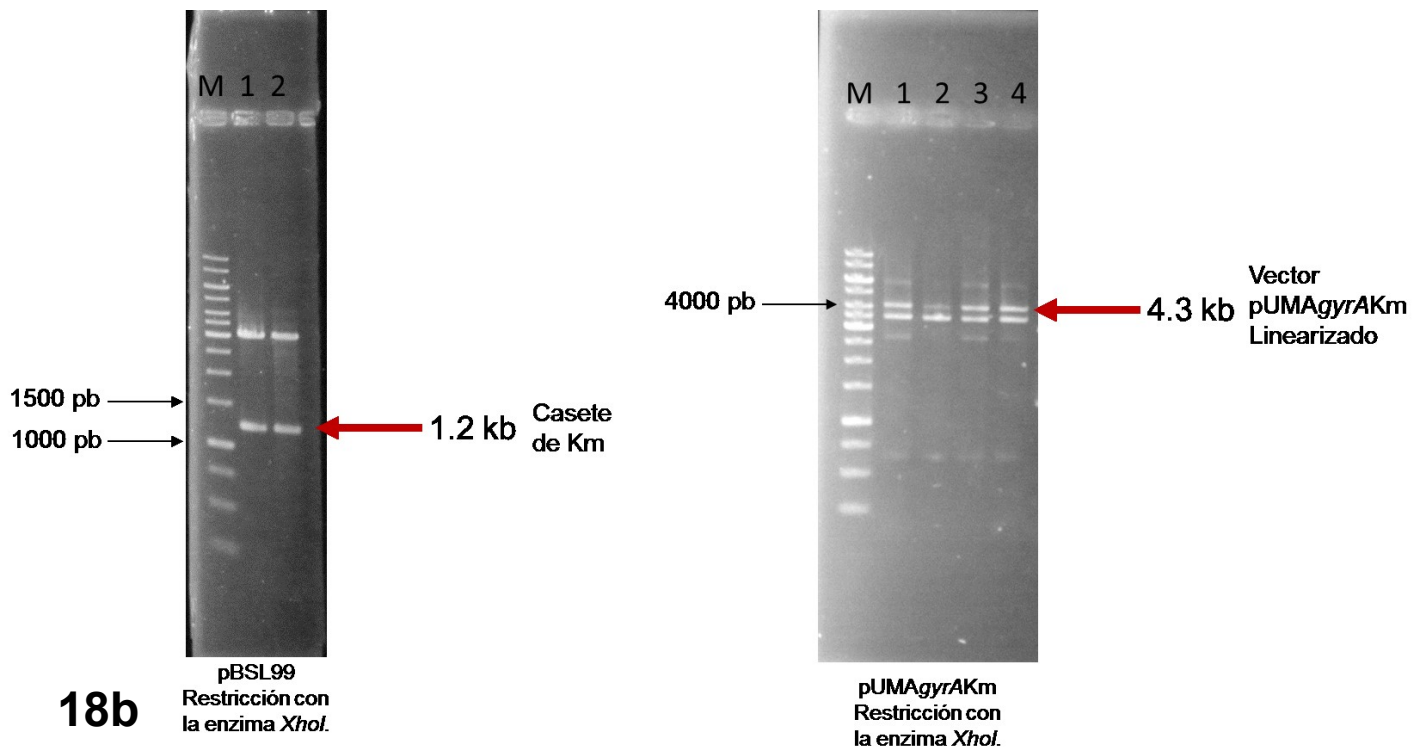
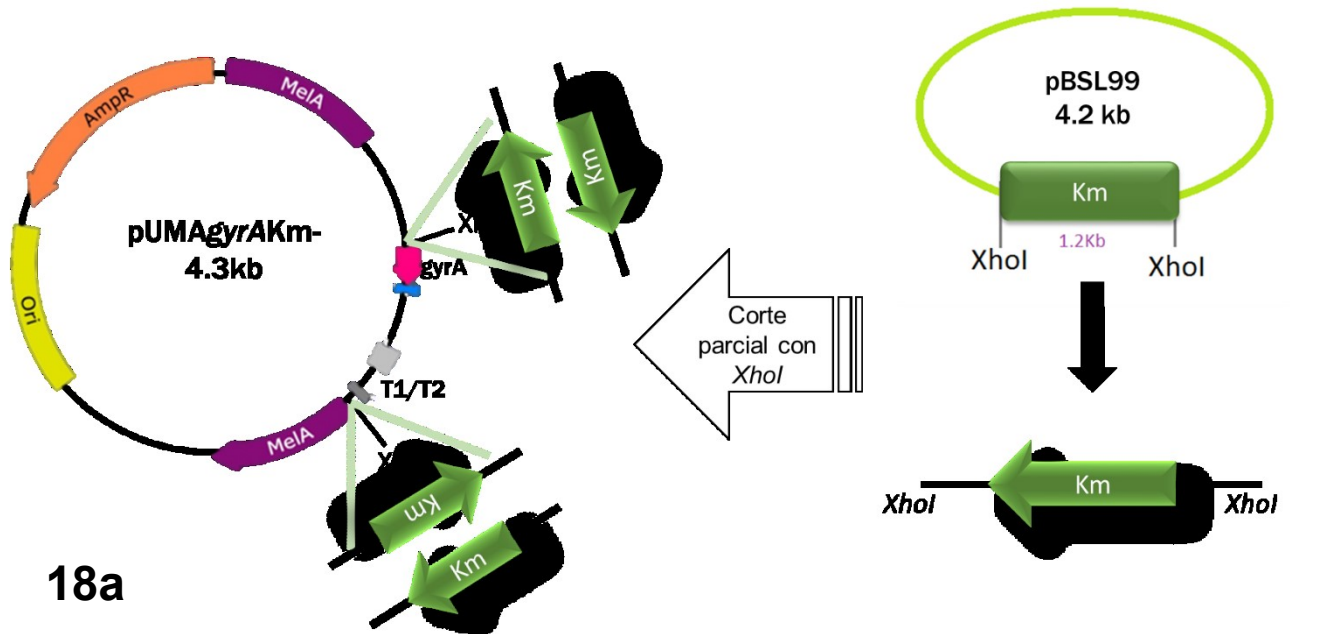
**Fig. 16** Corrimiento electroforético que muestra el amplificado del promotor *gyrA* de *A. vinelandii*, con un peso de 138 pb, dado que los oligonucleótidos (DgyrAXhoI – RecoRIgyrA) tienen sitios de corte *XhoI* – *EcoRI*.

Esta construcción se verificó mediante PCR con los oligonucleótidos DgyrAXhol – TacR y con restricción con *XhoI* (Fig. 17 a, b) mostrando un peso de 720 pb, ya que el *PgyrA* pesa 136 pb, y los terminadores 584 pb.



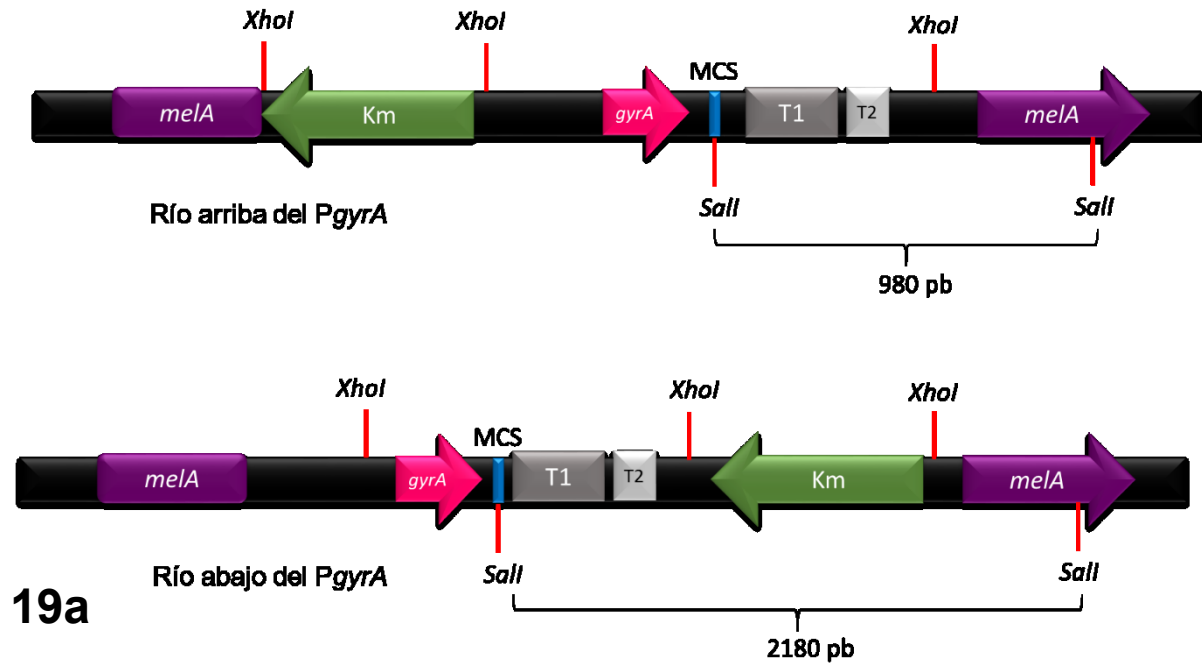
**Fig. 17** Verificación de la construcción del vector integrativo pUMAgyrAKm-. **a)** Esquema del patrón de restricción con la enzima *XhoI* y el corrimiento electroforético donde se muestra un fragmento de 720 pb que corresponden al promotor *gyrA* y los terminadores T1/T2 del vector, y una banda de 3580 pb que corresponde al pUC*meIA*. **b)** Esquema de la PCR utilizando los oligonucleótidos DgyrAXhol/TacR, y el corrimiento electroforético donde se muestra el peso del amplificado de 720 pb.

Después de corroborar esta construcción se volvió a insertar el casete de resistencia a Km que se obtuvo del plásmido pBSL99 mediante corte con *Xho*I, igualmente al vector se le hizo corte parcial con *Xho*I obteniendo la banda de

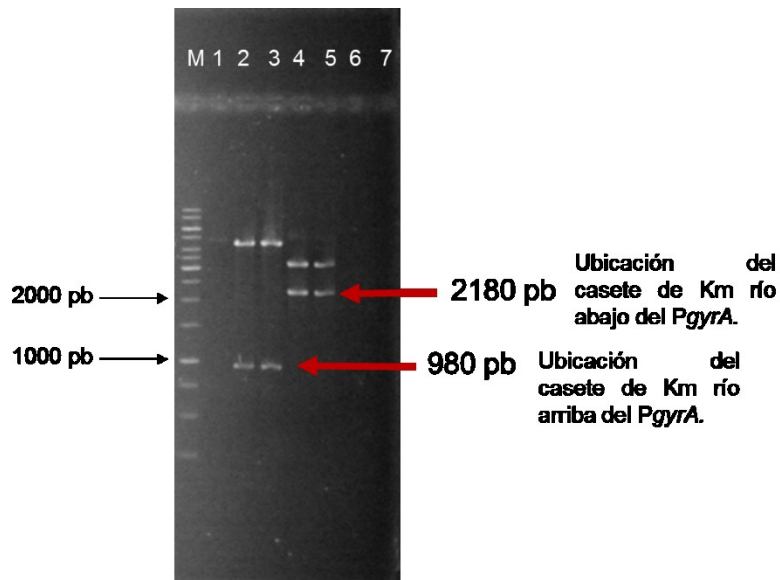


**Fig. 18** Inserción del casete de Km al vector integrativo pUMAgryAKm-. **a)** Esquema de la inserción del casete de Km con base a las orientaciones posibles. **b)** Corrimiento electroforético que muestran la restricción parcial con la enzima *Xho*I del vector integrativo pUMAgryAKm- (banda de 4.3 kb), y la restricción *Xho*I del casete de Km escindido del pBSL99, con un peso de 1.2 kb.

Se tenían dos opciones en cuanto a la orientación del casete, podía clonarse río arriba del *PgyrA*, o río abajo del mismo, esto se corroboró por medio de restricción con la enzima *Sall*, puesto que el vector integrativo tiene un sitio de corte *Sall* en el sitio de multiclonación, y otro 109 pb del extremo 3' → 5' del gen *melA*, por lo tanto si el casete de Km se clonó río arriba debía dar una banda de 980 pb, que equivale únicamente al peso de los terminadores y el fragmento de 400 pb del gen *melA*, caso contrario si este se clonó río abajo del *PgyrA*, aumenta 1200 pb, generando un fragmento de 2180 pb. (Fig. 19 a, b)



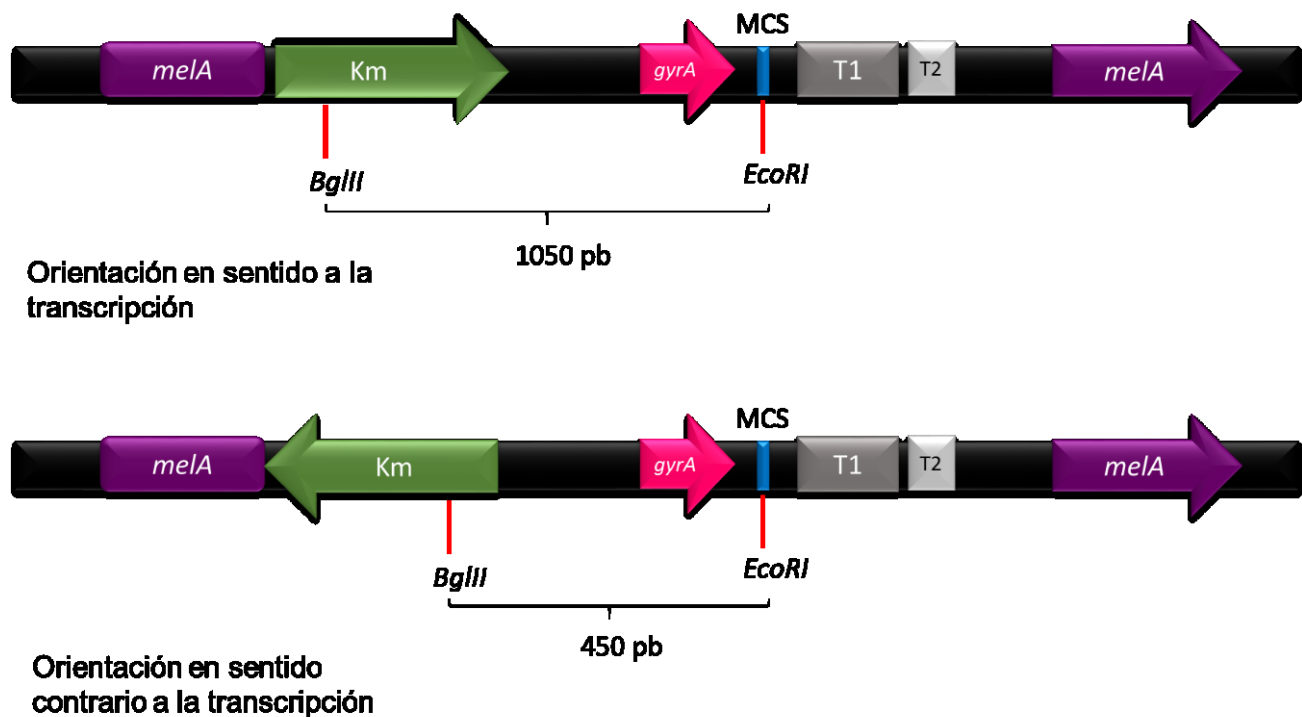
19a



19b

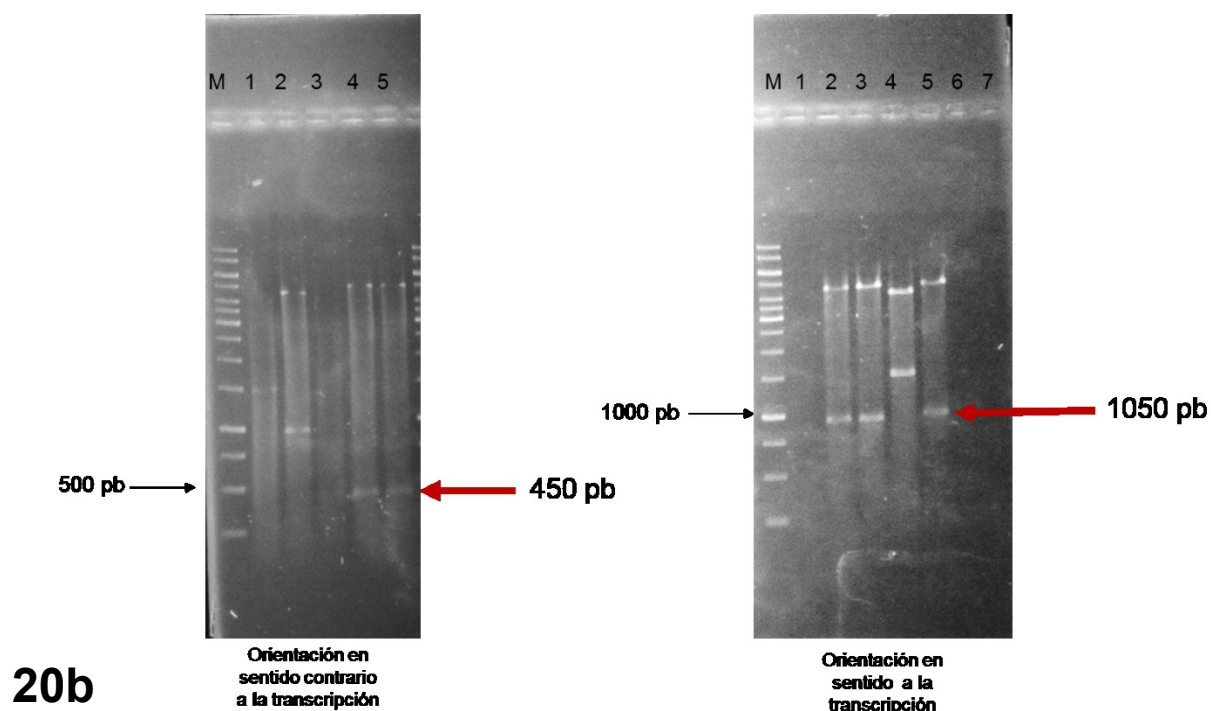
**Fig. 19** Clonación del casete de Km en el vector integrativo pUMAgryAKm- **a)** Esquema de las dos ubicaciones posibles de clonación del casete de Km. **b)** Corrimiento electroforético que muestra la restricción *Sall* del vector integrativo pUMAgryAKm que muestra una banda de 2180 pb que corresponde a la ubicación río abajo del *PgyrA*, y el patrón de restricción *Sall* que corresponde a la ubicación río arriba del *PgyrA*, (fragmento de 980 pb).

Posteriormente, se procedió a verificar la orientación del casete de resistencia a Km, debido a que es un promotor fuerte, no es deseable que interfiera con la actividad del *PgyrA*, por lo que la orientación deseada es la que está en sentido contrario a la del promotor *gyrA*. La construcción con la orientación correcta, debería generar un patrón de restricción con un fragmento de 980 pb. La orientación se verificó mediante una restricción doble *EcoRI*-*BglII*, ya que el vector tiene un sitio único *EcoRI* en el sitio de multiclonación, y el sitio *BglII* lo contiene el casete de Km que se encuentra 300 pb del extremo 5', así el patrón de restricción que debíamos obtener en sentido contrario a la transcripción del *PgyrA*, generaría un fragmento de 450 pb, y en el mismo sentido de transcripción, el cual no nos interesa para este trabajo, daría una banda de 1050 pb. Como se puede observar en la Figura 20 se obtuvieron ambas orientaciones.



## 20a

**Fig. 20** Orientación de la inserción del casete de resistencia a Km en el vector integrativo pUMAgryAKm  
a) Esquema de las dos orientaciones posibles.



**Fig. 20** Orientación del casete de resistencia a Km en el vector integrativo pUMAgryAKm b) Gel que muestra la restricción con la enzima *EcoRI* – *BglII*, del vector integrativo pUMAgryAKm, observándose una banda de 450 pb que corresponde a la orientación que se encuentra en sentido contrario a la transcripción del *pgyrA*, y los productos de la reacción de restricción con la enzima *EcoRI* - *BglII*, ahora con la orientación en el mismo sentido a la transcripción del *pgyrA*, mostrando un fragmento de 1050 pb.

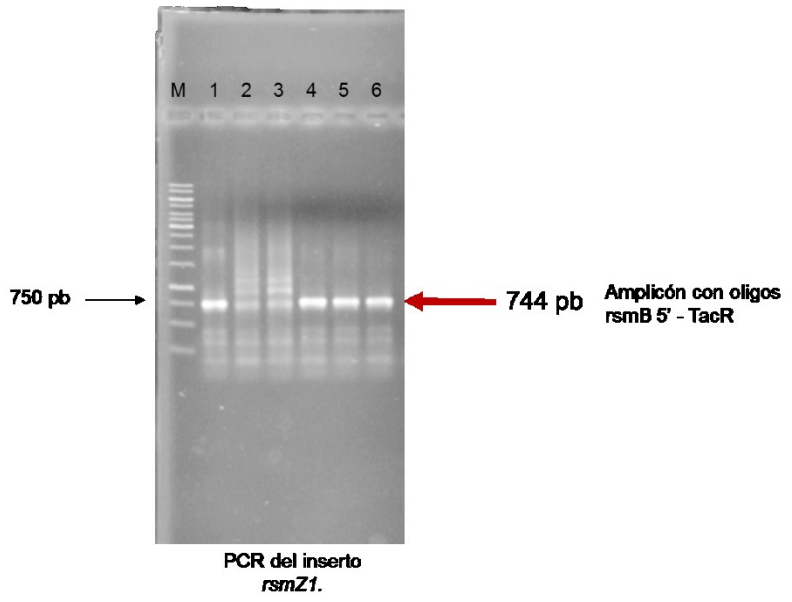
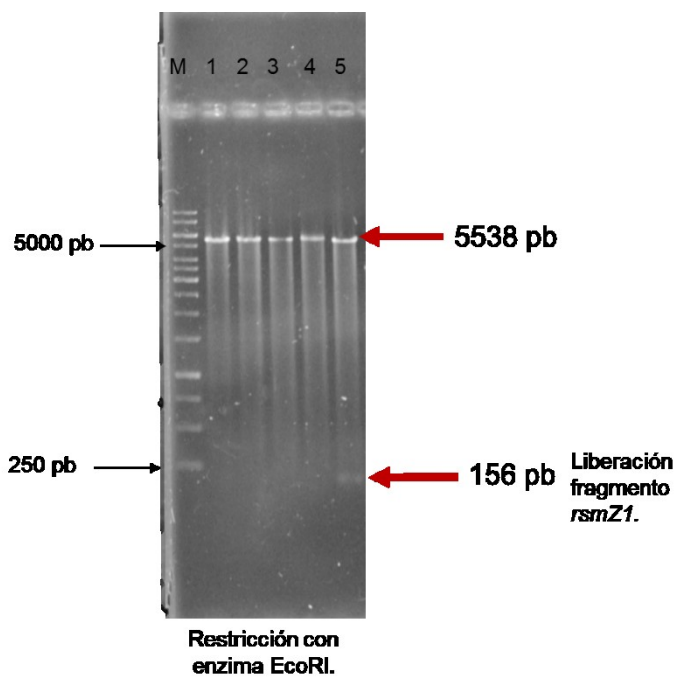
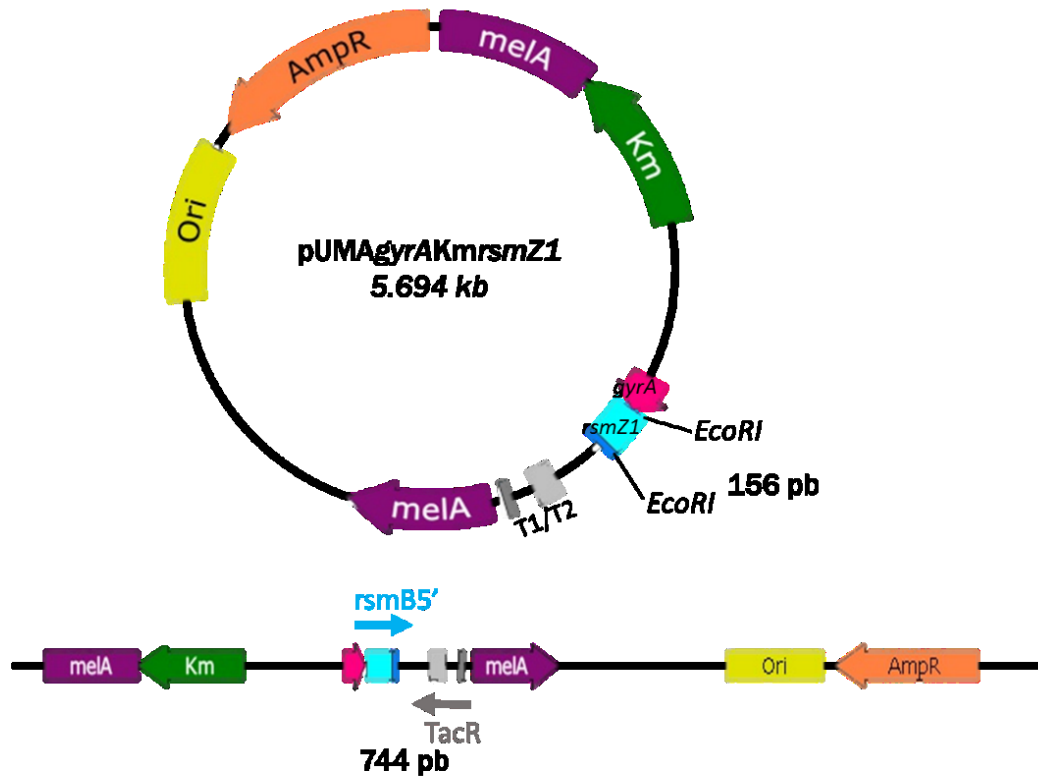
### Clonación de los sRNAs RsmZ1, RsmZ2, RsmZ4, RsmZ5 y RsmZ6 en el vector integrativo pUMAgryAKm.

Los sRNAs de la familia Rsm ya se encontraban clonados individualmente en el vector de clonación pGEM T- Easy. Los genes fueron liberados por restricción con la enzima *EcoRI*, para posteriormente ser clonados en un sitio único *EcoRI* del vector integrativo pUMAgryAKm. Para verificar que se haya insertado el gen, se hizo restricción con la enzima *EcoRI*, determinando si liberaba el fragmento de interés con los pesos se pueden ver en la Tabla 5. Posteriormente para corroborar la orientación de los insertos en el vector integrativo pUMAgryAKm, se utilizó los oligonucleótidos TacR, y el oligonucleótido delantero particular de cada uno de los sRNAs (Tabla 3 Materiales y Métodos).

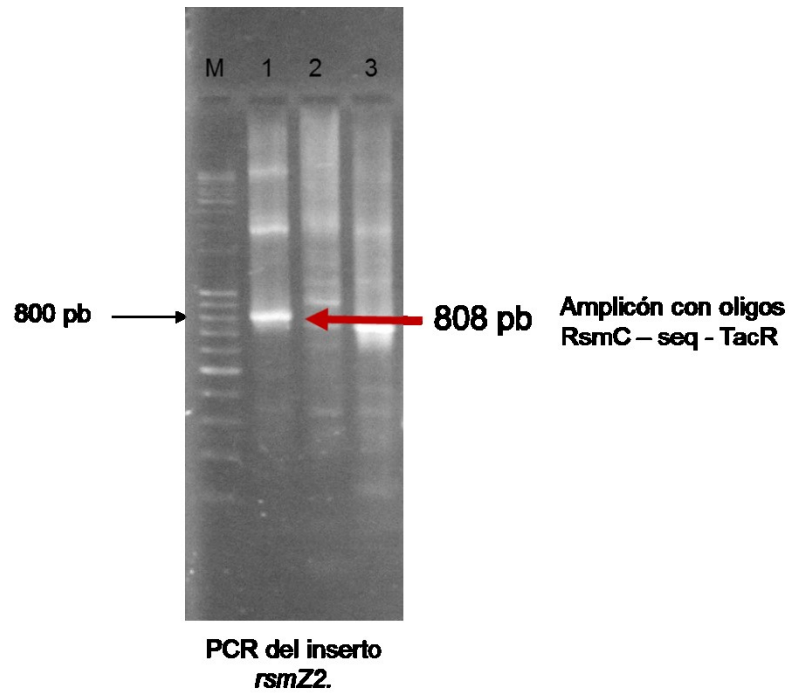
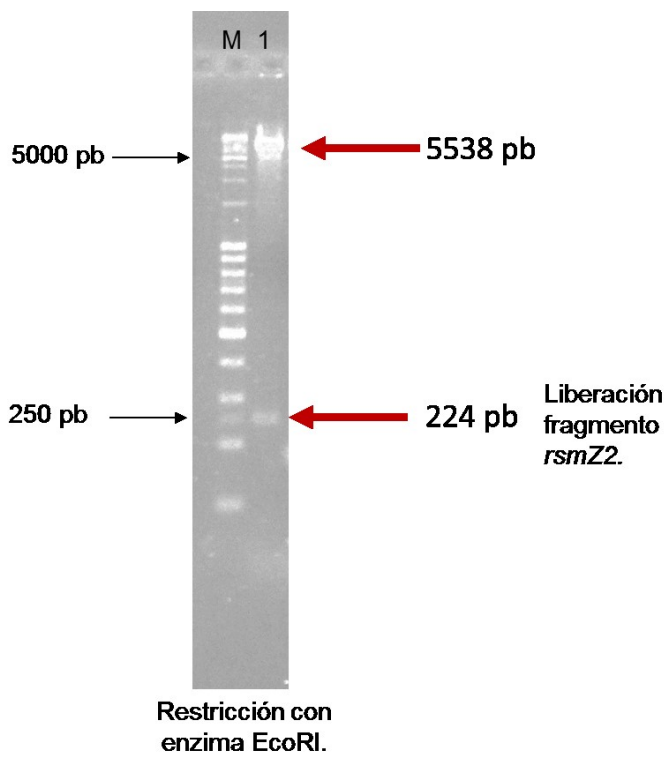
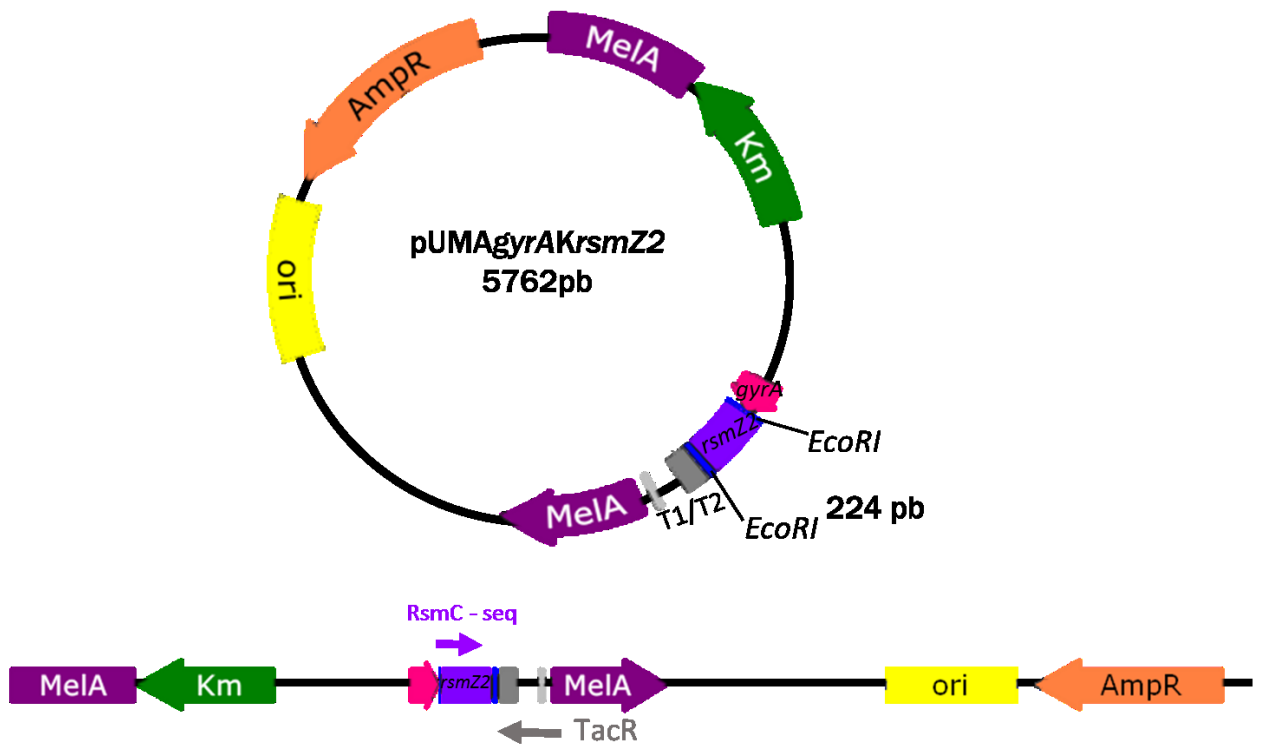
**Tabla 5.** Peso de los genes estructurales de los sRNAs de la subfamilia RsmZ estudiados en este trabajo.

Gen estructural	Peso
<i>rsmZ1</i>	156 pb
<i>rsmZ2</i>	224 pb
<i>rsmZ4</i>	152 pb
<i>rsmZ5</i>	152 pb
<i>rsmZ6</i>	212 pb

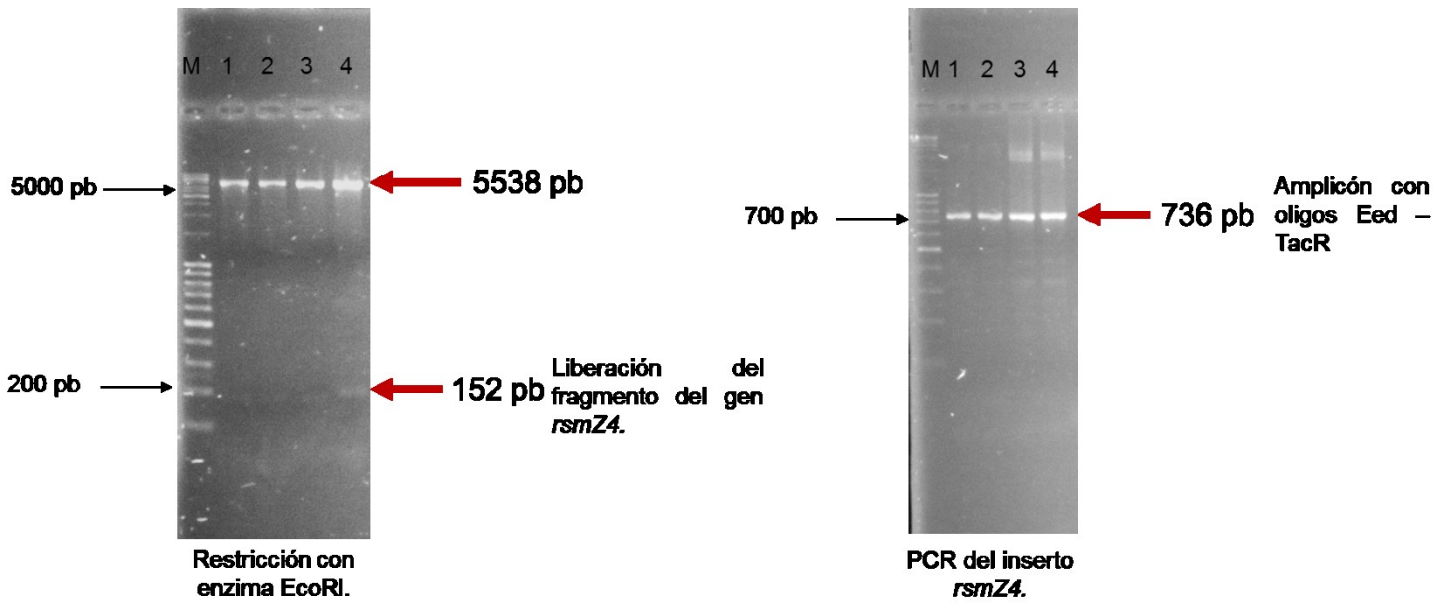
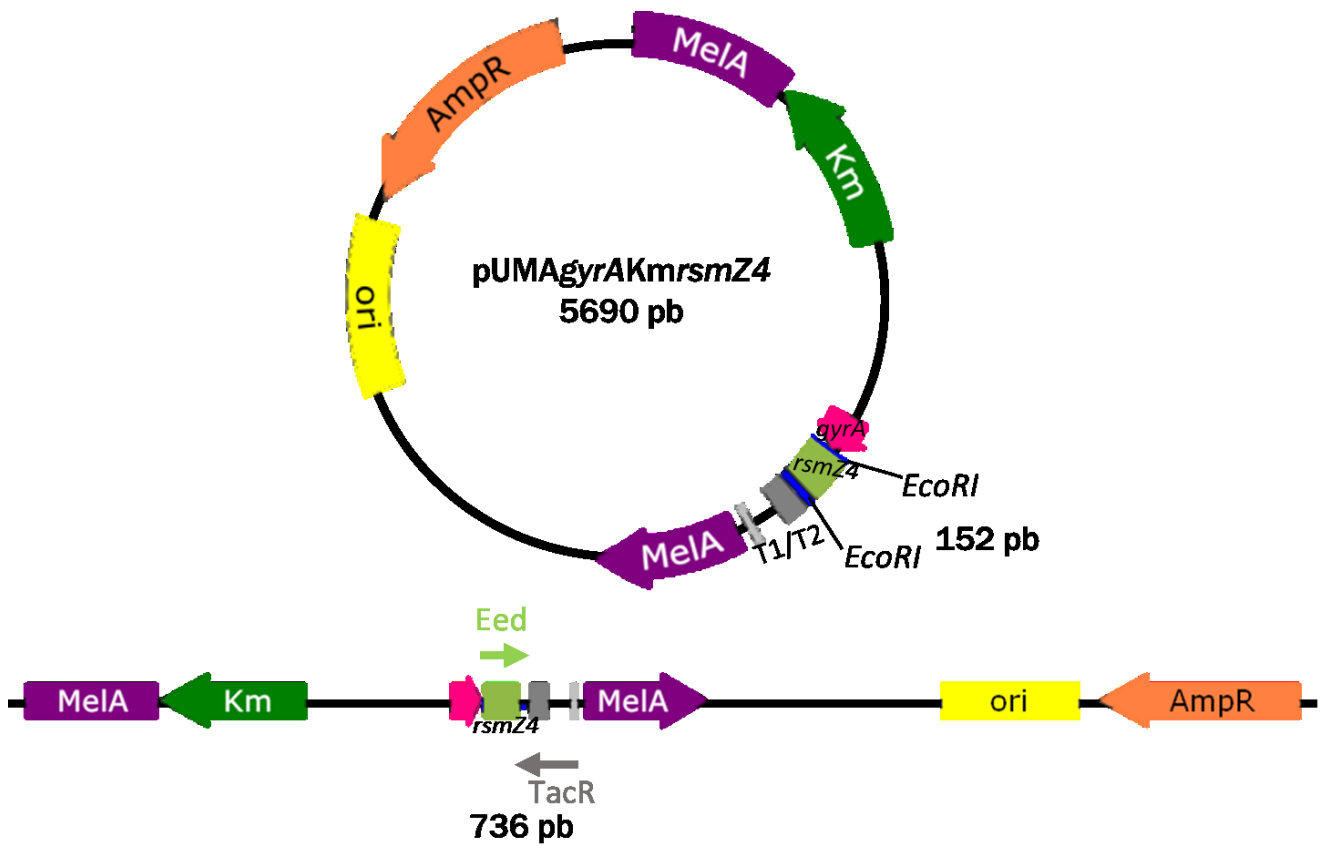
A continuación se esquematizan las construcciones pUMAgyrAKmrsmZ1, pUMAgyrAKmrsmZ2, pUMAgyrAKmrsmZ4, pUMAgyrAKmrsmZ5 y pUMAgyrAKmrsmZ6, con sus respectivos mapas de restricción y PCRs que verifi



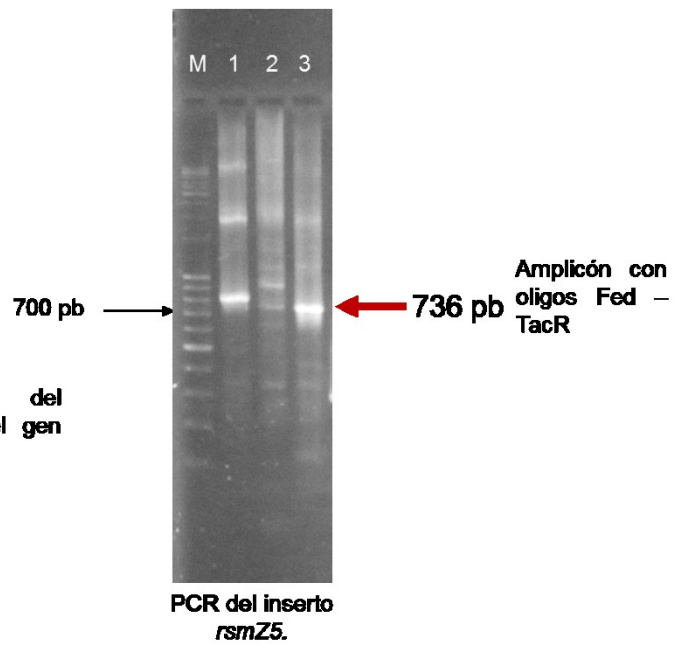
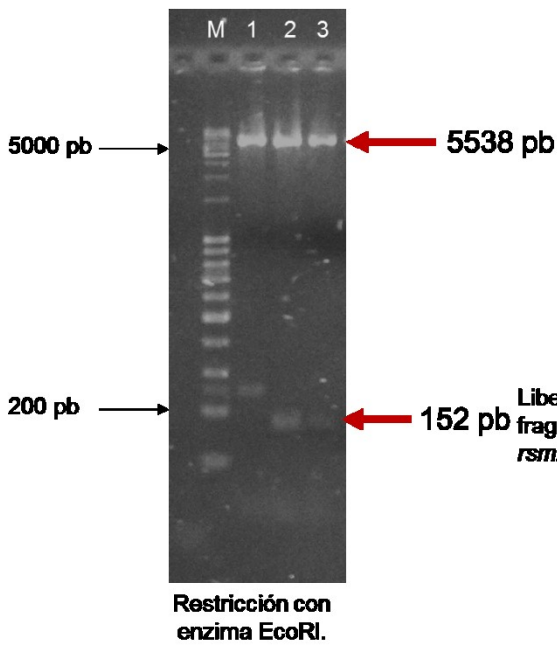
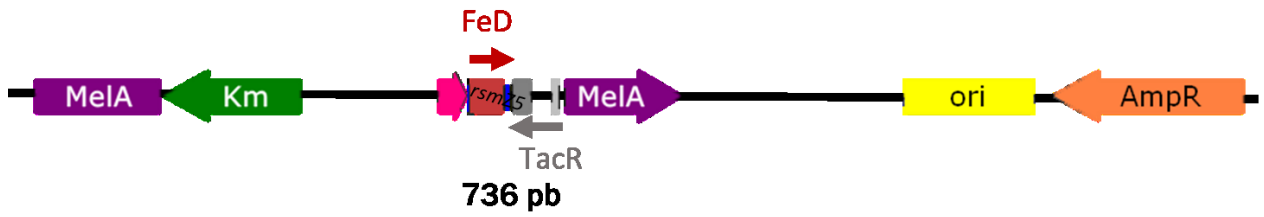
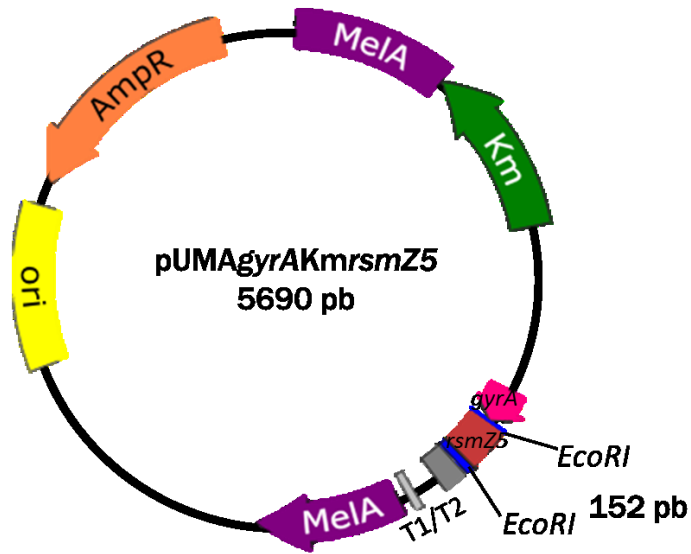
21a



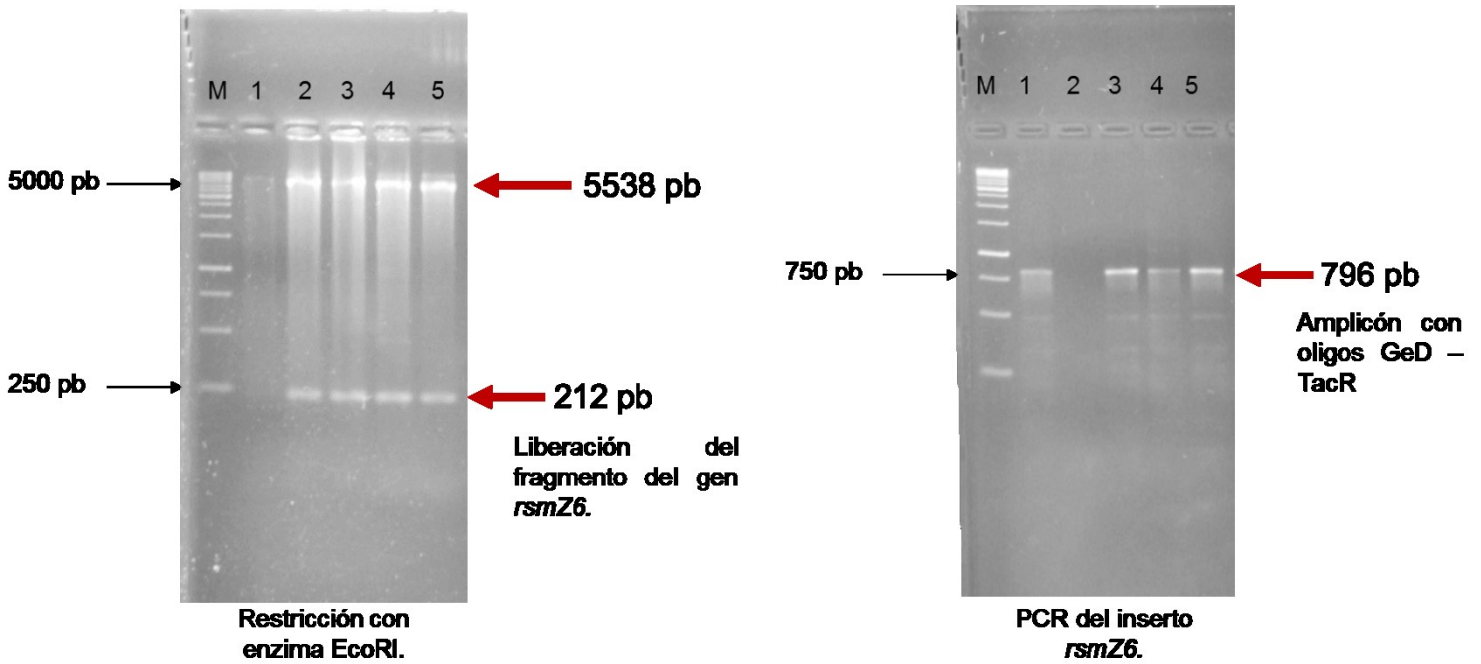
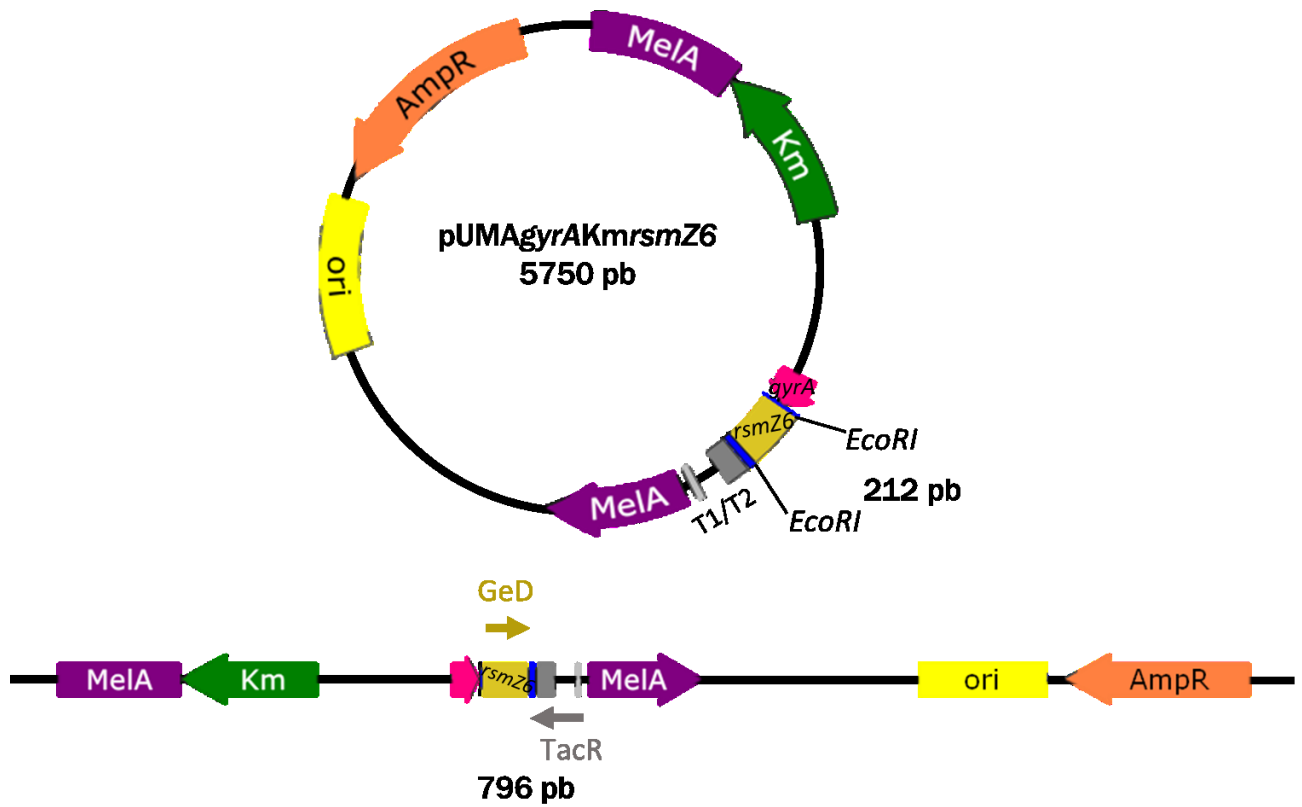
21b



21c



21d



## 21e

**Fig. 21** Clonación de los sRNAs de la subfamilia RsmZ en el vector integrativo pUMgyrAKm **a)** Corrimiento electroforético del corte de restricción *EcoRI* y análisis por PCR del gen *rsmZ1*. **b)** Corrimiento electroforético del corte de restricción *EcoRI* y análisis por PCR del gen *rsmZ2*. **c)** Corrimiento electroforético del corte de restricción *EcoRI* y análisis por PCR del gen *rsmZ4*. **d)** Corrimiento electroforético del corte de restricción *EcoRI* y análisis por PCR del gen *rsmZ5*. **e)** Corrimiento electroforético del corte de restricción *EcoRI* y análisis por PCR del gen *rsmZ6*.

### Clonación del sRNA RsmY en el vector pJET1.2/blunt

El sRNA RsmY, ya se encontraba clonado en el vector pGEM T- Easy, así que podríamos obtener el gen con cortes *EcoRI*. Sin embargo dentro del gen se encuentra un sitio *EcoRI* a 116 pb del extremo 5', por lo que se dificultaba obtener restricciones parciales, así que optamos por clonar el gen en el vector de clonación pJET1.2/blunt.

El gen se amplificó por PCR a partir del genoma de *A. vinelandii* con los oligonucleótidos YeD y XeR (para mayores detalles ver Materiales y Métodos), obteniendo así el plásmido pJET - *rsmY* (Fig. 22). El plásmido resultante se corroboró por PCR, utilizando los oligonucleótidos anteriores, y por patrón de restricción con *EcoRI*, y *BglII* (Fig. 23) El patrón de restricción daría un peso de 3354 pb cortando con la enzima *EcoRI*, y al cortar con *BglII*, se liberaría el gen *rsmY* observándose un peso de 380 pb, mas un fragmento del peso del vector (2974 pb).

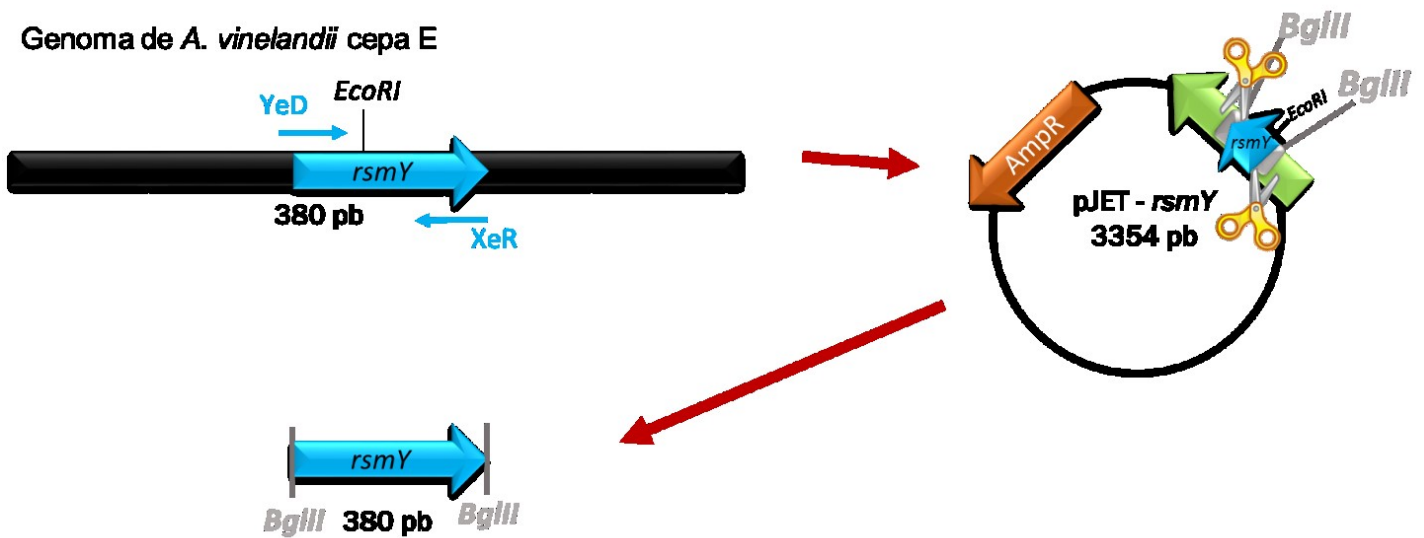
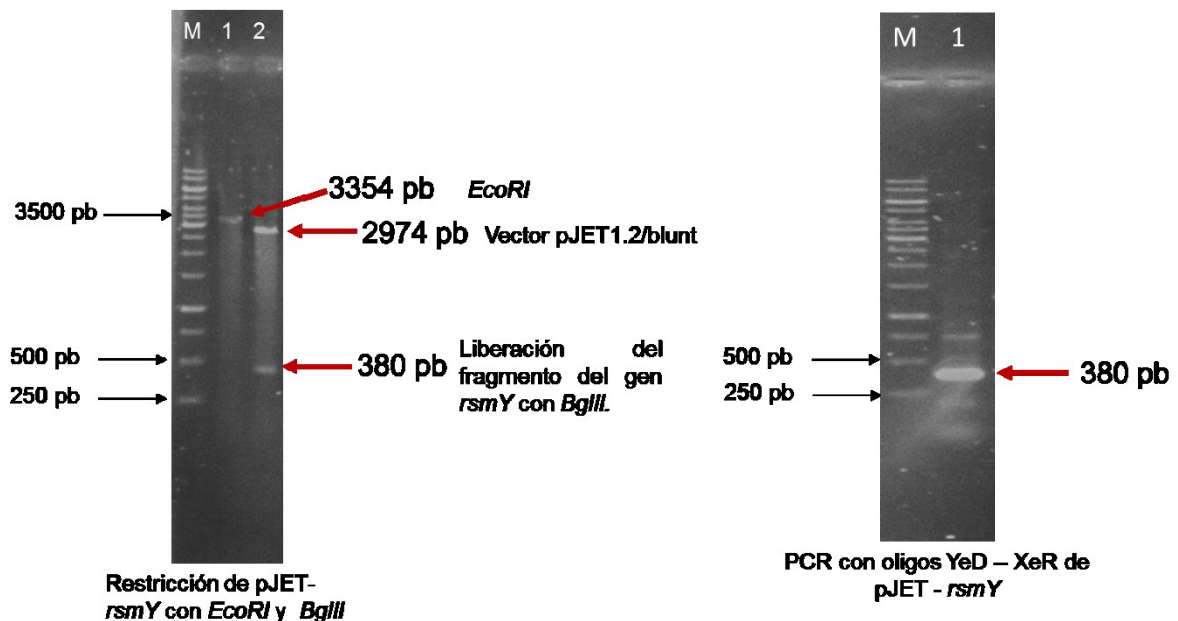


Fig. 22 Esquema de la clonación del sRNA RsmY en el vector pJET1.2/blunt.

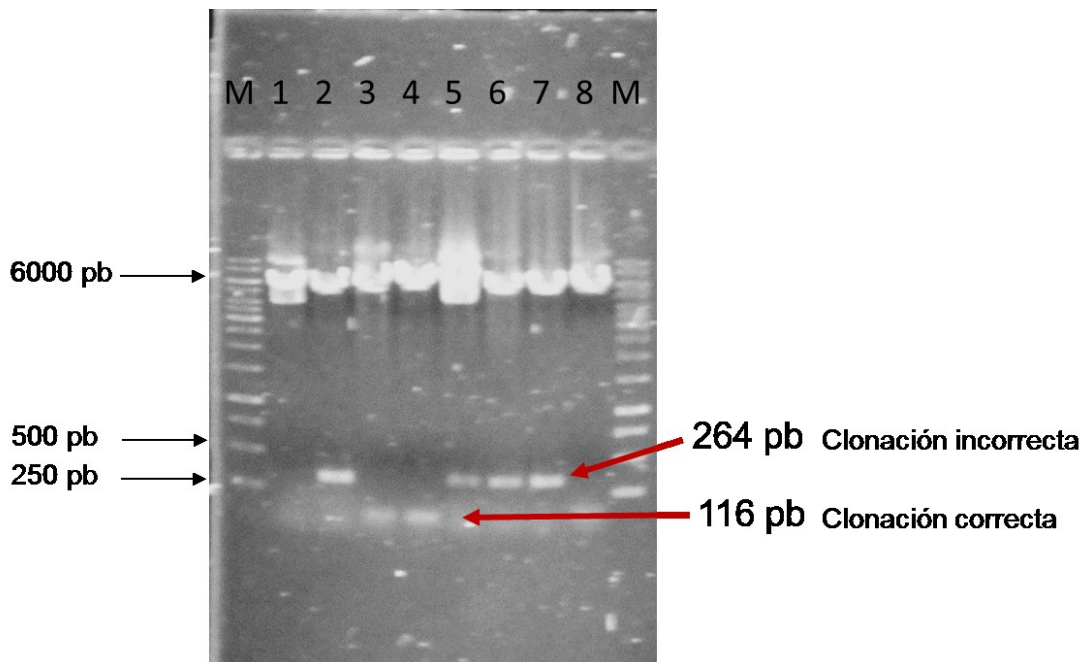
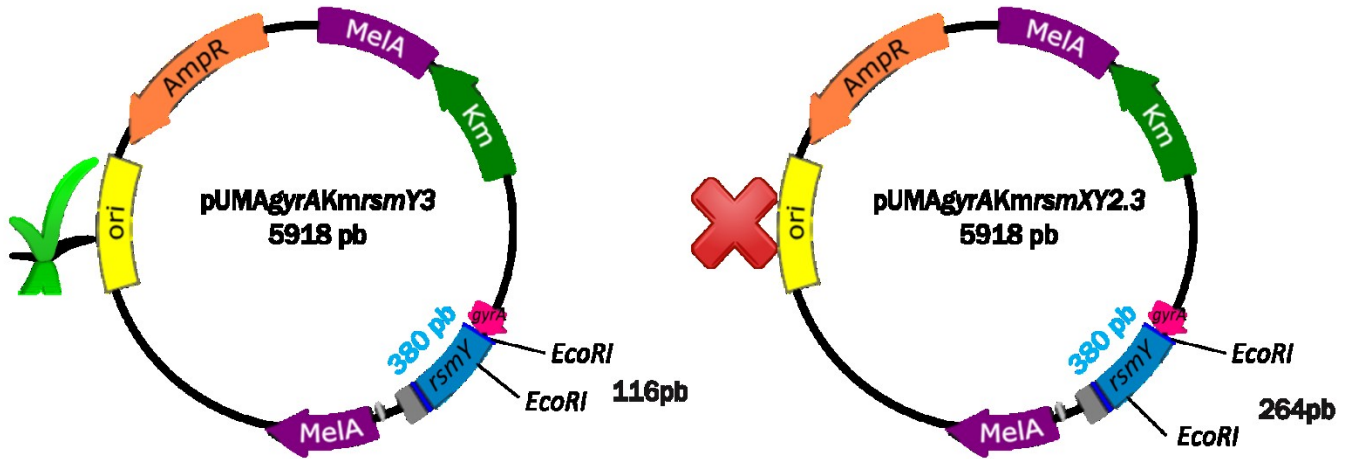


**Fig. 23** Verificación de la clonación del gen *rsmY* en el vector pJET1.2/blunt. Patrón de restricción con las enzimas *EcoRI* y *BglII* respectivamente, y análisis de PCR amplificando el gen *rsmY*.

### **Clonación del sRNA RsmY en el vector integrativo pUMAgyrAKm.**

Una vez obtenido el plásmido pJET-*rsmY*, se escindió el gen con la enzima *BglII*, la cual es compatible con la enzima *BamHI*, y como se observa en la Figura 12, es una enzima única en el sitio de multiclonación del vector pUMAKmtac,. Posteriormente se linealizó el vector integrativo pUMAgyrAKm, con la enzima *BamHI*, se llevó a cabo la ligación, obteniendo los plásmidos pUMAgyrAKm*rsmY*3 (orientación 5' → 3') y pUMAgyrAKm*rsmXY*2.3 (orientación 3' → 5'), los cuales se verificaron mediante patrón de corte con *EcoRI*, evidenciado por un fragmento de 116 pb si la orientación está en sentido a la transcripción a partir del promotor *gyrA*, en caso contrario se visualizaría una banda de 264 pb (Fig. 24 a, b).

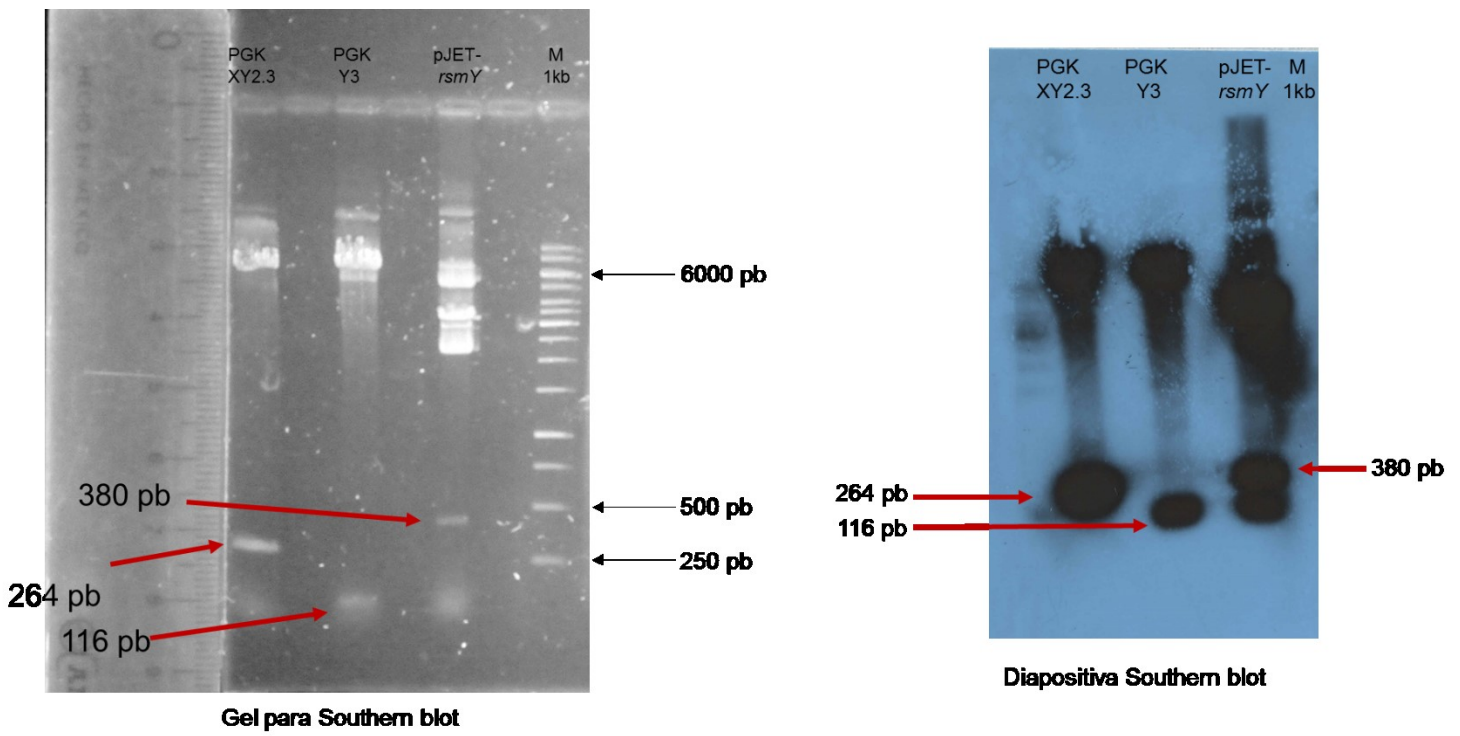
Otra forma de corroborar que el gen *rsmY* se había clonado de manera correcta fue utilizando la técnica de hibridación tipo Southern, marcando como sonda al gen *rsmY* amplificado con YeD – XeR), utilizando al vector pJET – *rsmY* como control [Fig. 25].



Restricción de  
 pUMAgryAKmrsmY3 y  
 pUMAgryAKmrsmXY2.3 con *EcoRI*

24b

**Fig. 24** Verificación de las construcciones pUMAgryAKmrsmY3 y pUMAgryAKmrsmXY2.3. a) Esquema de las construcciones pUMAgryAKmrsmY3 y pUMAgryAKmrsmXY2.3. b) Corrimiento electroforético de las reacciones de la restricción con la enzima *EcoRI*, las cuales liberan fragmentos, de 116 pb (en sentido del promotor *gyrA*) y de 264 pb (en contrasentido del promotor *gyrA*).



45

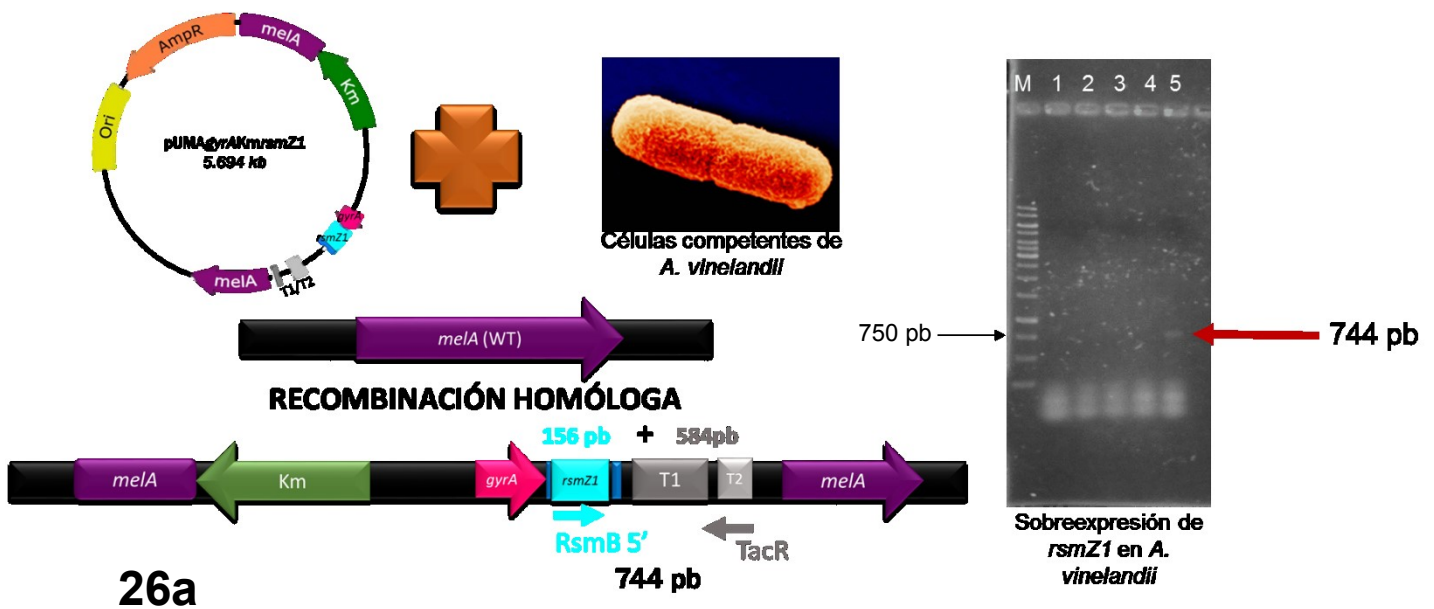
**Fig. 25** Análisis tipo *Southern*, para verificar la clonación del gen *rsmY*, en el vector pUMAgryAKm. En la figura de la izquierda se observa corrimiento electroforético de los plásmidos pUMAgryAKm*rsmXY2.3* (PGKXY2.3), pUMAgryAKm*rsmY3* (PGKY3), los cuales fueron cortados con la enzima *EcoRI*, y pJET – *rsmY* se escindió con *BglII*. PGKXY2.3 se encuentra en sentido contrario a la transcripción en relación al promotor *gyrA* y debe liberar un fragmento de 264 pb, en comparación con PGKY3 se encuentra en sentido a la transcripción y debe liberar un fragmento de 116 pb. pJET – *rsmY* al ser cortado con *BglII* libera el fragmento completo del gen de un peso de 380 pb. En la figura de la derecha se observa la figura del *Southern blot* donde se utilizó como sonda el gen *rsmY*, donde se puede ver que el fragmento de PGKXY2., el de PGKY3 y pJET-*rsmY*, hibrida perfectamente con la sonda y corresponde a los pesos observados en el gel de la izquierda.

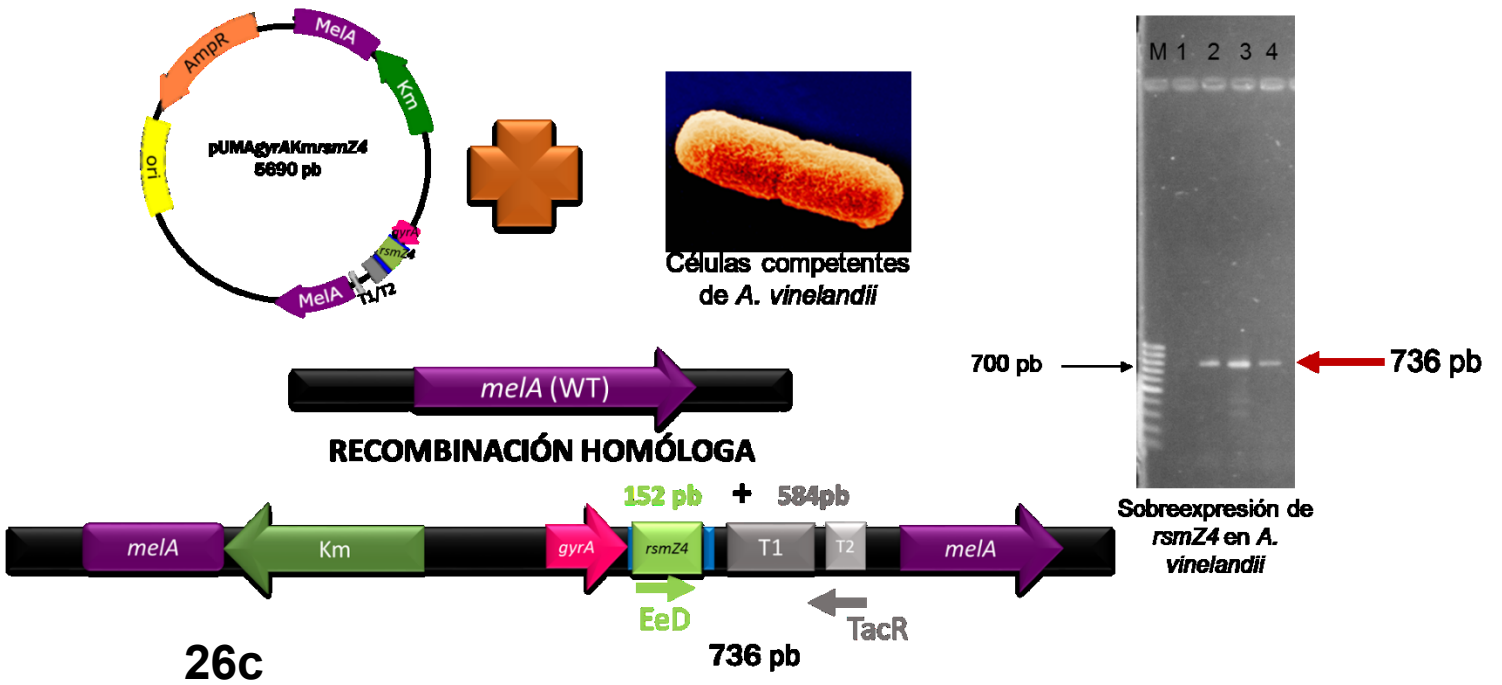
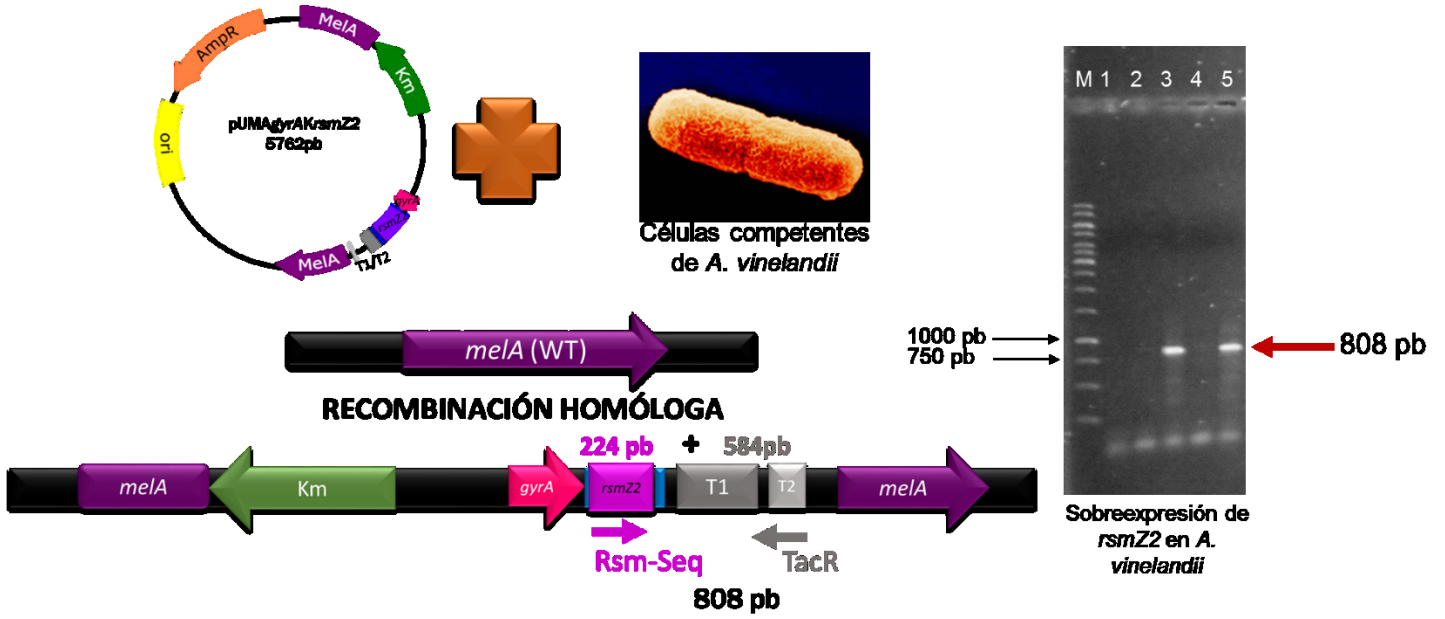
### Sobreexpresión de RsmZ1, RsmZ2, RsmZ4, RsmZ6 y RsmY en *Azotobacter vinelandii*

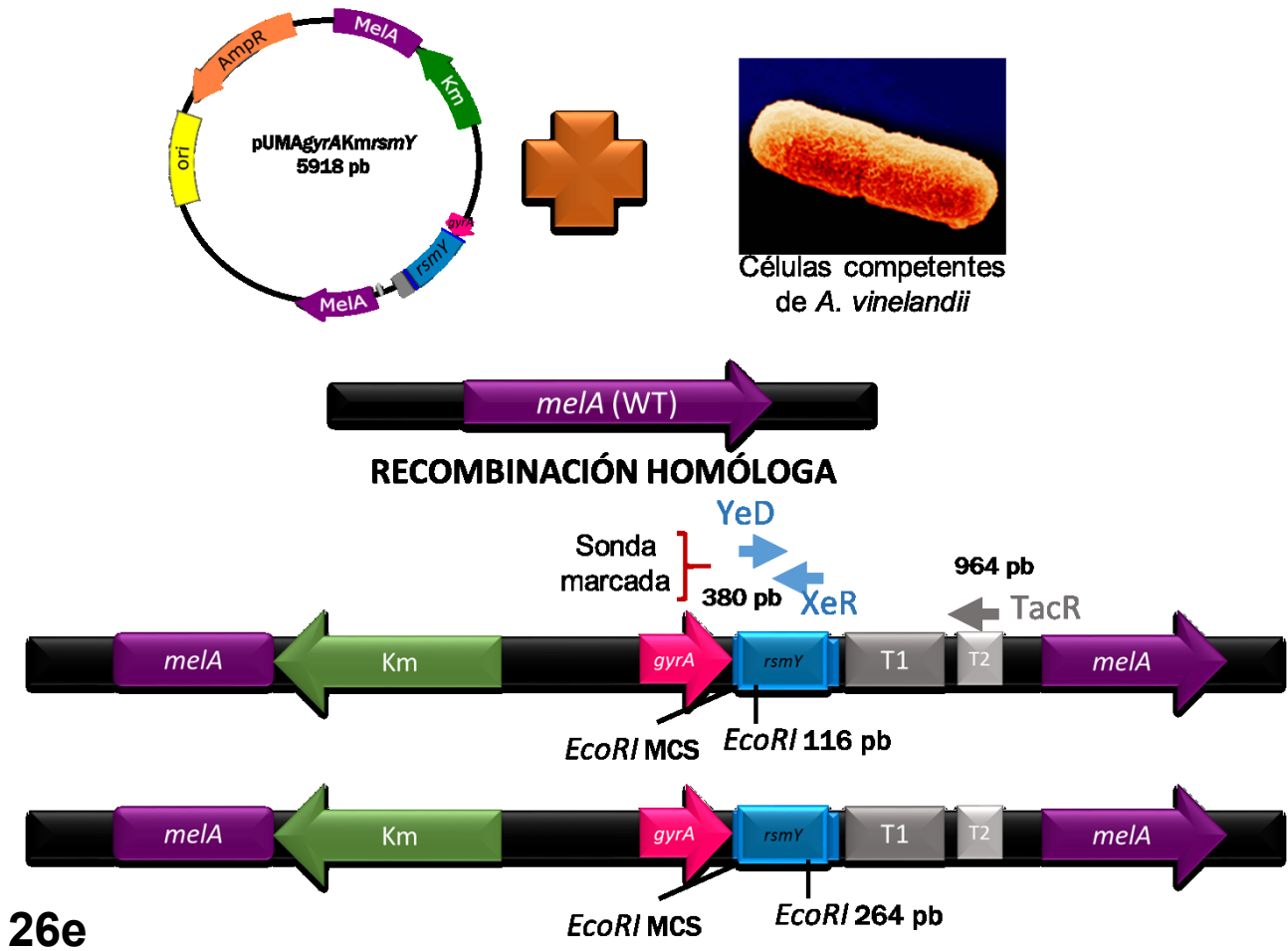
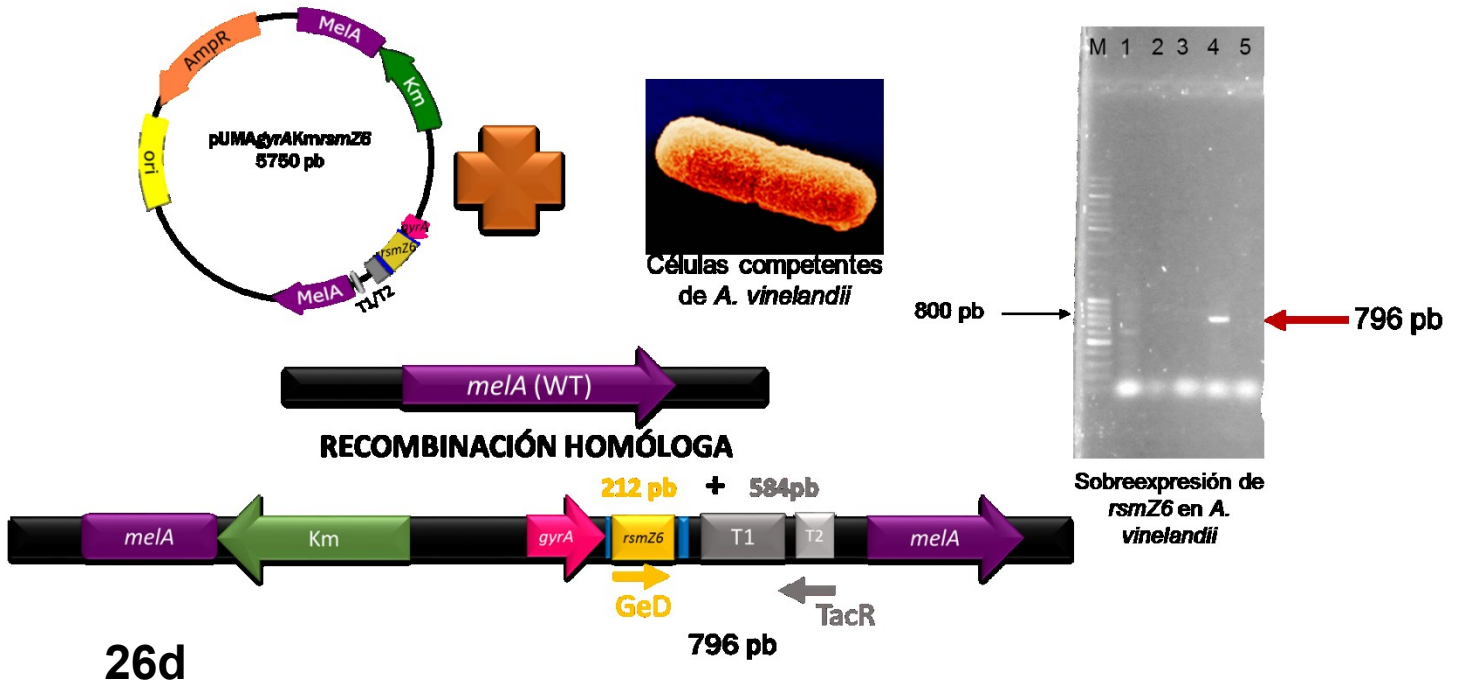
Después de haber obtenido las construcciones de los respectivos sRNAs de estudio, se procedió a transformar en *A. vinelandii*, recuperando recombinantes donde se estableciera la sobreexpresión de RsmZ1, RsmZ2, RsmZ4, RsmZ6 y RsmY. Todas las recombinantes se verificaron por PCR con los mismos oligonucleótidos utilizados para verificar las construcciones de cada uno de los sRNAs (Fig. 26 a, b, c, d) a excepción de RsmY, este se verificó nuevamente por *Southern blot* utilizando a ambos plásmidos (PGKY3, y PGKXY2.3) como control; las recombinantes con ambas orientaciones se amplificaron con los oligonucleótidos YeD – TacR dando un amplificado de 964 pb, tanto los plásmidos como los amplificados de las recombinantes se escindieron con la enzima *EcoRI*, dando un fragmento de 116 pb para la orientación en sentido a la transcripción (PGKY3) y un fragmento de 264 pb para la orientación en sentido contrario a la transcripción (PGKXY2.3). Así mismo en la figura de *Southern blot* se puede observar que ambas recombinantes hibridan con la sonda marcada del gen *rsmY* dando un peso de 380 pb (Fig. 26 e), se obtuvieron ambas orientaciones satisfactoriamente decidiéndose trabajar con las dos. Al ser RsmY el sRNA de

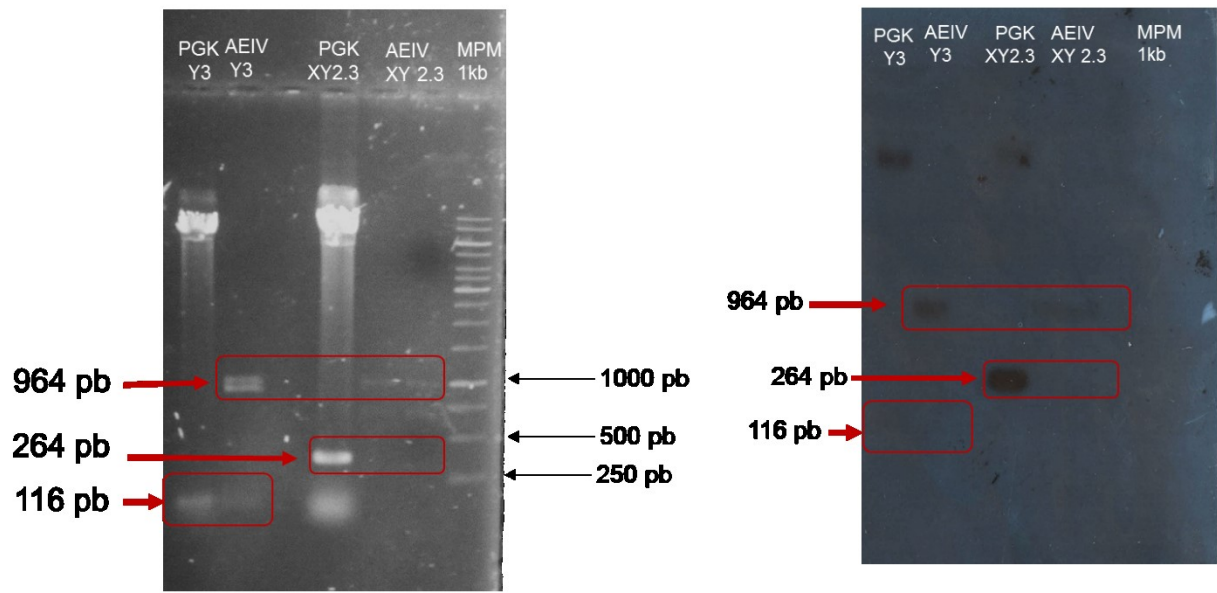
mayor tamaño de la familia nos propusimos estudiar con mayor detalle su función, esperando que la orientación en contrasentido al promotor *gyrA* no tuviera efecto sobre la síntesis de alginato.

El fenotipo hipermucoide se observa en todas las recombinantes, sugiriendo que el sistema funciona adecuadamente (Fig. 27). Sin embargo, la observación es solo cualitativa y en un fondo genético donde existen los otros sRNAs de la familia. Quedaría por verificar este dato cuantificando la producción de alginato en estas cepas. Por estudios en nuestro laboratorio sabemos que todos los sRNAs se expresan en condiciones óptimas para la producción de alginato (48 de cultivo en medio Burk, a 30°C y 2000 rpm) (Fig. 28), y además de que mutaciones en cada uno de ellos (Fig. 29), alteran de manera diferencial la producción de alginato [López–Pliego 2014, datos no publicados], mutaciones en *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ3*, *rsmZ4* y *rsmY*, disminuyen la producción de alginato, pero mutaciones en *rsmZ5*, *rsmZ6* y *rsmZ7*, aumentan la producción de alginato. Ante este hecho cobra relevancia el establecer la función de cada sRNA en ausencia de todos los demás, lo cual podríamos lograr sobre-expresando un sRNA en particular en una mutante *gacA* en la que no se expresa ninguno de ellos.





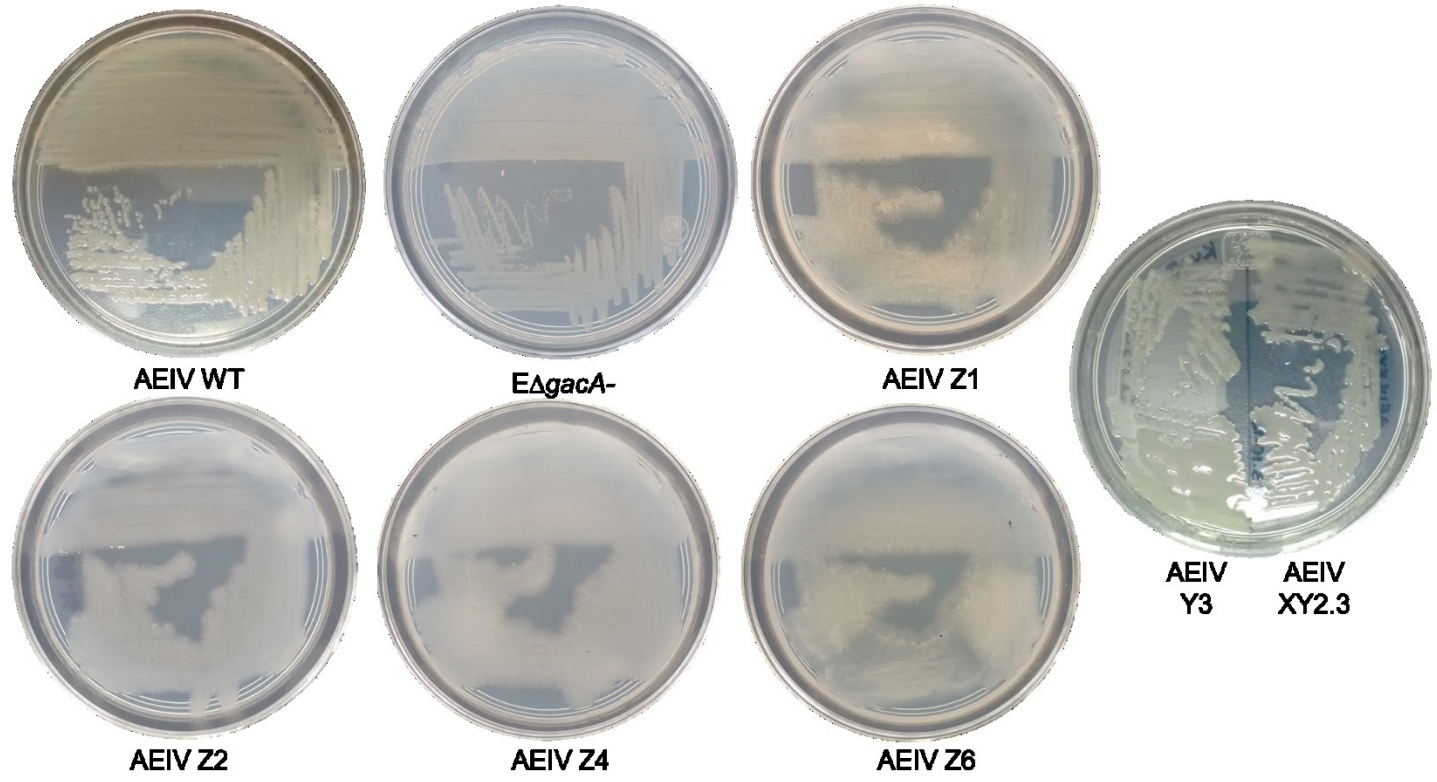




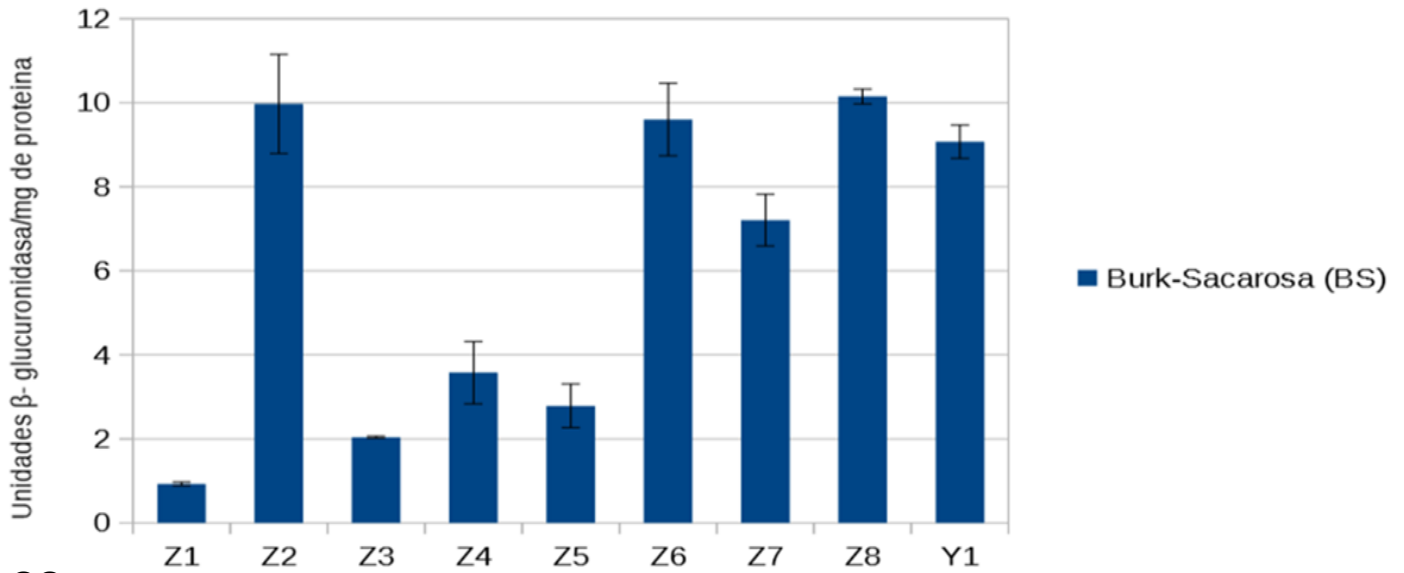
**Gel para Southern blot comprobación de sobreexpresión de *rsmY* en *A. vinelandii*.**

**Southern blot, comprobación de sobreexpresión de *rsmY* en *A. vinelandii*.**

**Fig. 26** Verificación de las recombinantes AEIVZ1, AEIVZ2, AEIVZ4, AEIVZ6 y AEIVY. Verificación, mediante amplificación por PCR de la correcta recombinación en la cepa AEIV del plásmido pUMAgyrAKmrsmZ1 (a) pUMAgyrAKmrsmZ2 (b), pUMAgyrAKmrsmZ4 (c), pUMAgyrAKmrsmZ6 (d) y de los plásmidos pUMAgyrAKmrsmY3 y pUMAgyrAKmrsmXY2.3 (e). La correcta recombinación de estos dos últimos plásmidos se realizó mediante hibridación tipo *Southern blot*,

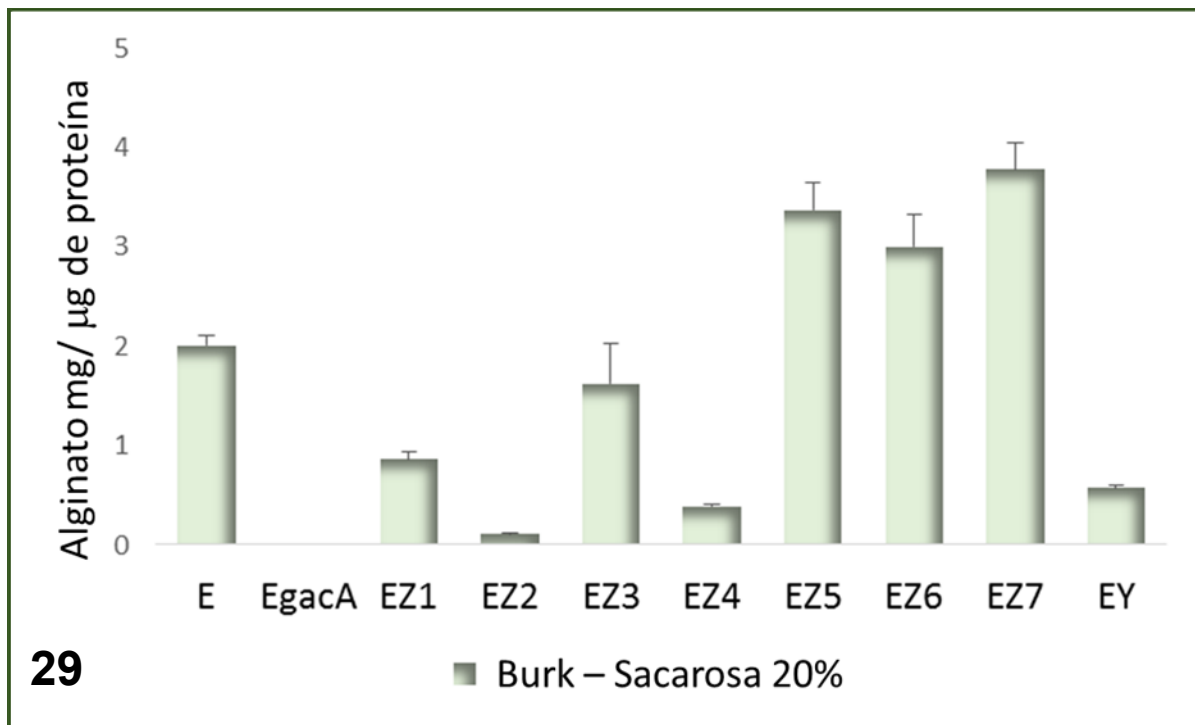


**Fig. 27** Fenotipo de las recombinantes de *A. vinelandii* con la sobreexpresión de *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ6* y *rsmY* (Y3 y XY2.3) en comparación con la cepa silvestre y la mutante *gacA*.



**28**

**Fig. 28** Expresión de los sRNAs Rsm en condiciones favorables para la producción de alginato, (48 hrs, en medio BS líquido a 30 °C en agitación constante) [López-Pliego 2014, datos no publicados].



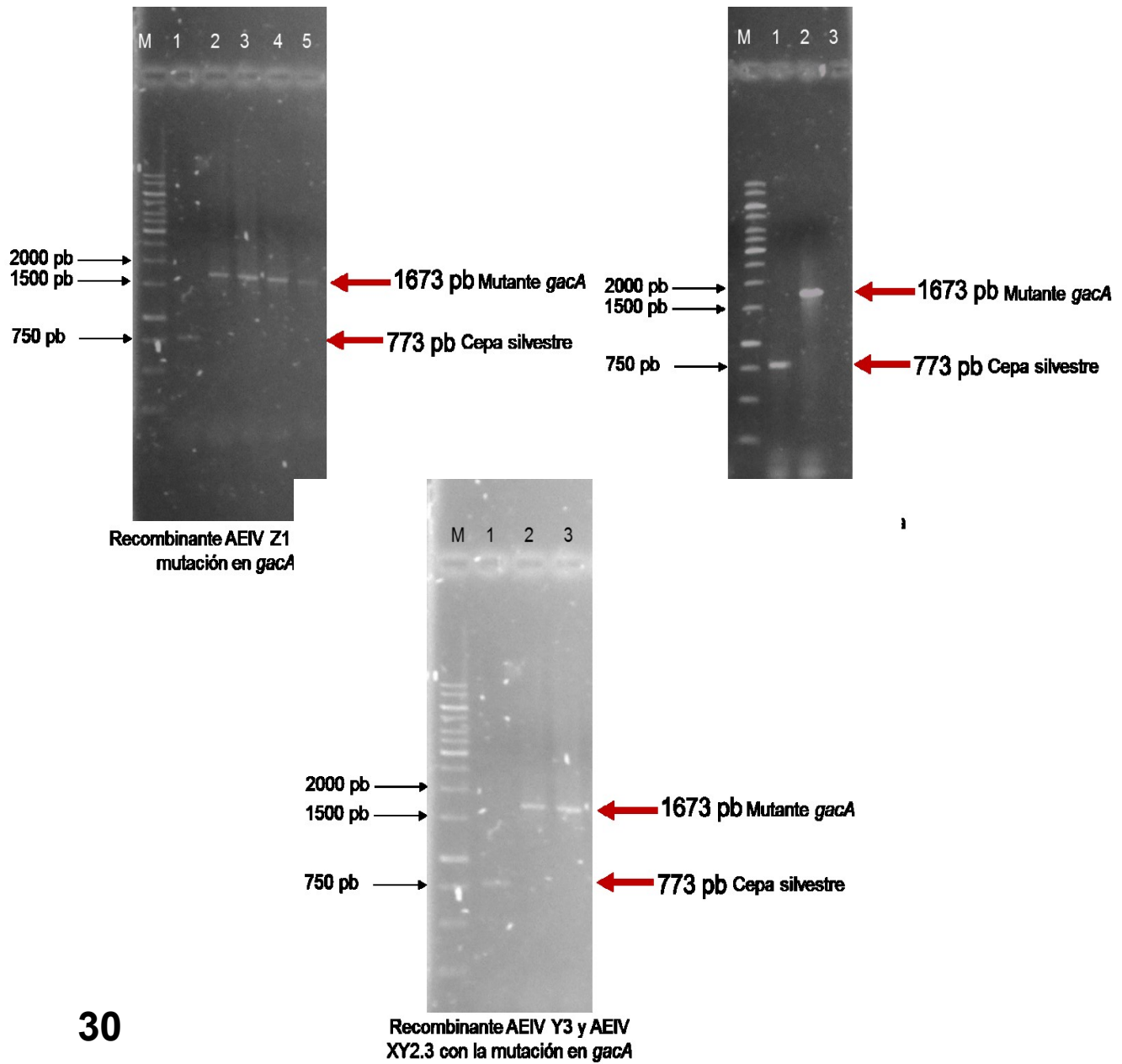
**29**

**Fig. 29** Producción de alginato en las mutantes de cada uno de los sRNAs Rsm. (López-Pliego 2014, datos no publicados).

### **Generación de mutantes *gacA* en las que se sobre-expresan los sRNAs RsmZ1, RsmZ6 y RsmY**

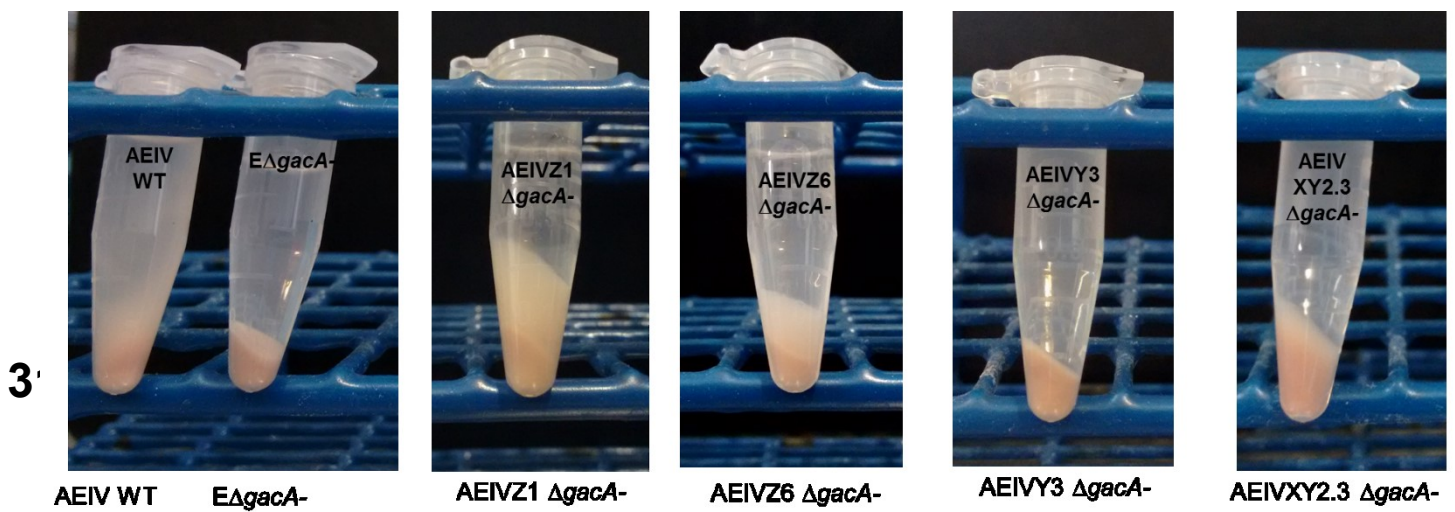
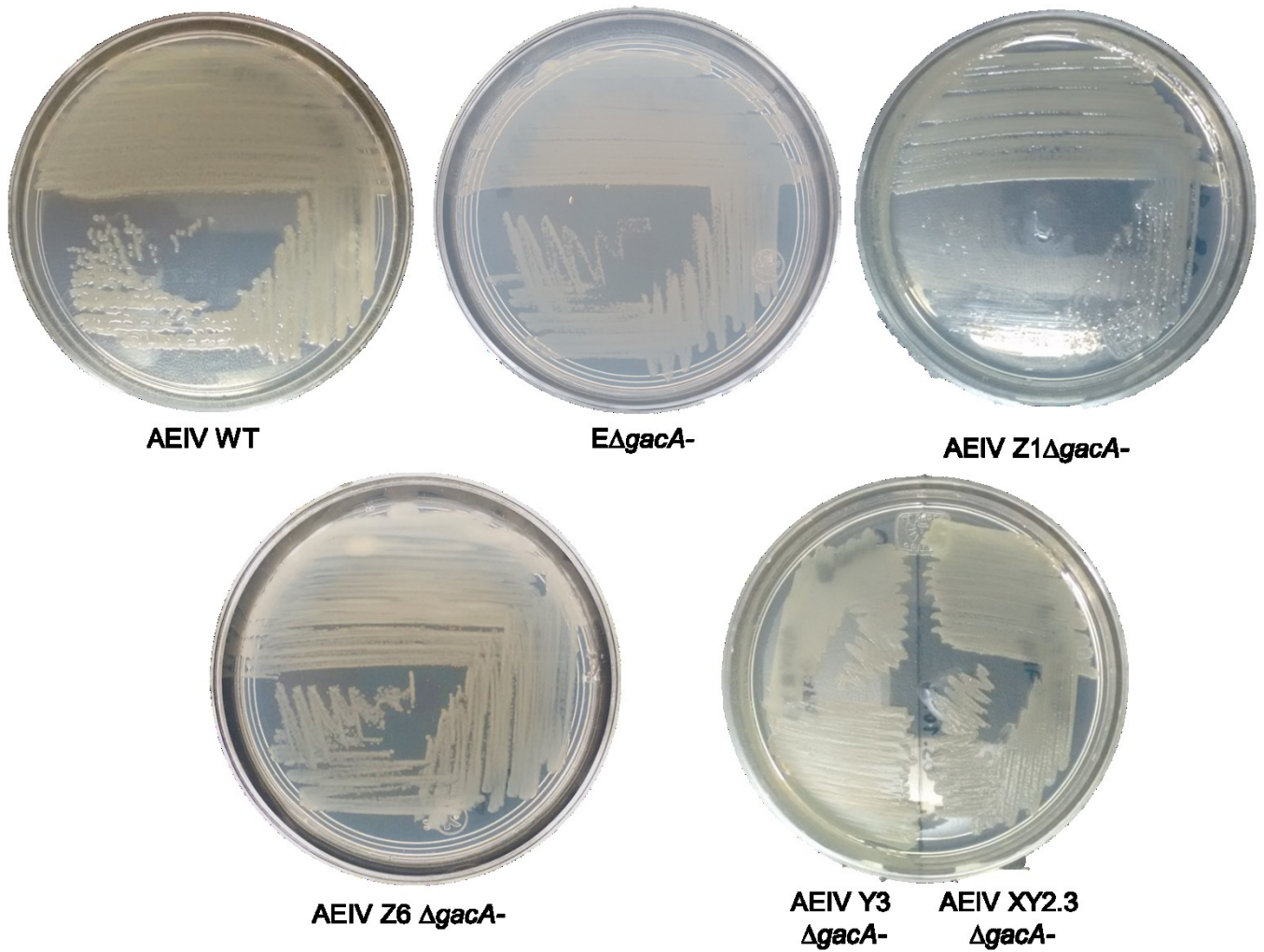
De acuerdo al efecto de las mutaciones correspondientes sobre la producción de alginato, los sRNAs se dividieron en dos grupos: los que regulaban positivamente y los que lo hacen de manera negativa. Para realizar los experimentos de sobre-expresión en mutantes *gacA* se eligieron RsmZ6, que participa de manera negativa en la producción de alginato, y RsmY que lo hace de manera positiva.

Para generar las cepas derivadas con una mutación en el gen *gacA*, se usó el plásmido pSAFA3 (pBlueuscriptKSG*gacA*::Gm)<sup>8</sup>, promoviendo una doble recombinación homóloga que intercambia el *locus* silvestre por el mutante. Las mutaciones se verificaron por análisis de PCR el casete de Gm pesa 900 pb, mientras que el *locus* silvestre *gacA* es de 773 pb, por lo tanto debíamos obtener un amplificado de 1673 pb en el *locus* mutante como se observa en los geles de la Figura 30. Después de corroborar las mutantes procedimos a observar el fenotipo en placa (medio sólido) y medio líquido (tubo) (Fig. 31), para ver si se reestablecía la producción de alginato. Se utilizó a *rsmZ1* como control, pues ya se sabe por trabajos previos que en una mutante *gacA* la expresión constitutiva de *rsmZ1*, no dependiente de GacA, reestablece la producción del polímero (Martínez–Ortíz V.M., 2004) (Referencia). Como se mencionó previamente en el trabajo en el que se reestableció la producción de alginato en una mutante *gacA* por sobre-expresión de *rsmZ1* se llevó a cabo con un plásmido; así mismo y como ya se mencionó, *A. vinelandii* no mantiene estable el DNA extracromosomal, por lo que la restauración de la síntesis del polímero fue transiente e inestable, pero sirvió para los fines que se querían en ese momento. A diferencia de lo anterior podemos ver que el sistema con el promotor constitutivo *gyrA*, generado en este trabajo funciona de manera correcta y estable (Fig. 31), ya que se puede observar que nuestro control (RsmZ1), reestablece la producción de alginato. Sin embargo, quisimos probar si RsmZ6 y RsmY participan en la producción de alginato, donde fenotípicamente se puede apreciar su participación. Sabemos que este sistema es constitutivo, y por lo tanto sobrepasamos la maquinaria natural de la bacteria, por eso mismo no podemos saber, que cantidad de transcritos de cada uno de los sRNAs participan o no, o que tanta afinidad tienen unos por otros y con la proteína RsmA. No obstante, en la Figura 28, se observa la expresión de los sRNAs en condiciones normales para la producción de alginato en la cepa silvestre, en las cuales existe diferencia en la expresión de todos los sRNAs, muy probablemente se necesiten pocos transcritos de unos y muchos de otros para llevar a cabo satisfactoriamente la interacción.



30

Fig. 30 Verificación de la mutación en *gacA* en las recombinantes AEIV Z1, AEIV Z6 y AEIV Y3, XY2.3.



**Fig. 31** Fenotipo en cultivos sólido y líquido de las mutantes *gacA* en las recombinantes AEIV Z1, AEIV Z6 y AEIV Y3, XY2.3.

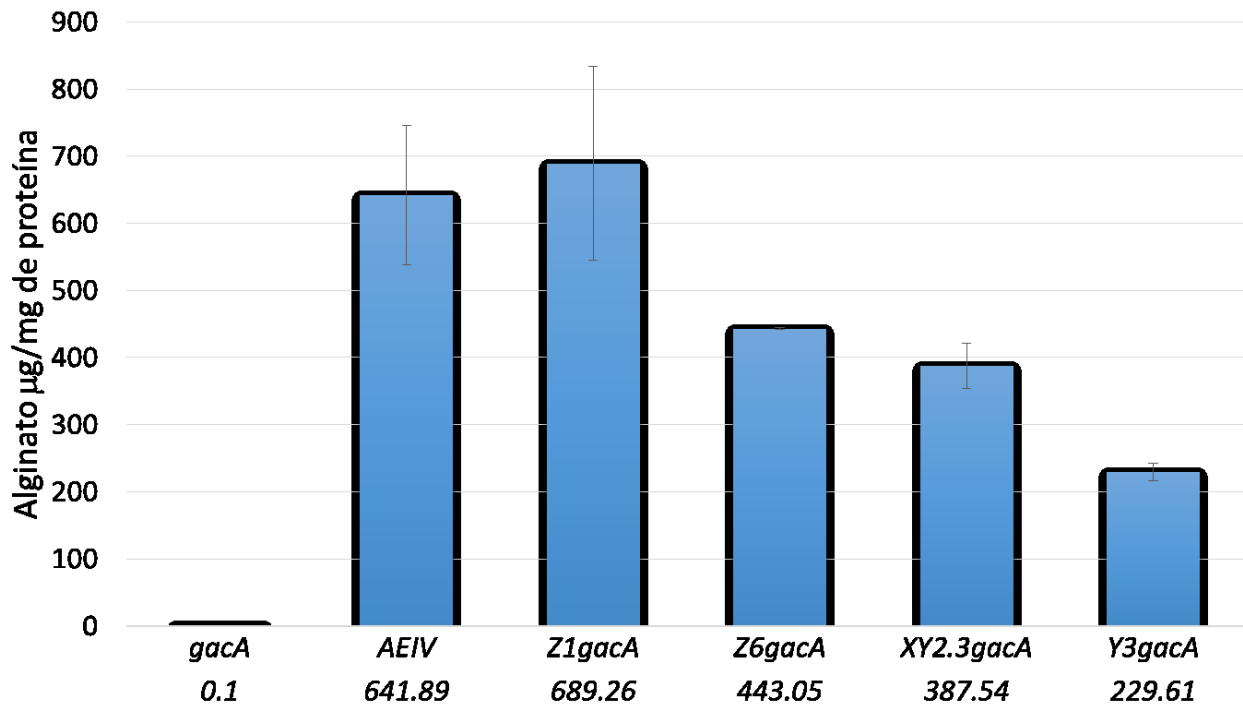
### **Producción de alginato en las mutantes AEIV Z1::*gacA*-, AEIV Z6::*gacA*-, AEIV XY2.3::*gacA*- y AEIV Y3::*gacA*-**

Una vez obtenidas las mutantes *gacA* en el fondo genético de las cepas que sobre-expresan RsmZ1, RsmZ6 y RsmY, se procedió a cuantificar en cada una de ellas la producción de alginato, utilizando la cepa silvestre y la mutante *gacA* como controles. Debido a que el fenotipo más claro se observó en medio sólido cuantificamos directamente de placa. Con la cuantificación de alginato, confirmamos el fenotipo observado en la figura 31, y lo comparamos con la gráfica de la Figura 32, donde se observa que la sobreexpresión de *rsmZ1*, causa una producción similar que la observada en la cepa silvestre como se había reportado previamente (Manzo *et al.*, 2011). La sobreexpresión de *rsmZ6*, también restaura la producción de alginato a niveles semejantes a los de la cepa silvestre. Igualmente la sobreexpresión de *rsmY* también promueve la síntesis de alginato, aunque en menor porcentaje.

El sistema de sobreexpresión generado en este trabajo, al tener un promotor fuerte, podría superar los terminadores de los genes bajo su control. El fenómeno anterior muy probablemente se presentaría para la copia de *rsmY* clonada de manera inversa (XY2.3), la cual restaura la producción de alginato. El transcrito generado en las dos orientaciones de *rsmY* podría adoptar conformaciones similares de tallo y asa funcionales para contrarrestar la función de RsmA.

En relación a la multiplicidad de los sRNAs de la familia Rsm se ha propuesto que todos los sRNAs participan de manera conjunta al interactuar con la proteína RsmA, estableciendo un sistema similar a la llamada proteína-esponja, solo que en este caso los sRNAs generarían una estructura macromolecular que actuaría como RNA esponja donde la interacción con la proteína RsmA protegería a los sRNAs que son susceptibles de ser degradados por la RNasa E.<sup>20</sup>

De acuerdo al modelo anterior los diferentes alelos del sistema Rsm podrían favorecer o desfavorecer la formación de la esponja de acuerdo al equilibrio y predominancia de alguno de ellos. De esta forma el grado de interacción de un sRNA con RsmA de manera aislada podría ser diferente a como lo hacen en conjunto con los demás alelos. De esta manera no sería extraño observar resultados aparentemente contradictorios cuando se sobre-expresa o se muta el gen como lo observamos con RsmZ6. Los resultados de la sobreexpresión de *rsmZ6* confirman su participación en la regulación de la producción de alginato, aunque en una modalidad distinta a RsmZ1, lo cual sugiere la existencia del sistema de RNA – “esponja”, en la que se necesitan de todos los sRNAs para tener un sistema de regulación post-transcripcional óptimo.



## 32

### Sobreexpresión de los sRNAs

Fig. 32 Producción de alginato de las mutantes AEIV Z6 $\Delta$ *gacA*, AEIV XY2.3 $\Delta$ *gacA* y AEIV Y3 $\Delta$ *gacA* utilizando a AEIV Z1 $\Delta$ *gacA* como control (Medio BS sólido, 48 hrs a 30°C).

### CONCLUSIONES

- El sistema de sobreexpresión con el promotor *gyrA*, en el vector integrativo pUMAgyrAKm, funciona de manera correcta en *A. vinelandii*.
- Al igual que RsmZ1, RsmZ6 y RsmY participan en la producción de alginato,
- RsmZ1, juega un papel preponderante en la producción de este polímero.

### PERSPECTIVAS

Mutar *gacA* en las cepas que sobreexpresan los sRNAs Rsm restantes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aarons S., Abbas A., Adams C., Fenton A., and O’Gara F. A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*. 182: 3913–3919. 2000.
2. Aldor I.S, Keasling J. D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 475 – 483. 2003.
3. Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., and Haas, D. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 96: 14073-14078. 1999.
4. Bretl D. J., Demetriadou C., Zahrt T. C. Adaptation to environmental stimuli within the host: two – component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 75: 566 – 582. 2011.
5. Bull, C. T., Duffy, B., Voisard, C., Défago, G., Keel, C., and Haas, D. Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 79:327-336. 2001.
6. Campos ME, Martínez-Salazar J, Lloret L, Núñez C, Espín G, Soberón-Chávez G. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 178:1 793–1799. 1996.
7. Castañeda M., Guzmán J., Moreno S., Espín G. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly –  $\beta$  – hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 182: 2624 – 2628. 2000.
8. Castañeda M., Sanchez J., Moreno S., Nuñez C., Espín G. The global regulators GacA and sigma (S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 183: 6787 – 6793. 2001.

9. Chancey S., Wood D., and Pierson L. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2294-2299. 1999.
10. Chancey, S. T., Wood, D. W., Pierson, E. A., and Pierson, L. S. Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3308-3314. 2002.
11. Chatterjee A., Cui Y., and Chatterjee A.K. RsmA and the quorum-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L homoserine lactone, control the levels of *rsmB* RNA in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by affecting its stability. *Journal of Bacteriology*. 184: 4089–4095. 2002.
12. Chatterjee A., Cui Y., Yang H., Collmer A., Alfaro J. R., Chatterjee A. K. GacA. The response regulator of a two – component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators and alternate sigma factors. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. 16: 1106 – 1117. 2003.
13. Chitnis, C.E., and Ohman, D.E. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Molecular Microbiology*. 8: 583–593. 1993.
14. Clementi F. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17: 327– 361. 1997.
15. Cui, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A. K. Effect of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and Harpin<sub>Ecc</sub>. *Molecular Plant-Microbe Interaction Journal*. 14:516-526. 2001.

16. Da Re, S., Schumacher, J., Rousseau, P., Fourment, J., Ebel, C., and Kahn, D. Phosphorylation-induced dimerization of the FixJ receiver domain. *Molecular Microbiology*. 34: 504-511. 1999.
17. Domínguez – Ojeda, P. 2011 Estudio de la expresión del sRNA, RsmD en *Azotobacter vinelandii*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
18. Duffy, B. K., and Défago, G. Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3142-3150. 2000.
19. Duss O., Michel E., Konté N. D., Schubert M., Allain F. H-T. Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein – RNA recognition. *Nucleic Acids Research*. 42: 5332 – 5346. 2014.
20. Duss O., Michel E., Yulikov M., Schubert M., Jeschke G., Allain F. H – T. Structural basis of the non – coding RNA RsmZ acting as a protein sponge. *Nature*. 509: 588 – 595. 2014.
21. Espín G. CIFN. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
22. Galindo E, Peña C, Nuñez C, Segura D, Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* . *Microbial Cell Factories* 6: 7 –21. 2007.
23. García – Ramírez, L. 2011. Estudio de los sRNAs rsmG y rsmH en *Azotobacter vinelandii*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

24. Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P., and Lin, E. C. Signal decay through a reverse phosphorelay in the arc two-component signal transduction system. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 32864-32869. 1998.
25. Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E. C. Amplification of signaling activity of the arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 35950-35954. 1999.
26. Goiz J. Y. 2008 Estudio de la interacción entre RsmA y el ARN regulador RsmB en *Azotobacter vinelandii*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
27. Goldberg, J.B., Hatano, K., and Pier, G.B. Synthesis of lipopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *Journal of Bacteriology*. 175: 1605–1611. 1993
28. Hay I. D., Rehman Z. U., Moradali M. F., Wang Y., Rehm B. H. A. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*. 6: 637 – 650. 2013.
29. Hay I. D. Wang Y. Moradali M. F., Rehman Z. U. Rehm B. H. A. Genetic and regulation of bacterial alginate production. *Environmental microbiology*. 16: 2997 – 3011. 2014.
30. Heeb S. Hass D. Regulatory roles of the GacS/GacA two – component system in plant – associated and other gram – negative bacteria. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. 14: 1351 – 1363. 2001.
31. Heeb S., Blumer C., and Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*. 184: 1046–1056. 2002.
32. Hernández – Eligio A., Moreno S., Castellanos M., Castañeda M., Nuñez C., Muriel – Millan L. F., Espín G. RsmA post – transcriptionally controls PhbR expression and

- polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 158: 1953 – 1963. 2012.
33. Humair B., Wackwitz B., Haas D. GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 1497–1506. 2010.
  34. Isidro – Coxca, M. I. 2015. Estudio del efecto de la sobreexpresión de los sRNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
  35. Jensen H. L. The Azotobacteriaceae. Department of Bacteriology, State Laboratory of Plant Culture, Lyngby, Denmark. 18: 195 – 214. 1954.
  36. Kay E., Humair B., Déneraud V., Riedel K., Spahr S., Eberl L., *et al.* Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 188: 6026–6033. 2006.
  37. Kobayashi H. Airway biofilms: implications for pathogenesis and therapy of respiratory tract infections. *Treatments in Respiratory Medicine*. 4: 241– 253. 2005.
  38. Koretke K. K., Lupas A. N., Warren P.V., Rosenberg M. and Brown J. R. Evolution of two – component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1956 – 1970. 2000.
  39. Lapouge K., Schubert M., Allain F.H. and Haas D. Gac/ Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*. 67: 241–253. 2008.
  40. Larsen B, Haug A. Biosynthesis of alginate. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydrate Research*; 1 7: 287–296, 1971.

41. Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G., and Haas, D. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 89:1562-1566. 1992.
42. Lin L.P., Sadoff H.A. Chemical composition of *Azotobacter vinelandii* cysts. *Journal of Bacteriology.* 100: 480–486. 1969.
43. Liu, M.Y., and Romeo, T. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *Journal of Bacteriology.* 179: 4639–4642. 1997.
44. Liu Y., Cui Y., Mukherjee A., and Chatterjee A.K. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Molecular Microbiology.* 29: 219–234. 1998.
45. Lloret, L., Barreto, R., Leon, R., Moreno, S., Martinez-Salazar, J.M., Espin, G., Soberon-Chavez, G. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Molecular Microbiology.* 21: 449-457. 1996.
46. Manzo – Merino J. 2008. Caracterización funcional del ARN regulador RsmC en *Azotobacter vinelandii*. Facultad de Ciencias Químicas. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
47. Manzo J., Cocotl-Yanez M., Tzontecomani T., Martinez V.M., Bustillos R., Velasquez C. Goiz Y., Solís Y., López L., Fuentes L. E., Nuñez C., Segura D., Espín G., Castañeda M. Posttranscriptional regulation of the alginate biosynthetic gene algD by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 21: 147–159. 2011.
48. Martínez – Ortiz, V.M. 2004. Caracterización del regulador post – transcripcional rsmB implicado en la regulación metabólica en *Azotobacter vinelandii*. Centro de

Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

49. Mejía-Ruíz H, Moreno S, Guzmán J, Nájera R, León R, Soberón-Chávez G, Espín G. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii algK* mutant. FEMS Microbiology Letters. 156: 101–106. 1997b.
50. Morales – Ruíz, E. 2013. Estudio de sRNAs reguladores involucrados en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
51. Moreno S, Guzmán J, Nájera R, Soberón-Chávez G, Espín G. Role of the alternative  $\sigma$  factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology. 180: 2766–2769. 1998.
52. Mohammadi, Ahmed N. Genetics of bacterial alginate: Alginate Genes Distribution, Organization and Biosynthesis in Bacteria. Current Genomics. 8:193 – 202. 2007.
53. Natsh, A., Keel, C., Pfirter, H. A., Haas, D., and Défago, G. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 introduced into soil microcosms. Applied and Environmental Microbiology. 60: 2553-2560. 1994.
54. Olvera, C., Goldberg, J.B., Sanchez, R., and SoberonChavez, G. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. FEMS Microbiology Letters 179: 85–90. 1999.
55. Paletta, J.L., and Ohman, D.E. Evidence for two promoters internal to the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Current Microbiology. 65: 770–775. 2012.
56. Parkins, M. D., Ceri, H., and Storey, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. Molecular Microbiology. 40: 1215-1226. 2001.

57. Pernesting, A. K., Melefors, O., and Georgellis, D. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 276:225-231. 2001
58. Pernesting A-K., Georgellis D., Romeo T., Suzuki K., Tomenius H., Normark S., Melefors Ö. The *Escherichia coli* BarA – UvrY two – component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *Journal of Bacteriology*. 185: 843 – 853. 2003.
59. Perraud, A. L., Rippe, K., Bantscheff, M., Glocker, M., Lucassen, M., Jung, K., Sebald, W., Weiss, V., and Gross, R. Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1478: 341-354. 2000.
60. Pessi, G., and Haas, D. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Letters*. 200: 73-78. 2001.
61. Rehm B.H.A., Valla S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48:281 – 288. 1997.
62. Rehm B.H.A. Alginates from bacteria. *Biopolymers*. 8:179 – 212. 2002.
63. Rehm B.H.A. Biosynthesis and applications of alginates. Biosynthesis and applications of alginates. In: Wnek G, Bowlin G (eds). *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. Dekker, New York, pp 1– 9. 2005b
64. Rehm B. H. A. Alginate production: Precursor biosynthesis, polymerization and secretion. *Microbiology Monographs*. 13: 55 – 71. 2009.
65. Reusch R.N, Sadoff H.L. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature*.302:268–270. 1983.

66. Rich, J. J., Kinscherf, T. G., Kitten, T., and Willis, D. K. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*. 176: 7468 – 7475. 1994.
67. Robinson, V. L., Buckler, D. R., and Stock, A. M. A tale of two components: A novel kinase and a regulatory switch. *Nature Structural & Molecular Biology*. 7: 626-633. 2000.
68. Romeo T., Vakulskas C. A., Babizke P. Post – transcriptional regulation on global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environmental Microbiology*. 15: 313 – 324. 2013.
69. Romero Y., Guzmán J., Moreno S., Cocotl – Yañez M., Vences – Guzmán M. A., Castañeda M., Espín G., Segura D. The GacS/A – RsmA signal transduction pathway controls the synthesis of alkylresorcinol lipids that replace membrane phospholipids during encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *Public Library of Science*. 1 – 19. 2016.
70. Sadoff H. L. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Review*. 39: 516 – 539. 1975.
71. Saleh, S. S., and Glick, B. R. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 698-705. 2001.
72. Setubal J.C., dos Santos P., Goldman B.S., Ertesvåg H., Espin G., Rubio L.M., Valla S., Almeida N.F., Balasubramanian D., Cromes L., Curatti L., Du Z., Godsy E., Goodner B., Hellner-Burris K., Hernandez J.A., Houmiel K., Imperial J., Kennedy C., Larson T.J., Latreille P., Ligon L.S., Lu J., Maerk M., Miller N.M., Norton S., O'Carroll I.P., Paulsen I., Raulfs E.C., Roemer R., Rosser J., Segura D., Slater S., Stricklin S.L., Studholme D.J., Sun J., Viana C.J., Wallin E., Wang B., Wheeler C., Zhu H., Dean D.R., Dixon R., Wood D. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*. 191: 4 534–4545. 2009.

73. Schurr, M.J., Martin, D.W., Mudd, M.H., Hibler, N.S., Boucher, J.C., Deretic, V. The *algD* promoter-regulation by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cellular & Molecular Biology Research.39: 571576. 1993.
74. Shankar, S., Ye, R.W., Schlichtman, D., Chakrabarty, A.M. Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. 70: 221-255. 1995.
75. Skjak-Braek G, Grasdalen H, Larsen B. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. Carbohydrates Research. 154: 239–250. 1986.
76. Socolofsky, M. D., and Wyss, O. Resistance of the *Azotobacter* cyst. Journal of Bacteriology. 84:119-124. 1962.
77. Stock A. M., Robinson V. L., Goudreau P. N. Two – component signal transduction. Annual Reviews Biochemistry. 69: 183 – 215. 2000.
78. Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli* . J Bacteriol. 184: 5 130–5140. 2002.
79. Terán – Melo, J. L. 2011. Estudio de los RNAs Reguladores RsmX y RsmY en *Azotobacter vinelandii*. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
80. Timmermans J., and Van Melder L. Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. Cellular and Molecular Life Sciences. 67: 2897–2908. 2010.
81. Valverde C., Heeb S., Keel C., RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA – dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Microbiology. 50: 1361 – 1379. 2003.

82. Weibacher T., Suzuki K., Dubey A. K., Wang X., Gudapaty S., Morozov I., Baker C. S., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T. A novel sRNA component of carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 48: 657 – 670. 2003.
83. Whistler, C. A., Stockwell, V. O., and Loper, J. E. Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied & Environmental Microbiology* 66: 2718-2725. 2000.
84. Williams, S. B., and Stewart, V. Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Molecular Microbiology*. 33: 1093-1102. 1999.
85. Willis, D. K., Hrabak, E. M., Rich, J. J., Barta, T. M., Lindow, S. E., and Panopoulos, N. J. Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. *Molecular Plant-Microbe Interaction Journal*. 3:149-156. 1990.
86. Ye, R.W., Zielinski, N.A., and Chakrabarty, A.M. Purification and characterization of phosphomannomutase/ phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*. 176: 4851–4857. 1994.