



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**Licenciatura en Biomedicina  
Eje terminal: Microbiología**

**Laboratorio de Genética Molecular Microbiana**

**“Estudio del efecto regulador de las cinasas RetS y LadS sobre  
la expresión de los sRNAs de la familia Rsm en *Azotobacter  
vinelandii*”**

**TESIS**

**Para obtener el título de  
Licenciada en Biomedicina**

**Presenta:  
Jimena Itzel Reyes Nicolau**

**Director de tesis:  
D. en C. Miguel Castañeda Lucio**

**Puebla, mayo 2018**

## AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis representa un gran logro tanto personal como profesional, en el cual se ve reflejado mi deseo de crecer, aprender y enorgullecer a mis seres queridos, así como a mí misma. Por eso, me gustaría mencionar y agradecer a algunas de las personas cuyo aporte resultó indispensable para concluir satisfactoriamente este trabajo.

A mis papás, que han sido el principal pilar de mi vida en todo sentido. Porque han confiado y sabido apoyar todas las decisiones que he tomado, aún siendo difíciles de aceptar. Porque han estado presentes en cada capítulo de mi vida, siempre animándome a seguir adelante y a ver las cualidades que yo a veces no veo en mí. Porque han dedicado su vida al bienestar y felicidad de sus hijas, haciéndonos sentir siempre, a pesar de la distancia, queridas, apoyadas y plenas. Gracias por haberme permitido vivir estos seis años llenos de experiencias, aventuras y sobre todo muchos aprendizajes, porque aunque estemos lejos, hemos sabido caminar todo este tiempo de la mano. Así que espero enorgullecerlos al menos la décima parte de lo que yo estoy orgullosa de ustedes como personas y de tener el privilegio de ser su hija. Esta tesis es para ustedes.

A Lucy, que ha estado siempre ahí para mí. Que es una persona que admiro profundamente por su fuerza de voluntad, su constancia y su empeño por alcanzar sus objetivos, y que no se rinde hasta alcanzarlos. Porque aunque cada quién haga sus cosas y tengamos metas diferentes, hemos sabido apoyarnos en cada momento importante de nuestras vidas, y espero que siga así por siempre. Gracias por ser mi hermanita.

A Lupita, Ana e Itzel, quienes han demostrado durante muchos años ser verdaderas amigas en las cuales puedo confiar plenamente y porque hicieron estos seis años de carrera una experiencia que me encantó vivir. Porque gracias a ustedes los momentos malos fueron efímeros y los momentos buenos serán inolvidables. Porque aunque ya no estaremos juntas físicamente, las llevo siempre en mi corazón. Gracias por cada momento, las quiero mucho.

A Aarón, por todo el cariño apoyo, y sobre todo alegría que ha brindado a mi vida. Al ser una persona de quien he aprendido mucho y haber demostrado ser alguien en quien puedo confiar plenamente. Que he tenido la oportunidad de pasar con él bellos momentos de mi vida y que nos faltan todavía muchos más por compartir. Gracias por hacerme querer ser mejor persona cada día.

A mis compañeros de laboratorio, que durante estos cuatro años he visto irse y llegar. A Ara, Lari, David, Vicky, Thali, Vale, y a los más recientes Paco, Mau, Brenda, Lennis, Diego, Ram, Emmanuel, Diana, Alan y Judith. Porque nos hemos visto crecer académica y personalmente, y hemos estado presentes en los buenos y malos momentos de cada uno, apoyándonos o festejando juntos. Gracias por sacarme tantas sonrisas y hacerme sentir como en casa.

A la Doctora Beatriz Baca, cuyas enseñanzas dentro del salón de clases y durante este proceso de tesis las llevo y las llevaré siempre presentes durante mi formación como futura Investigadora. Gracias por su ayuda y su excelente disposición a ayudar.

A Lili, que ha sido mi maestra en el salón de clases, en el laboratorio y en la vida. Porque sus enseñanzas y su ayuda me permitieron elaborar esta tesis, la cual he disfrutado hacer a cada momento. Porque sus palabras de aliento en momentos difíciles me hicieron sentir apoyada y con ánimos para seguir adelante. Gracias Lili, eres un ejemplo de esfuerzo, trabajo y constancia a quien siempre voy a admirar y recordar con cariño.

Al Doctor Miguel Castañeda, con quien estoy profundamente agradecida por darme la increíble oportunidad de trabajar junto a él y ser parte de su equipo de trabajo durante tantos años. Porque gracias a él aprendí lo que es hacer “ciencia de verdad” y también porque me hizo darme cuenta de que la investigación es lo que quiero hacer toda mi vida. Muchas gracias por su calidez, su optimismo y su constancia, fue un honor ser su alumna y haber podido trabajar en este proyecto.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por haberme abierto sus puertas hace seis años, por permitirme estudiar, aprender y trabajar en lo que más me gusta y por darme las herramientas para ser una profesional exitosa.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| Resumen .....  | 1         |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1. Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....  | 2         |
| 1.2. Sistemas reguladores de doble componente.....   | 3         |
| 1.3. Sistema de doble componente GacS/GacA .....   | 4         |
| 1.4. Sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZ.....   | 5         |
| 1.5. Producción de metabolitos secundarios en <i>A. vinelandii</i> regulados por el sistema GacS/A-RsmZ/Y .....                              | 6         |
| 1.6. Señales de activación del sistema GacS/A (BarA/UvrY) .....  | 8         |
| 1.7. Las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS en <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. fluorescens</i> ..   | 9         |
| <b>2. ANTECEDENTES .....</b>   | <b>12</b> |
| 2.1. Las cinasas histidínicas RetS, LadS y GacS en <i>A. vinelandii</i> .....  | 12        |
| 2.2. Ensayos de doble híbrido RetS/GacS y LadS/GacS en <i>A. vinelandii</i> .....  | 13        |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>4. HIPÓTESIS CIENTIFICA .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>5. OBJETIVOS.....</b>   | <b>15</b> |
| 5.1. Objetivo general .....  | 15        |
| 5.2. Objetivos específicos.....  | 15        |
| <b>6. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS .....</b>   | <b>16</b> |
| 6.1. Generación de mutantes en <i>retS</i> y <i>ladS</i> de <i>A. vinelandii</i> .....   | 16        |
| 6.2. Caracterización de las mutantes en <i>retS</i> y <i>ladS</i> sobre los fenotipos que regula el sistema Gac/Rsm.....                     | 20        |
| 6.3. Determinación de la regulación ejercida por RetS sobre la expresión de los <i>rsms-sRNAs</i> .....                                      | 25        |
| 6.4. Generación de una nueva mutante <i>retS</i> en el dominio catalítico .....  | 27        |
| 6.5. Caracterización de nueva mutante <i>AEIV retS</i> .....   | 32        |
| 6.6. Determinación de la regulación ejercida RetS sobre la expresión de los <i>rsms-sRNAs</i> a partir de la nueva mutante <i>retS</i> ..... | 34        |
| 6.7. Efecto de la fijación de nitrógeno sobre la expresión de los <i>rsm-sRNAs</i> en la mutante <i>retS</i> .....                           | 36        |
| <b>7. DISCUSIÓN .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>8. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>55</b> |

## Resumen

En procariotas, la principal forma por la cual se detectan señales del medio y se transducen en respuestas adaptativas se establece a través de los sistemas de doble componente. Generalmente, esos sistemas se componen por una cinasa histidínica (HK) localizada en la membrana citoplasmática y su regulador de respuesta. Una vez detectada la señal, se activa una cascada de fosforilación la cual culmina en la regulación transcripcional de los genes blanco del sistema.

En *A. vinelandii* la capacidad de producir metabolitos secundarios, como el exopolisacárido alginato, el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), los sideróforos pioverdinas y los lípidos fenólicos alquilresorcinoles, está controlada por el sistema de doble componente GacS/A. Este consta de la cinasa histidínica (HK) GacS y su regulador de respuesta GacA, el cual controla a sus blancos de regulación activando la transcripción de nueve pequeños RNAs reguladores (sRNAs) pertenecientes al sistema de regulación post-transcripcional Rsm, los cuales antagonizan actividad represora de la proteína RsmA.

En *P. aeruginosa* existen otras dos HKs que actúan sobre el sistema Gac/Rsm y que, como en el caso de GacS, son HKs híbridas ya que poseen dominios citoplásmicos adicionales. La primera, RetS, actúa como un regulador negativo del sistema y la segunda, LadS, como regulador positivo. En trabajos previos en el laboratorio se encontró la presencia de ambas HKs en *A. vinelandii* y también se generaron datos preliminares que sugieren la interacción entre RetS y GacS. Por lo anterior, en este trabajo se propuso ahondar en la investigación de las funciones de RetS y LadS en *A. vinelandii*. Se construyeron mutantes en ambos genes y se caracterizó la producción de cuatro metabolitos mencionados que son regulados por el sistema Gac/Rsm. Se observaron efectos contrarios a los esperados para cada cinasa, lo cual sugiere que RetS podría estar actuando como un regulador positivo y LadS como regulador negativo del sistema. Por otra parte, se cuantificó la expresión de cuatro de los *rsm*-sRNAs en la mutante *retS* y se observó una marcada disminución de su expresión en comparación con el fondo genético silvestre. Estos resultados fueron corroborados una segunda cepa mutante *retS*, en la que se mutó el dominio catalítico de la cinasa. Posteriormente se midió la expresión de los sRNAs en condiciones diazotróficas y adiazotróficas y observamos que en condiciones adiazotróficas, la expresión de estos *rsm*-sRNAs en la mutante *retS* aumenta en comparación con su expresión en la cepa silvestre, lo que permite concluir que la regulación que ejerce RetS sobre el sistema Gac/Rsm en *A. vinelandii* responde de las condiciones de fijación de nitrógeno.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria Gram-negativa de la familia *Pseudomonadaceae*, perteneciente a las gamma-proteobacterias. Es aerobia obligada, de vida libre encontrada en suelos y aguas de todo el mundo. Tiene un cromosoma de 5.36 Mbp y un contenido de G-C 65.7%, además de que sus células son largas y ovoides con un diámetro de 1.5 a 2 micrómetros (Setubal *et al.*, 2009).

*A. vinelandii* presenta características por las que es objeto de estudio, como el hecho de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno por tres complejos diferentes de nitrogenasas, poseer mecanismos poco usuales que protegen a este complejo de la inactivación, así como por la versatilidad de su metabolismo (Sadoff, 1975). Este microorganismo produce metabolitos secundarios como fitohormonas (reguladoras del crecimiento de plantas), sideróforos (importantes en la interacción plantas-microorganismo) (Narula *et al.*, 2000), alquilresorcinoles (Reusch *et al.*, 1979), y dos polímeros de interés industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) (Galindo *et al.* 2007).

Esta bacteria es capaz de adaptar su metabolismo a diversas fuentes de nutrientes. Si no hay abastecimiento de carbohidratos presentes en el medio, sufre un proceso de diferenciación celular para formar quistes resistentes a la desecación y otras condiciones adversas (Setubal *et al.*, 2009). Estos consisten en una célula oval, conocida como cuerpo central que contiene un gran número de gránulos de PHB, recubierto por una cápsula compuesta por dos capas llamadas intina y exina de las cuales el 32 y el 13% de su peso seco, respectivamente, es alginato (Reusch, 1983). Durante este proceso, los fosfolípidos de membrana son reemplazados por alquilresorcinoles, lípidos que también se integran a la exina (Romero *et al.*, 2016).

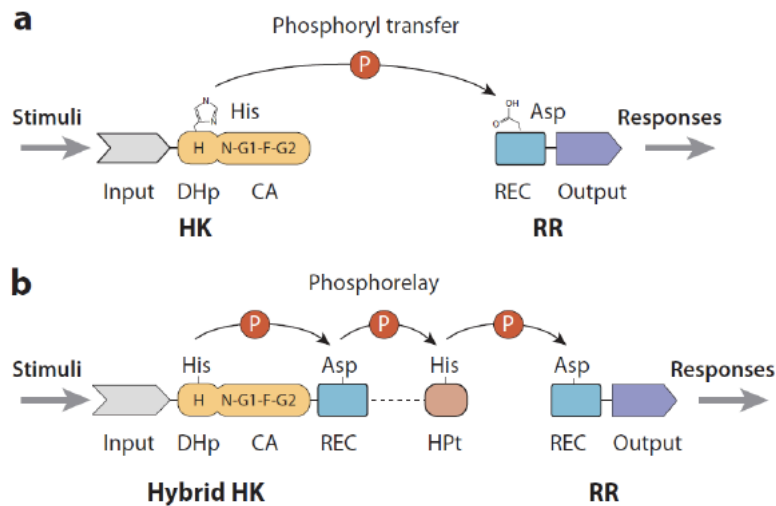
## 1.2. Sistemas reguladores de doble componente

Una manera de detección de señales del medio ampliamente distribuido en bacterias son los sistemas de doble componente (TCS por sus siglas en inglés), los cuales están compuestos por una cinasa histidínica (HK) y su regulador de respuesta. Estos juegan un papel importante en los eventos de señalización como comunicación célula-célula, adaptación ambiental, y patogénesis en el caso de patógenos (Wang, 2012).

Las HKs en general tienen un dominio de detección periplásmico, una región transmembranal y un dominio citosólico de dimerización y autocinasa, sin embargo, se han descrito HKs que están localizadas en el citosol o que presentan duplicación de dominios. De acuerdo con el dominio citoplasmático, se pueden clasificar como HK clásicas y no clásicas (Figura 1). Las HK clásicas tienen un dominio de entrada, un dominio DHp de dimerización ya que estas funcionan en forma dimérica, que además contiene el residuo de histidina que va a ser fosforilado y finalmente un dominio catalítico (CA) que es responsable de la fosforilación de la histidina. Las HKs no clásicas tienen dominios adicionales a los de las cinasas clásicas llamados REC y Hpt, nombrándose híbridas si únicamente contienen REC como dominio adicional (Parkinson & Kofoid, 1992). Estas se ven involucradas en múltiples reacciones de fosfotransferencia llevando a cabo un mecanismo llamado de fosforelevo en donde el grupo fosfato tiene la siguiente trayectoria: DHp(His)-> REC(Asp)-> HPT(His)->REC(Asp) (Kwon *et al.* 2000)

El regulador de respuesta por su parte está típicamente compuesto por dos dominios, el dominio REC o receptor y el dominio efector. El primero cuenta con un residuo de aspartato que recibe el grupo fosfato de su HK, lo cual induce un cambio conformacional y altera la función del segundo dominio, el efector. Este generalmente contiene un motivo de unión a DNA, resultando en la modulación de la expresión de genes blanco (West, 2001), pero también puede tener funciones enzimáticas, de interacción proteína-proteína y de unión a RNA (Gao *et al.*, 2007).

En muchos casos, las HK son bifuncionales y también cuentan con actividad fosfatasa, catalizando la remoción del grupo fosfato del regulador de respuesta, de manera que la señal transducida por el segundo componente evidencia el equilibrio entre la actividad cinasa y fosfatasa (Capra, 2012).



**Figura 1. Mecanismos de activación de los sistemas de dos componentes.** A) Sistema de doble componente con histidín cinasa clásica, B) Sistema de doble componente con histidín cinasa no clásica. (Tomada de Gao & Stock, 2009).

### 1.3. Sistema de doble componente GacS/GacA

La cinasa histidínica GacS y su regulador de respuesta GacA (Homólogo al sistema BarA/UvrY en *E.coli*) están presentes en una gran cantidad de gammaproteobacterias, entre ellas *A. vinelandii*. Este sistema de doble componente regula una amplia variedad de procesos fisiológicos, como son la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares, la formación de biopelículas, el *quorum sensing* y la movilidad (Haas & Defago, 2005).

GacS es una HK no clásica, la cual tiene un dominio sensor entre dos motivos transmembranales, así como los dominios REC y HPT en la región citoplasmática, por lo que es capaz de llevar a cabo el mecanismo de fosforelivo. GacA por su parte tiene un motivo de unión a DNA de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) en su dominio de salida el cual actúa como un regulador transcripcional de genes blanco (Lapouge *et al.*, 2008).

## 1.4. Sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZ

A pesar de que se desconoce la señal que activa a GacS, el regulador de respuesta GacA regula positivamente la expresión de sRNAs pertenecientes al sistema de regulación post-transcripcional Rsm (Lapouge *et al.*, 2008). Este es homólogo al sistema Csr de enterobacterias, el cual coordina en *E. coli* el metabolismo central del carbono, motilidad y las propiedades de la superficie celular y adherencia (Romeo, 1998).

*A. vinelandii* presenta ocho sRNAs de la familia Z (RsmZ1-Z8) y uno de la familia Y (RsmY) (CsrB) (Manzo *et al.* 2011), los cuales antagonizan la actividad de RsmA (CsrA), proteína que facilita la degradación de mRNAs específicos pegándose cerca de su sitio de unión a ribosoma, impidiendo así su traducción y promoviendo su degradación a través del complejo RNAsa E. Esto es llevado a cabo debido a que los sRNAs, una vez transcritos, adaptan formas de tallo y asa, las cuales presentan secuencias similares a las que se une RsmA en los mRNAs blancos, razón por la cual los nueve *rsm*s-sRNAs son capaces de secuestrar a esta proteína y dejar libre los mRNAs, posibilitando así su traducción (Figura 2) (Romero *et al.*, 1998) (Hernández-Eligio *et al.*, 2012) (Manzo *et al.* 2011).

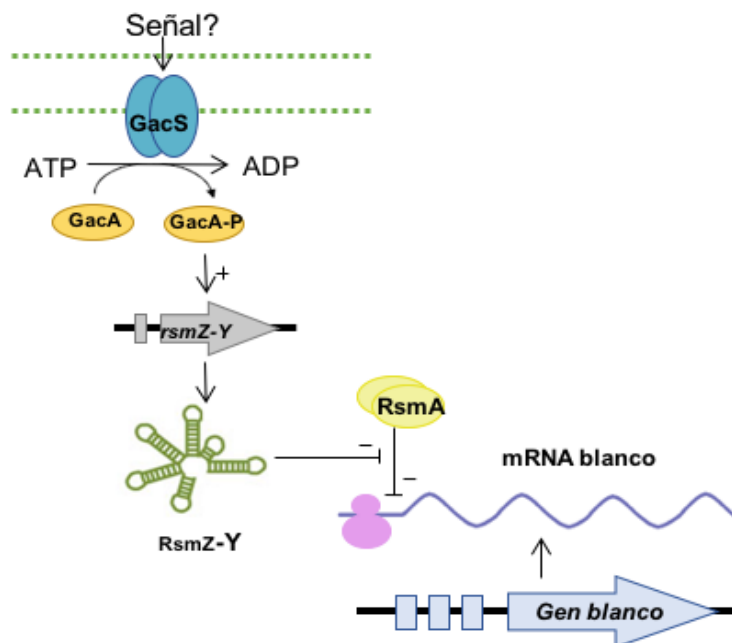


Figura 2. Cascada de regulación Gac/Rsm en *A. vinelandii*.

### 1.5. Producción de metabolitos secundarios en *A. vinelandii* regulados por el sistema GacS/A-RsmZ/Y

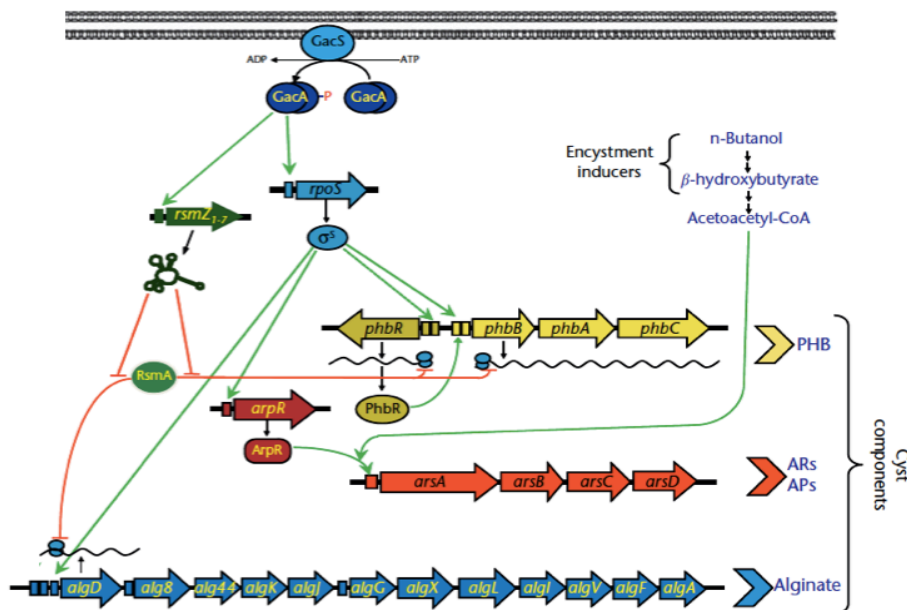
En *A. vinelandii*, el sistema GacS/A en conjunto con el sistema Rsm controlan la síntesis de alginato (Castañeda *et al.*, 2000), de PHB (Hernández-Eligio *et al.*, 2002) y de alquilresorcinoles (Romero *et al.*, 2016), siendo estos tres polímeros componentes de los quistes, así como también controlan la síntesis de pioverdinias (Datos no publicados).

El alginato es un exopolisacárido aniónico lineal compuesto por monómeros de ácido D-manúronico (M) y su epímero ácido L-gulurónico (G) unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Los polímeros pueden contener bloques hetero- (MG) y homopoliméricos (GG o MM), siendo que a mayores proporciones de bloques G, se presenta mayor rigidez (Navarro, 2010). El alginato en esta bacteria, además de constituir la mayor parte de la cápsula del quiste, es producido durante su estado vegetativo como una barrera de difusión de oxígeno para protección de sus nitrogenasas, lo que le confiere un fenotipo mucoide (Hay, *et al.* 2014). Su biosíntesis está regulada por el sistema GacS/A mediante el control post-transcripcional del gen *algD* a través del sistema Rsm, transcrito que codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa que es clave para la biosíntesis del polímero. Al activarse el sistema Gac, aumenta la expresión de los *rsms*-sRNAs, liberando al RNA mensajero de *algD* de la actividad represora dada por RsmA, permitiendo así su síntesis (Manzo *et al.*, 2011).

El poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es poliéster con propiedades termoplásticas y biodegradables, el cual es producido en fase estacionaria por *A. vinelandii* en respuesta a la limitación de nutrientes esenciales, pero en condiciones de exceso de carbono, este se almacena en forma de gránulos intracelulares como reserva de carbono y energía (Setubal *et al.*, 2009). De la misma manera que actúa para alginato, RsmA bloquea la síntesis de PHB pegándose y secuestrando al mensajero del operón biosintético *phbBAC* y de su regulador *phbR*, siendo que una vez encendido el sistema Gac/Rsm, se permite la producción de este poliéster (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

Otros de los metabolitos producidos por *A. vinelandii* son los lípidos fenólicos llamados alquilresorcinoles (AR) y alquilpironas (AP). La inducción del enquistamiento con n-butanol o  $\beta$ -hidroxibutirato resulta en la síntesis de AR y AP que reemplazan los fosfolípidos de la membrana y son componentes de la exina. Su síntesis está controlada por el sistema Gac/Rsm mediante la represión por RsmA del mensajero del regulador *arpR*, factor necesario para transcripción del operón biosintético *arsABCD* (Figura 3) (Romero *et al.*, 2016).

Además, *A. vinelandii* produce cuatro sideróforos: el compuesto fluorescente azotobactina, semejante a las pioverdinas de *Pseudomonas*, así como tres catecolatos, azotoquelina, aminoquelina y protoquelina (Tindale *et al.*, 2000). En relación a la biosíntesis de la azotobactina, se ha reportado que el gen *pvdD* que codifica para una sintasa peptídica no ribosomal (NRP) (Yoneyama *et al.*, 2011). A través de genómica comparativa se reportó que *A. vinelandii* posee otros tres genes que codifican para NRPs putativas posiblemente involucradas en la síntesis de la azotobactina, así como un homólogo del gen *pvdS*, el cual codifica para un factor sigma alternativo involucrado en el control de la síntesis de pioverdinas en *Pseudomonas* spp, el cual recientemente se probó que en *A. vinelandii* es esencial para la síntesis de azotobactinas y es controlando por RsmA (datos no publicados).



**Figura 3. Modelo para la regulación de la expresión génica durante el enquistamiento.** Líneas verdes: regulación positiva; líneas rojas: regulación negativa. Las líneas discontinuas indican intermedios o mecanismos de regulación desconocidos (Tomada de Segura *et al.*, 2016).

## 1.6. Señales de activación del sistema GacS/A (BarA/UvrY)

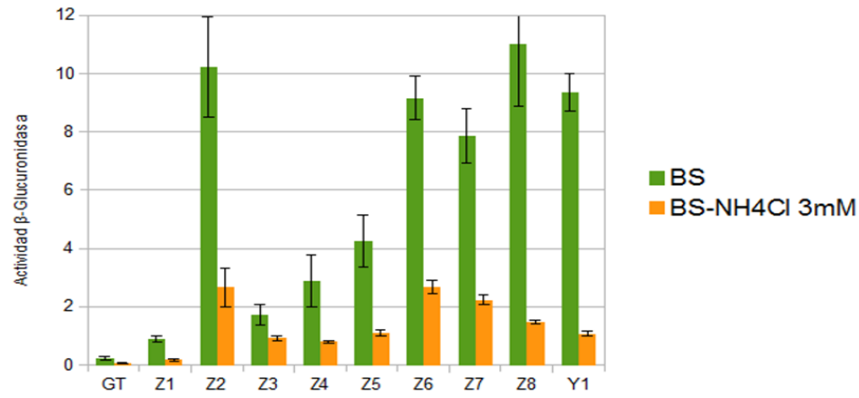
Se conoce que los genes que codifican para los sRNAs de la familia Rsm son los únicos blancos directos del sistema GacS/A tanto de *A. vinelandii* como de sistemas homólogos, de tal manera que estudiando condiciones que alteren su expresión se podrían encontrar las condiciones o señales a las que responde cada sistema GacS/A. Se conoce que en *E. coli* el sistema BarA/UvrY detecta y responde a ácidos orgánicos de bajo peso molecular dependiendo de su estado de ionización lo cual ha sido relacionado con el pH del medio (González-Chávez *et al.*, 2010). En *A. vinelandii* se exploró esta posibilidad, pero no se encontró un fenómeno similar (Datos no publicados).

Por otro lado, Heeb y cols. en 2002 demostraron que en *P. fluorescens* CHAO la expresión de *rsmZ* es estimulada por una señal extraída con diclorometano de cultivos en fase estacionaria con alta densidad celular. Por la cercanía filogenética entre *P. fluorescens* el grupo de trabajo decidió explorar si lo anterior también sucedía con el sistema GacS/A de *A. vinelandii*, sin embargo, se encontró que este tipo de extractos no afectan la expresión de *rsmZ* en esta bacteria (Datos no publicados).

Posteriormente, al ser *A. vinelandii* una bacteria fijadora de nitrógeno, su estado metabólico es diferente cuando esta se crece en condiciones diazotróficas y no diazotróficas. Como regla general, tanto el  $\text{NH}_4^+$  como el oxígeno reprimen la fijación de nitrógeno atmosférico, sin embargo, en *A. vinelandii*, la expresión de las tres nitrogenasas que este microorganismo posee solamente es reprimida por la presencia de amonio del medio, ya que es una bacteria aerobia estricta (Kennedy & Toudarian, 1987). Por esta razón, en el grupo de trabajo se decidió determinar si el amonio tenía un efecto sobre la expresión de los nueve pequeños RNAs reguladores de la familia Rsm.

Para esto, se hicieron las mediciones en medio mínimo suplementado con amonio 3mM ( $\text{NH}_4\text{Cl}^+$ ) (condiciones no diazotróficas) y los resultados se compararon con su expresión en medio mínimo BS sin fuente de nitrógeno (condiciones diazotróficas). Encontrándose que las condiciones no diazotróficas disminuyen de forma marcada su expresión, por lo que se concluyó que el metabolismo nitrogenado tiene una gran influencia sobre los

nueve *rsm*-sRNAs (Datos no publicados) (figura 4). Sin embargo, aún falta explorar si estos genes responden al amonio como una señal o como un efecto metabólico causado por el paso de un metabolismo diazotrófico a uno no diazotrófico.



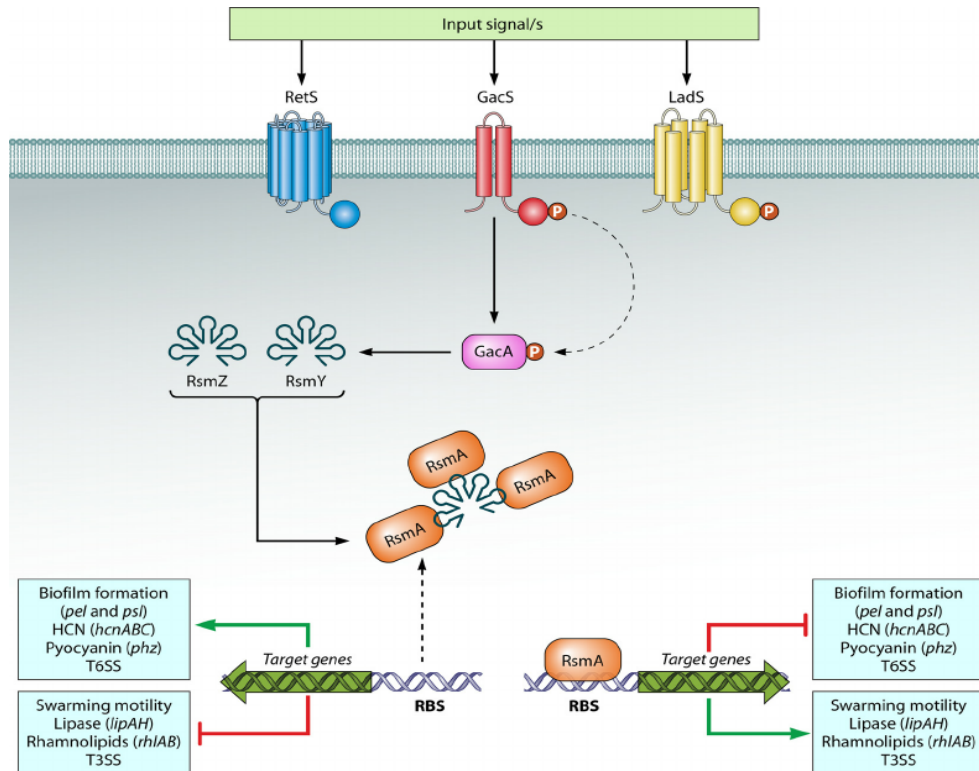
**Figura 4. Efecto del amonio sobre la expresión de los genes *rsmZ12345678Y*. GT, cepa control del fondo de expresión del reportero (Datos no publicados).**

### 1.7. Las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*

*P. aeruginosa* es una bacteria oportunista que, a través del sistema GacS/A, controla la transición de una infección aguda a una crónica. En pacientes que sufren de fibrosis quística, esta bacteria forma en los pulmones una biopelícula altamente resistente que favorece la recurrencia de las infecciones, lo cual generalmente desemboca en insuficiencia pulmonar fatal (Nadal *et al.*, 2012). Este sistema de dos componentes, a través de la inducción de la expresión de *rsmZ* y *rsmY*, activa la producción de factores implicados en la formación de estas biopelículas, tales como los exopolisacáridos Pel y Psl, y reprime la síntesis de múltiples factores implicados en la movilidad y virulencia aguda, principalmente el sistema de secreción tipo III (T3SS) (Goodman *et al.*, 2004; Mulcahy *et al.*, 2008).

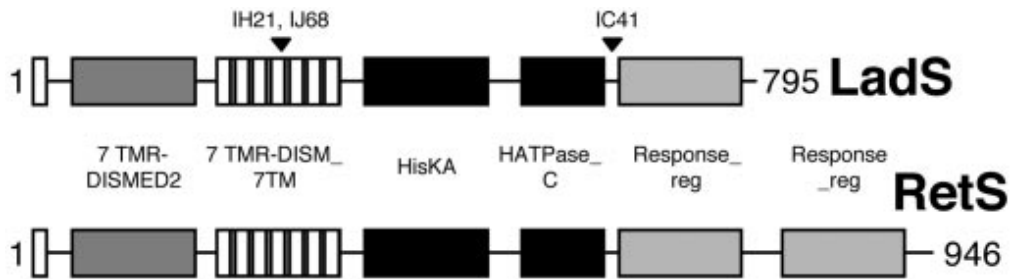
Por otra parte, se conocen dos cinasas histidínicas adicionales, llamadas LadS y RetS, que modulan la actividad del sistema GacS/A. LadS (Lost Adherence Sensor) actúa en paralelo con GacS, controlando positivamente la expresión de *rsmZ* y por lo tanto favoreciendo la transición a una infección crónica, y contrariamente RetS (Regulator of

Exopolysaccharide and Type III Secretion), regula la expresión de *rsmZ* de forma negativa, promoviendo la infección aguda. Lo anterior se determinó al analizar los transcriptomas de cepas mutantes *retS* y *ladS*, en donde se demostró el control recíproco del mismo conjunto de genes por estas cinasas (Figura 5) (Ventre et al, 2006).



**Figura 5. Las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS en *P. aeruginosa* controlan la transición reversible de la infección aguda a la crónica** (Tomada de Nadal *et al.*, 2012).

En cuanto a la estructura es estas cinasas, tanto RetS como LadS son histidín cinasas híbridas y tienen una organización de dominios similar. Estas poseen un dominio de entrada constituido por siete segmentos transmembranales de la familia 7TMR-DISM\_7TM (7TM Diverse Intracellular Signalling) y un subdominio periplásmico de unión de señal de la familia 7TMR-DISMED2 (7TM Receptors with Diverse Intracellular Signalling Modules) además del dominio transmisor (HisKA, HATPase), un dominio REC en el caso de LadS, dos dominios REC en RetS, y ninguna posee el dominio Hpt (Figura 6) (Ventre *et al.*, 2006).



**Figura 6: Estructura de las HPKs LadS y RetS** (Tomada de Ventre *et al.*, 2006).

En *P. aeruginosa*, RetS forma heterodímeros con GacS *in vitro* e *in vivo* en sistemas heterólogos. En este modelo se propone que RetS bloquea la fosforilación de GacS, lo cual impide la formación de homodímeros de GacS y la subsecuente activación de GacA, llevando a una reducción en la expresión de *rsmZ* (Goodman *et al.*, 2009).

Asimismo, se demostró que una vez homodimerizado, LadS tiene la capacidad de transferir su grupo fosfato a GacA. En este estudio, se observó que LadS se autofosforila en su dominio H1, transfiere el grupo fosfato a su dominio D1 y posteriormente al dominio H2 de GacS. Estos resultados mostraron que el LadS HK y el GacS/A TCS podrían estar formando un sistema de transducción de señales de varios componentes, que funcionaría en un mecanismo claramente distinto al de fosforelevo propuesto para los HKs híbridos (Chambonnier *et al.*, 2016).

En *P. fluorescens*, RetS antagoniza la función de GacS a temperaturas mayores a la temperatura óptima de crecimiento. Para explicar este hecho se propuso un mecanismo de formación de heterodímeros similar al reportado en *P. aeruginosa* (Humair *et al.*, 2009).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Las cinasas histidínicas RetS, LadS y GacS en *A. vinelandii*.

En un trabajo previo en el laboratorio, se encontró un *retS* homólogo que presenta un 48% de identidad con el gen de *P. aeruginosa*, en la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, utilizando BLASTN. A nivel de proteína tiene un 57% de identidad con su contraparte de *P. aeruginosa*. La proteína hipotética presenta una organización de dominios similar a los descritos para las proteínas RetS de *Pseudomonas* (Cruz, 2012).

Aunque también se realizó la búsqueda del *ladS* homólogo usando como patrón de comparación el gen *ladS* de *P. aeruginosa*, los resultados fueron negativos. Sin embargo, al usar el algoritmo BLASTX y teniendo como patrón de búsqueda a la proteína LadS de *P. aeruginosa*, se encontró un homólogo putativo con todos los dominios típicos de LadS (Cruz, 2012) (Figura 7).

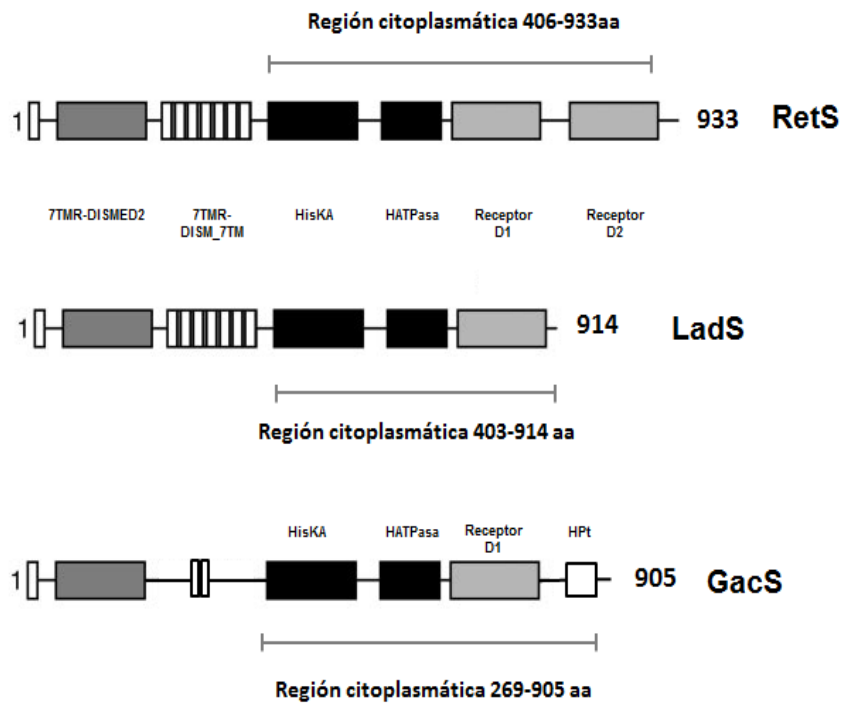


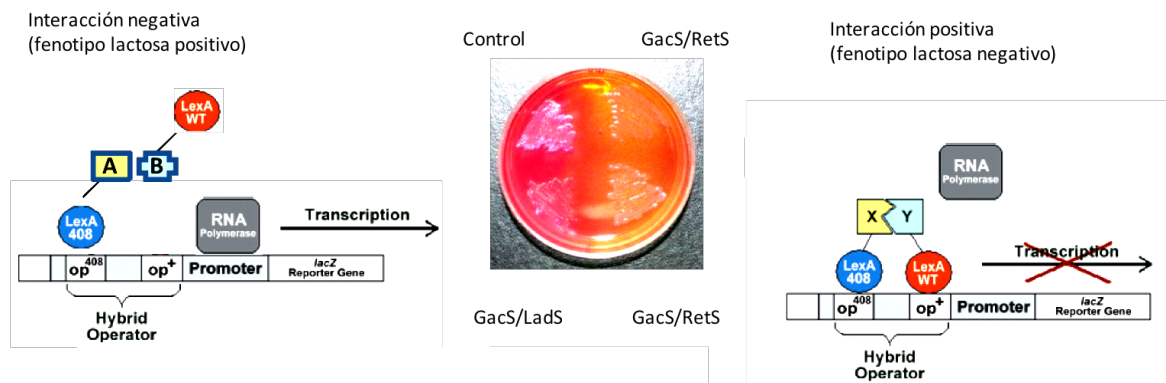
Figura 7. Dominios de las cinasas RetS, LadS y GacS de *Azotobacter vinelandii*.

(Tomada de Cruz, 2012).

## 2.2. Ensayos de doble híbrido RetS/GacS y LadS/GacS en *A. vinelandii*

En el laboratorio se realizó previamente un ensayo de doble híbrido para estudiar las relaciones entre HKs dentro del sistema Gac/Rsm en *A. vinelandii*. Eso se hizo a partir de una metodología modificada por Daines *et al.* (2002), la cual consiste en un sistema basado en la proteína represora LexA para el estudio de interacciones proteicas en *E. coli*. La proteína incluye un dominio de unión a DNA (DBD), el cual es capaz de reconocer y unirse a determinado operador, que es funcional como dímero, cuando se une a su dominio de dimerización. El sistema aprovecha esta característica, por lo que *lexA* presenta la remoción de la región codificante para el dominio de dimerización y en su lugar se clonan los genes que codifican para las proteínas que de manera putativa interactúan, generando dos proteínas híbridas que al interactuar dan como resultado la complementación funcional entre los dos dominios de LexA posibilitando la represión del gen reportero *lacZ*, lo que genera un fenotipo lactosa negativo.

De acuerdo con esta metodología y utilizando como proteína cebo la región citoplasmática de GacS, se identificó la región citoplásmica de RetS como un elemento proteico capaz formar un heterodímero. Por su parte la región citoplásmica de LadS no mostró esta capacidad de interacción con GacS (Sánchez, 2012) (Figura 8).



**Figura 8. Ensayo de interacción de proteínas de dos híbridos. A)** A la izquierda la cepa control que muestra la interacción negativa del sistema. A la derecha la interacción se visualiza por el fenotipo lactosa negativo al reprimirse la expresión del gen reportero *lacZ*. **B)** A la izquierda se muestra una coloración rosada intensa lo que indica ausencia de interacción (Sánchez, 2012).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La vía GacS/A — RsmA/RsmZ-Y es esencial para la regulación de la síntesis de algunos metabolitos en *A. vinelandii*, por lo que el estudio de las cinasas histidínicas que interactúan con GacS es de suma importancia pues evidenciaría una regulación más compleja. El conocimiento generado en este trabajo contribuirá al mejor entendimiento de esta cascada de regulación en *A. vinelandii*, y tendrá impacto en las investigaciones enfocadas a la producción de biopolímeros de interés industrial por esta bacteria.

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*A. vinelandii* es una bacteria con un metabolismo amplio y versátil que muestra capacidad de adaptación a diversas fuentes de carbono y condiciones ambientales, además de poseer características metabólicas particulares como la fijación de nitrógeno en condiciones aerobias. Debido a lo anterior, es requerido que cuente con diferentes mecanismos de detección y regulación para la expresión diferencial de genes de acuerdo con la condición ambiental a la que se enfrente.

A diferencia de *P. aeruginosa* que posee 69 cinasas histidínicas capaces de reconocer y responder a señales del medio (Stover *et al.*, 2000), *A. vinelandii* posee únicamente 39 HKs (P2CS Database, 2018) por lo que el estudio de estas cinasas y las vías que posteriormente regulan proporcionará información valiosa sobre cómo esta bacteria, con tan reducido número de formas para detectar señales en el medio en el que se encuentra, es capaz de regular un gran número de vías metabólicas para su adaptación y supervivencia en su entorno.

## 4. HIPÓTESIS CIENTIFICA

En *Azotobacter vinelandii*, las cinasas histidínicas RetS y LadS influyen en la expresión de los pequeños RNA reguladores de la familia *rsm* y en los procesos regulados por ellos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Estudiar la regulación genética ejercida por las cinasas GacS, RetS y LadS sobre los *rsm*-sRNAs.

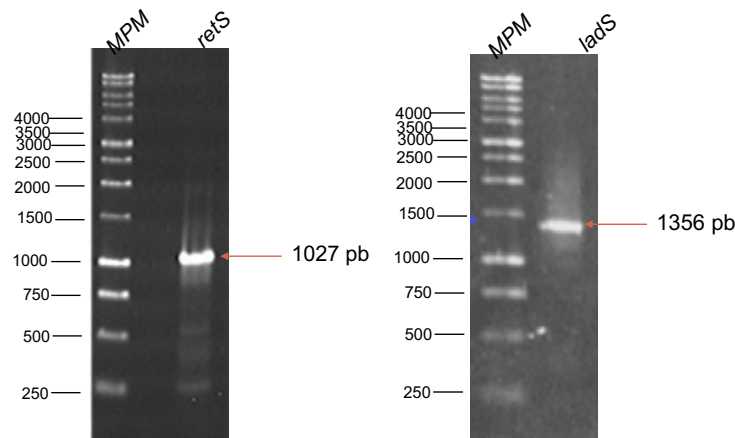
### 5.2. Objetivos específicos

- Generar mutantes *retS* y *ladS*
- Caracterizar a las mutantes *retS* y *ladS* en relación a la producción de alginato, PHB, alquilresorcinoles y pioverdinas.
- Determinar si RetS regula la expresión de los *rsms*-sRNAs.
- Establecer si RetS participa en la regulación de la expresión de los *rsms*-sRNAs en respuesta a las condiciones de crecimiento diazotrófico.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### 6.1. Generación de mutantes en *retS* y *ladS* de *A. vinelandii*

Este trabajo se inició con la generación de las mutantes en los genes que codifican para las cinasas RetS y LadS. Para esto se amplificaron las regiones citoplasmáticas de los dos genes en cuestión (Figura 9), utilizando los oligonucleótidos *retSD-retSR* y *ladS1D-ladS1R*.

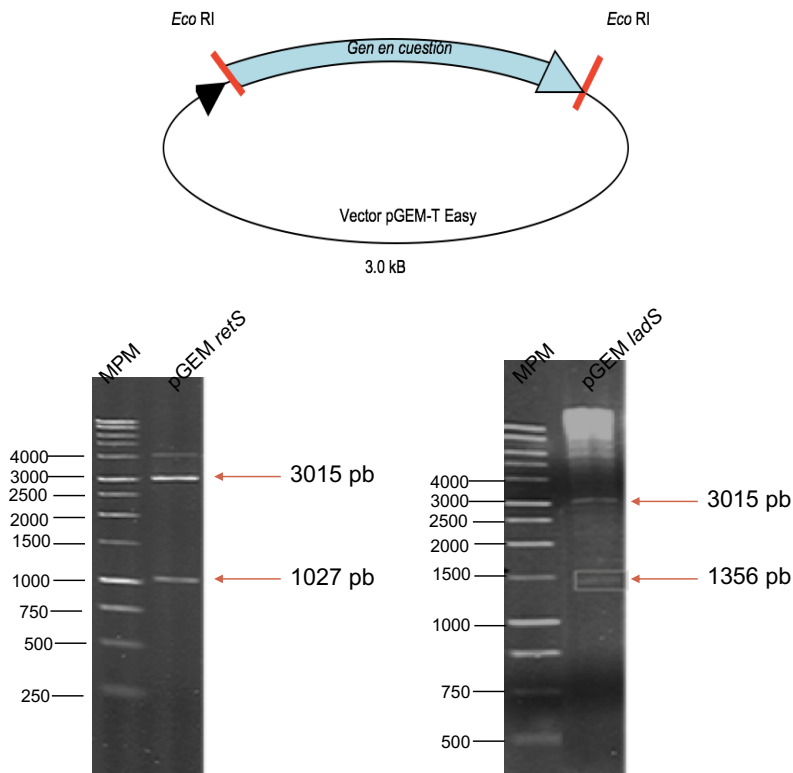


**Figura 9. Corrimiento electroforético de los productos de las amplificaciones de la región citoplasmática de *retS* y *ladS*.** Izquierda: Primer carril: MPM, segundo carril: amplificación de la región citoplasmática de *retS*. Derecha: primer carril: MPM, segundo carril: amplificación de la región citoplasmática de *ladS*.

La amplificación de los fragmentos se realizó empleando la enzima Taq DNA polimerasa, la cual adiciona deoxiadenosina (A) al extremo 3' del amplificado, lo cual facilita su ligación al vector pGEM-T Easy que porta deoxitimina (T) en sus extremos 5' (Promega).

Las amplificaciones de *retS* y *ladS* se ligaron de manera independiente al vector antes mencionado y los productos de las ligaciones fueron electroporados en células competentes de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Estas se cultivaron en placas adicionadas con antibióticos de selección, así como X-gal, compuesto indicador que diferencia las colonias azules sin secuencia recombinante insertada en el vector con las colonias blancas que presuntivamente adquirieron el vector recombinante. Por esta razón se tomaron colonias blancas, a las cuales se les hizo extracción plasmídica y restricción con *EcoRI*, seleccionándose una clona para cada construcción. En ambos casos debía

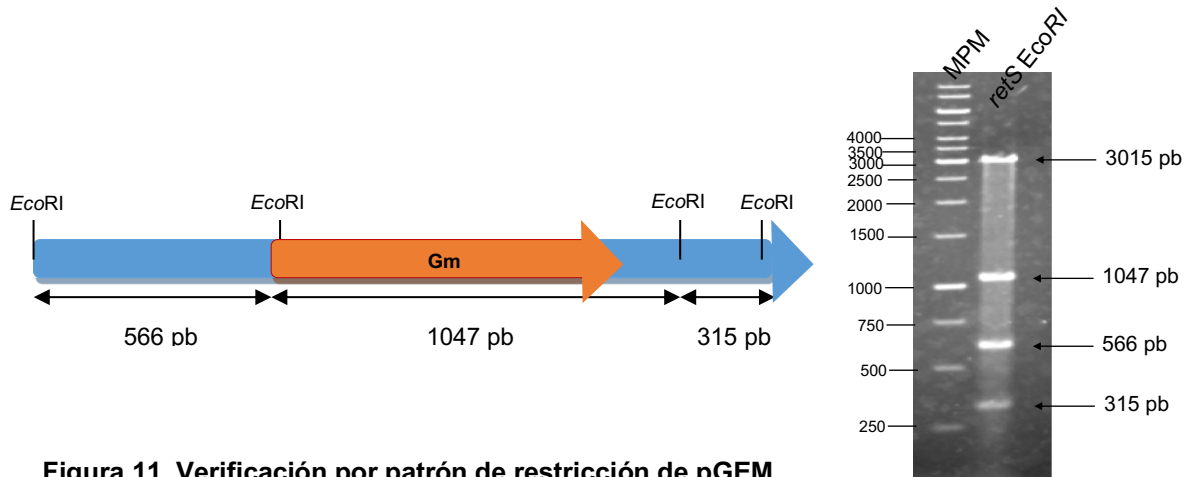
linearizarse el vector con un peso de 3015 pb y liberarse el inserto tanto de *retS* (1027 pb) como de *ladS* (1356 pb) (Figura 10).



**Figura 10. Verificación por patrón de restricción las construcciones pGEM *retS* y pGEM *ladS* con la enzima *EcoRI*. Arriba:** Mapa de ambas construcciones con los sitios de restricción *EcoRI*. **Abajo izquierda:** Corrimiento electroforético de restricción de pGEM *retS*. Primer carril: Marcador de peso molecular. Segundo carril: restricción con *EcoRI* de pGEM *retS*. **Abajo derecha:** Corrimiento electroforético de restricción de pGEM *ladS*. Primer carril: marcador de peso molecular. Segundo carril: restricción con *EcoRI* de pGEM *ladS*.

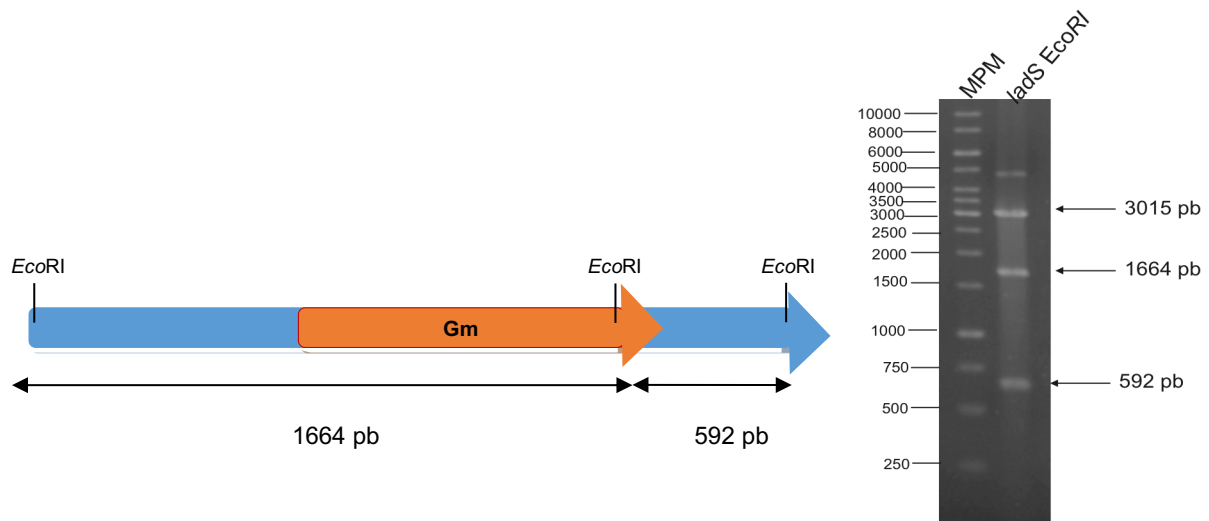
Para realizar las mutaciones de *retS* y *ladS* por inserción de casete de resistencia a antibiótico, se extrajo el gen de resistencia a gentamicina (Gm) contenido en el plásmido pBSL141 construido por Alexeyev *et al.* (1995). En el caso de *retS*, el inserto se cortó con la enzima *Bgl*II, la cual interrumpe la región codificante del dominio transmembranal, y se extrajo el casete de Gm con *Bam*HI, la cual es compatible para ligación con los extremos cohesivos que produce *Bgl*II. En el caso de *ladS*, el inserto se cortó con la enzima *Xho*I, la cual interrumpe la región codificante del dominio catalítico, y se extrajo el casete de Gm con la misma enzima.

A partir de estos fragmentos obtenidos por restricción, se hicieron las ligaciones para finalizar con la construcción de los vectores mutagénicos *retS* y *ladS*, los cuales fueron electroporados en células competentes de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Una vez obtenidas colonias transformantes de cada construcción, se hizo la verificación de ambas por medio de mapeo de restricción con la enzima *EcoRI* (Figuras 11 y 12).



**Figura 11. Verificación por patrón de restricción de pGEM**

***retS*::Gm.** **Izquierda:** Mapa del vector mutagénico con los sitios de restricción *EcoRI*. **Derecha:** Corrimiento electroforético de la restricción de pGEM *retS*::Gm con *EcoRI*. Primer carril: Marcador de peso molecular. Segundo carril: restricción con *EcoRI* de pGEM *retS*::Gm.

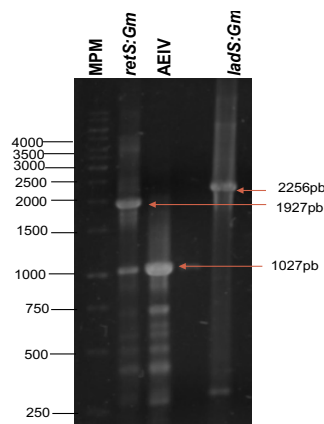


**Figura 12. Verificación por patrón de restricción del plásmido pGEM *ladS*::Gm.** **Izquierda:** Mapa del vector mutagénico con los sitios de restricción *EcoRI*. **Derecha:** Corrimiento electroforético de la restricción de pGEM *ladS*::Gm con *EcoRI*. Primer carril: Marcador de peso molecular. Segundo carril: restricción con *EcoRI* de pGEM *ladS*::Gm.

A continuación, se hicieron las transformaciones de *A. vinelandii* AEIV con los vectores mutagénicos. Una vez obtenidas las posibles recombinantes, se verificaron mediante amplificación por PCR.

Para verificar la mutación en *retS* se utilizaron los oligonucleótidos *retSD* y *retSR*, obteniéndose para la cepa AEIV un producto de amplificación de 1027 pb y para la cepa mutante en este gen uno de 1927 pb, lo cual fue conforme a lo esperado de acuerdo con el peso del fragmento silvestre más 900 pb del casete de resistencia a Gm. Por otra parte, la mutante *retS* también amplificó el fragmento silvestre, siendo esto posible debido a la poliploidía de *A. vinelandii* (Maldonado *et al.*, 1994), e indicando que es una mutante merodiploide (Figura 13). Este hecho es dispensable para este trabajo, debido a que se busca definir si la regulación que ejerce cada cinasa sobre el sistema es de forma positiva o negativa, por lo que, aunque existan copias silvestres, los efectos que tengan estas mutantes sobre diferentes fenotipos nos indicará qué tipo de regulación ejercen en la bacteria.

La mutación en *ladS* se verificó utilizando los oligonucleótidos *ladS1D* y *ladS1R*, los cuales en la cepa mutante amplificaron un fragmento de 2256 pb, que resultó conforme a lo esperado de acuerdo con el peso del fragmento silvestre de 1356 pb más 900 pb del casete de resistencia a Gm. En esta mutante, no se observó amplificación de copias silvestres (Figura 13).



**Figura 13. Corrimiento electroforético de los productos de las amplificaciones para la verificación de las mutantes *retS* y *ladS*.** Primer carril: MPM, segundo carril: amplificación de *retS* de la mutante *retS*, tercer carril: amplificación de *retS* de AEIV, quinto carril: amplificación de *ladS* de la mutante *ladS*.

## 6.2. Caracterización de las mutantes en *retS* y *ladS* sobre los fenotipos que regula el sistema Gac/Rsm.

Con el objetivo de caracterizar a las mutantes en *retS* y *ladS* sobre algunos de los fenotipos que regula Gac/Rsm, los cuales son producción de alginato, PHB, alquilresorcinoles y pioverdinas, se cultivaron las cepas mutantes *retS* y *ladS* de *A. vinelandii* en diferentes medios, cada uno específico para inducir el fenotipo a caracterizar, usando como control positivo a la cepa silvestre AEIV y control negativo a la cepa mutante en AEIV *gacA* previamente construida (Castañeda *et al.*, 2000).

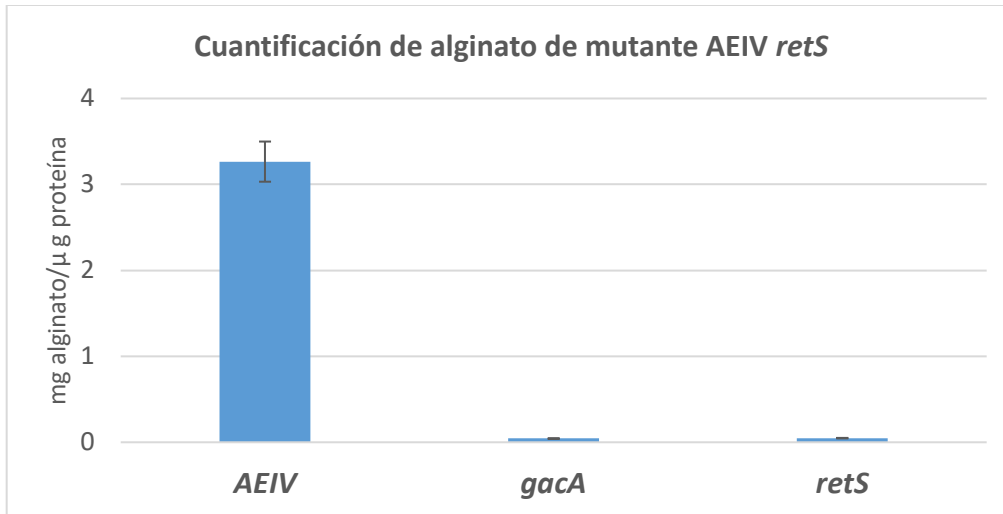
Para determinar el fenotipo relacionado con la producción de alginato, se cultivaron a las cuatro cepas en placas con mínimo Burk Sacarosa (BS) y se dejaron crecer durante 48 horas a 30 °C (Figura 14).



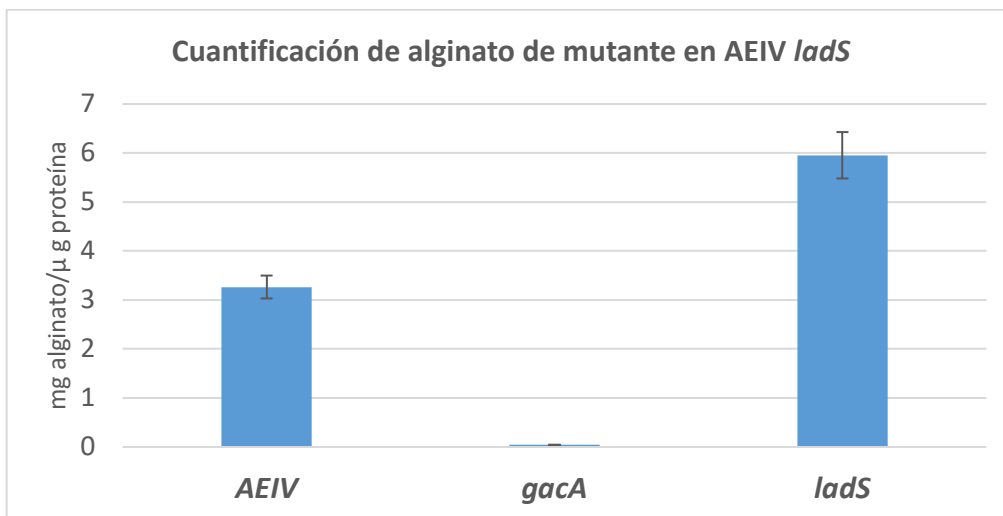
**Figura 14. Determinación fenotípica de la producción de alginato de las mutantes *retS* y *ladS*.**

**Izquierda:** Placa de BS con cepas AEIV *ladS* y AEIV *retS*. **Derecha:** Placa de BS con la cepa AEIV.

En la figura anterior, se puede observar que la mutante *ladS* presenta mayor mucoidía en comparación con la cepa silvestre AEIV y con la mutante *retS*, además de que su crecimiento no es homogéneo, no presenta una mucoidía característica. Para la determinación cuantitativa de la producción de alginato de ambas mutantes, estas, junto con las dos cepas control, se cultivaron por triplicado en medio líquido hasta llevarlas a fase estacionaria (48 h) a 30 °C, y a partir de estos cultivos se llevó a cabo la cuantificación de alginato por medio del método del carbazol (Figuras 15 y 16).



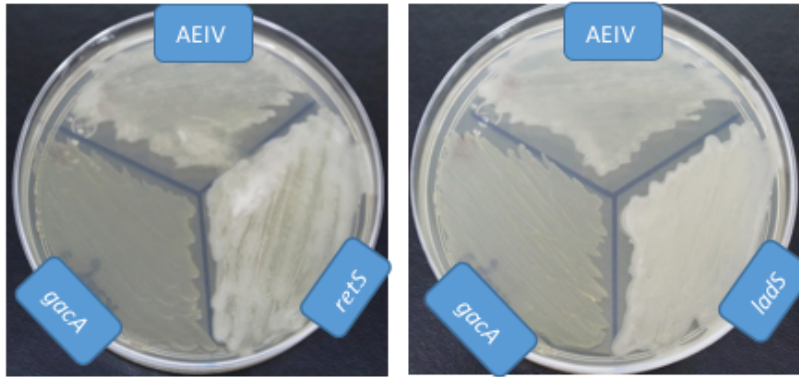
**Figura 15.** Cuantificación de alginato de las cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *retS*.



**Figura 16.** Cuantificación de alginato de las cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *ladS*.

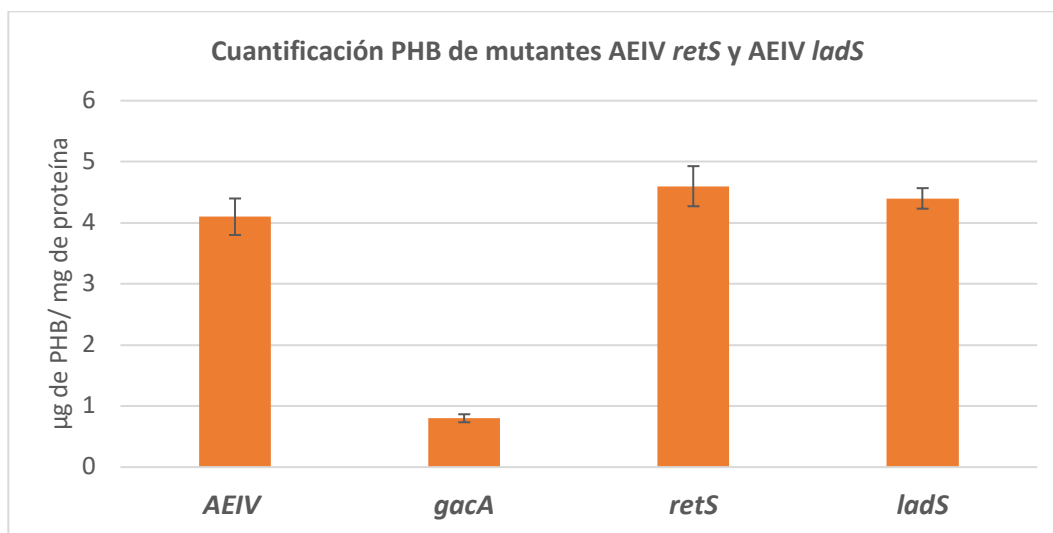
En las figuras 15 y 16 se puede observar que la producción de alginato en la mutante *retS* se abate al nivel de la mutante *gacA*, mientras que en la mutante *ladS* prácticamente se duplica la cantidad este polímero con respecto a la cepa silvestre, el cual es un resultado contrario a lo esperado de acuerdo con las funciones descritas de estas cinasas en *P. aeruginosa* por Ventre y cols. en 2006.

Para determinar el fenotipo relacionado con la acumulación de PHB, el cual se observa como un cultivo blanquecino, se cultivaron las cuatro cepas en placas de medio rico peptona-levadura (PY) ya que este poliéster se produce en condiciones de exceso de carbono, y se dejaron crecer durante 48 h a 30 °C (Figura 17).



**Figura 17. Determinación fenotípica de acumulación de PHB de las mutantes *retS* y *ladS*.**  
**Izquierda:** Placa de PY con cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *retS*. **Derecha:** Placa de PY con cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *ladS*.

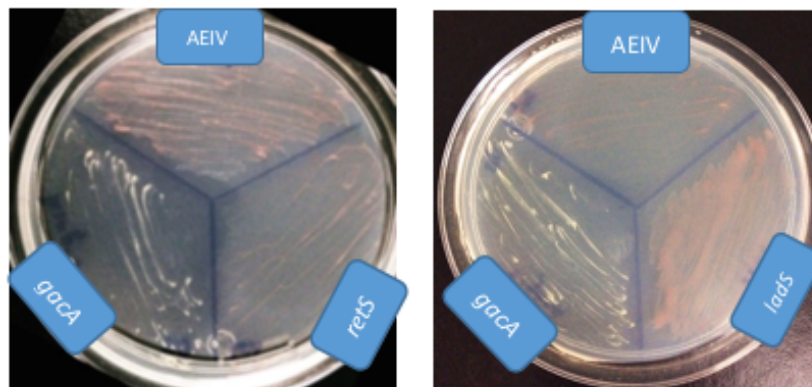
Posteriormente se cultivaron las cuatro cepas por triplicado en medio PY líquido y a partir de esto se llevó a cabo la cuantificación de PHB de acuerdo con el protocolo descrito en metodología (Figura 18).



**Figura 18. Cuantificación de PHB de las cepas AEIV, AEIV *gacA*, AEIV *retS* y AEIV *ladS*.**

De las figuras 17 y 18 se puede determinar que no hay diferencias significativas entre la acumulación de PHB de las mutantes *retS* y *ladS* en contraste con la cepa silvestre, ya que estas tres cepas presentan cantidades similares de este poliéster intracelular, lo que indica que ambas cinasas no participan en la regulación su producción.

En cuanto a la observación de diferencias fenotípicas relacionadas con la síntesis de alquilresorcinoles, las cuatro cepas se cultivaron en placas de medio Burk-butanol (Medio mínimo con butanol), ya que, el butanol es un inductor de enquistamiento y los lípidos de membrana son sustituidos por alquilresorcinoles durante este proceso. Los cultivos se dejaron crecer durante 120 horas (5 días) a 30 °C y posteriormente se tiñeron con Fast Blue, colorante que se acopla con los alquilresorcinoles y forma azoderivados rojizos (Figura 19).

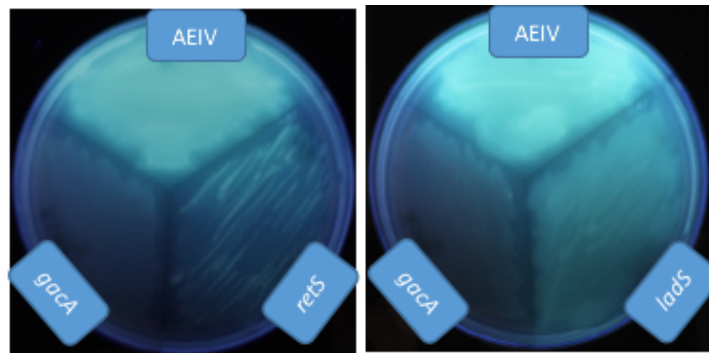


**Figura 19. Fenotipo relacionado con la síntesis de alquilresorcinoles de las mutantes *retS* y *ladS*.**

**Izquierda:** Placa de Burk-butanol con cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *retS*. **Derecha:** Placa de Burk-butanol con cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *ladS*.

El fenotipo relacionado con la producción de alquilresorcinoles en ambas mutantes, conforme a lo observado en la figura 19, sigue un patrón similar a lo anteriormente determinado para el fenotipo de producción de alginato, en donde la mutante *retS* disminuye su producción en relación con la cepa silvestre y contrariamente, la mutante *ladS* la aumenta.

Finalmente, para observar las diferencias en el fenotipo relacionado con la producción de pioverdinas, se cultivaron las cuatro cepas en medio de competencia CM (Medio de mínimo sin hierro) y se dejaron crecer durante 48 horas a 30 °C. Estos sideróforos son fluorescentes, por lo que se logran visualizar bajo luz UV (Figura 20).

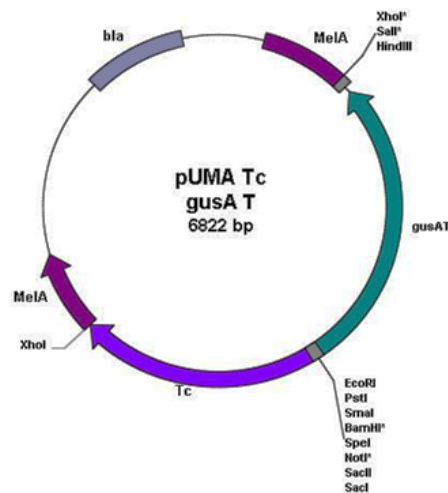


**Figura 20. Fenotipos de síntesis de pioverdinas en las mutantes AEIV *retS* y AEIV *ladS*.** Izquierda: Placa de CM con cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *retS*. Derecha: Placa de CM con cepas AEIV, AEIV *gacA* y AEIV *ladS*.

De manera semejante con los fenotipos de producción de alginato y alquilresorcinoles, hay una tendencia observable en la figura 20 por parte de la mutante *retS* por disminuir la producción de pioverdinas y de la mutante *ladS* en aumentarla. Todos estos resultados refuerzan el supuesto de que las funciones de RetS y LadS en *A. vinelandii* son contrarias a las que ambas desempeñan en *P. aeruginosa*.

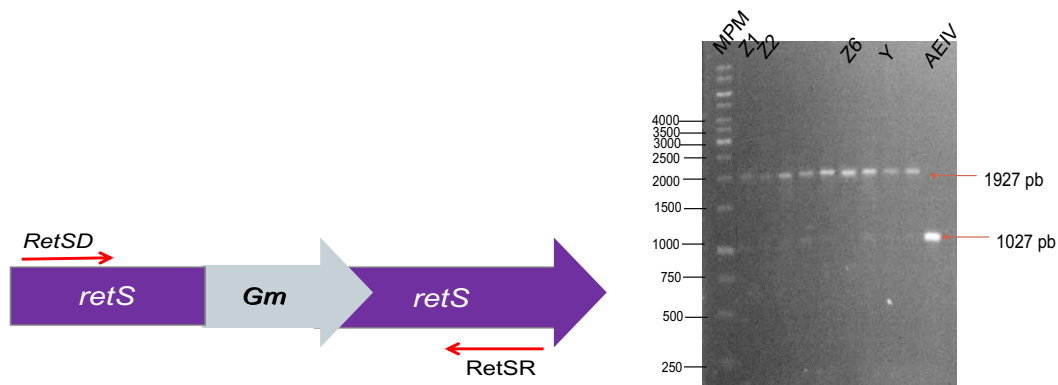
### 6.3. Determinación de la regulación ejercida por RetS sobre la expresión de los *rsms-sRNAs*

Previamente en el laboratorio utilizando del vector pUMA Tc *gusA T* se contruyeron las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA*, *rsmZ6-gusA* y *rsmY-gusA* (Datos no publicados). pUMA Tc *gusA T* es un vector integrativo el cual se construyó a partir del plásmido pUMA Tc 5'>3'. La construcción contiene el gen *meIA* para promover su integración al cromosoma por doble recombinación homóloga del material genético flanquedo por las secuencias del gen *meIA* que codifica para una alfa-galactosidasa. Este vector en particular posee un casete de resistencia a tetracilina (Tc), el gen reportero *gusA* (con orientación divergente al promotor del gen *meIA*) y río arriba de este hay un sitio de multiclonación, en el cual se clonaron las regiones reguladoras de los cuatro genes *rsm* a estudiar (Figura 21) (Hernández-Eligio et al., 2012; Muriel-Millán et al., 2015).



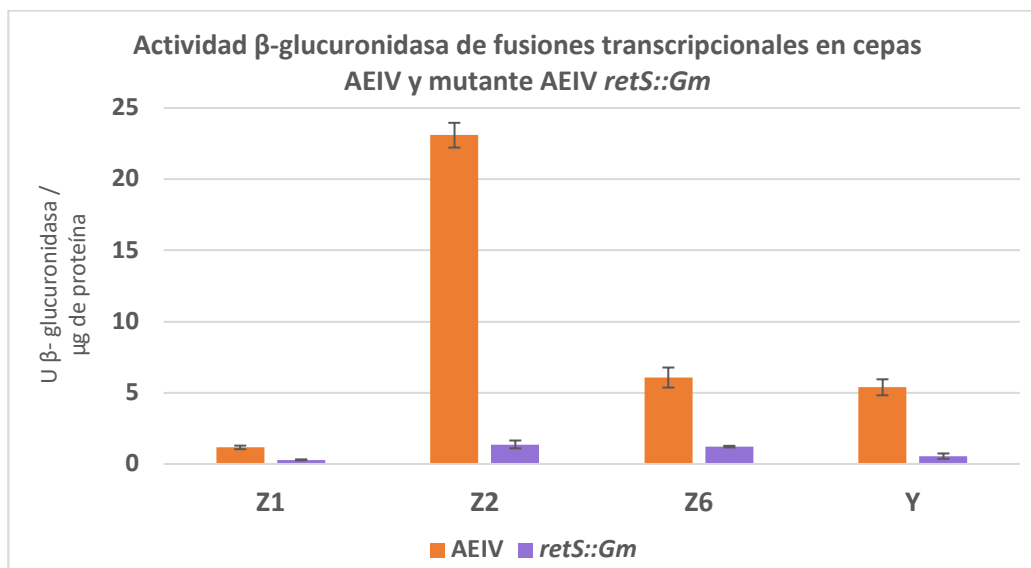
**Figura 21. Vector integrativo pUMA Tc *gusA T* utilizado para hacer las fusiones transcripcionales.**  
(Hernández-Eligio et al., 2012; Muriel-Millán et al., 2015).

Las cepas de que portan las fusiones descritas se transformaron con el vector mutagénico pGEM *retS::Gm*, y su recombinación con el cromosoma se comprobó por medio de la amplificación de los loci modificados con los oligonucleótidos *retSD* y *retSR*, esperando los fragmentos de amplificación con los tamaños mencionados anteriormente para la cepa silvestre y cepas mutantes en el gen *retS* (figura 22).



**Figura 22. Verificación de la mutación de *retS* en las cepas de AEIV con las fusiones *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA*, *rsmZ6-gusA* y *rsmY-gusA* integradas al cromosoma. Arriba. Mapa del fragmento *retS::Gm* con sitios de pegado de oligonucleótidos *retSD* y *retSR*. Abajo: Corrimiento electroforético de las amplificaciones de *retS*. Primer carril: MPM, segundo carril: AEIV *rsmZ1-gusA*, tercer carril: AEIV *rsmZ2-gusA*, séptimo carril: AEIV *rsmZ6-gusA*, noveno carril: AEIV *rsmY-gusA*, décimo carril: AEIV.**

Posteriormente, el efecto de la mutación en el gen *retS* sobre las fusiones transcripcionales se cuantificó por triplicado estableciendo la actividad  $\beta$ -glucuronidasa codificada por el gen reportero *gusA* de acuerdo con el protocolo descrito en metodología (figura 23).



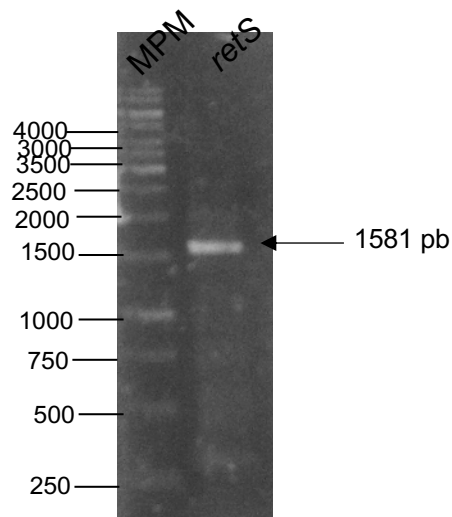
**Figura 23. Efecto de la mutación *retS::Gm* sobre la actividad del gen reportero *gusA* de las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA*, *rsmZ6-gusA* y *rsmY-gusA*.**

A partir de la gráfica anterior se puede determinar que la actividad de las fusiones transcripcionales de los cuatro *rsm*-sRNAs disminuye de forma considerable en el fondo mutante *retS* en comparación con su expresión en el fondo silvestre.

#### 6.4. Generación de una nueva mutante *retS* en el dominio catalítico

Debido a que los fenotipos observados en la mutante *retS::Gm* eran contrarios a los esperados según la función como regulador negativo de RetS reportado en diferentes especies de *Pseudomonas*, se propuso generar otra cepa mutante *retS* para corroborar los resultados obtenidos. La cepa *retS::Gm* contiene la inserción del casete de resistencia a Gm en sentido de la transcripción interrumpiendo la región codificante para su dominio transmembranal, lo que podía estar generando una proteína híbrida con una funcionalidad atípica. Por lo anterior, la nueva mutante debía interrumpirse con el casete de resistencia en la región codificante del dominio catalítico.

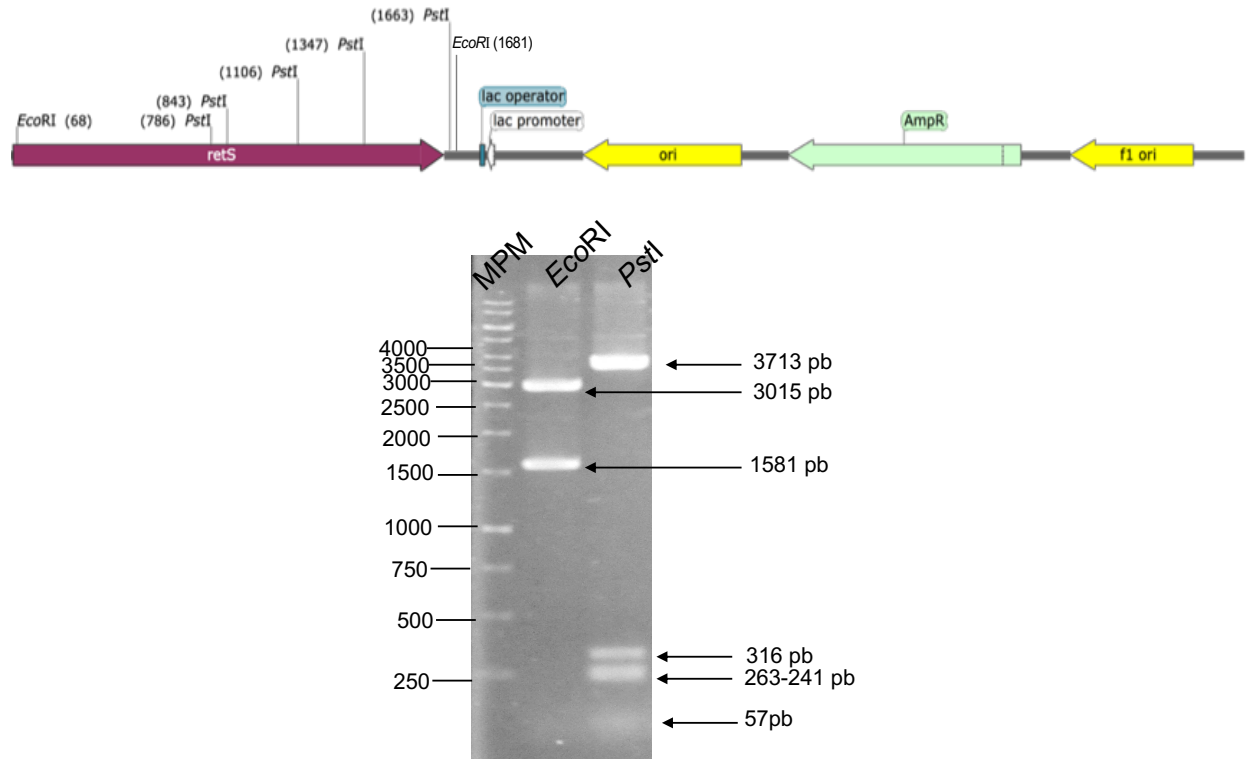
Para realizar lo planteado se construyó un nuevo plásmido mutagénico *retS* de la siguiente manera: se amplificó la región citoplasmática del gen *retS* empleando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), la cual es de alta fidelidad y deja extremos romos, así como los oligonucleótidos FRetSZ-BH1 y RRetS-S1. Se obtuvo el amplicón con una longitud de 1581 pb (Figura 24).



**Figura 24. Corrimiento electroforético de la amplificación de la región citoplasmática de *retS*.**

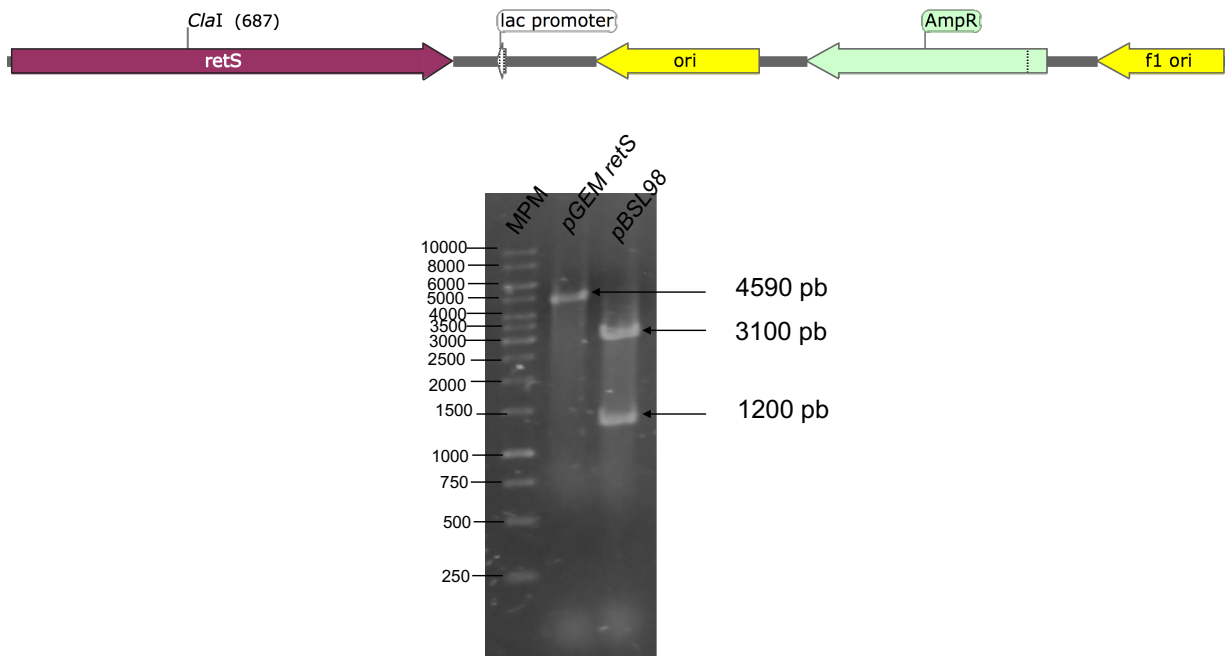
Primer carril: Marcador de peso molecular, segundo carril: amplicón de *retS*.

Este fragmento se ligó al vector pGEM-T Easy, el cual cuenta con extremos de deoxitimina (T), por lo que se hizo el relleno previo con desoxiadenosina (A). El producto de la ligación se utilizó para electroporar células electrocompetentes *E.coli* DH5- $\alpha$ . Luego se procedió a recuperar las colonias blancas y se hizo la extracción plasmídica, seleccionándose en este proceso una clona que cumplía con los patrones de restricción esperados con las con las enzimas *EcoRI* y *PstI* (figura 25).



**Figura 25. Verificación por patrones de restricción del plásmido pGEM *retS*.** Arriba: Mapa de restricción *EcoRI* y *PstI* del plásmido pGEM *retS*. Abajo: Corrimiento electroforético de las restricciones con *EcoRI* y *PstI* de pGEM *retS*. Primer carril: Marcador de peso molecular, segundo carril: restricción con *EcoRI*, tercer carril: restricción con *PstI*.

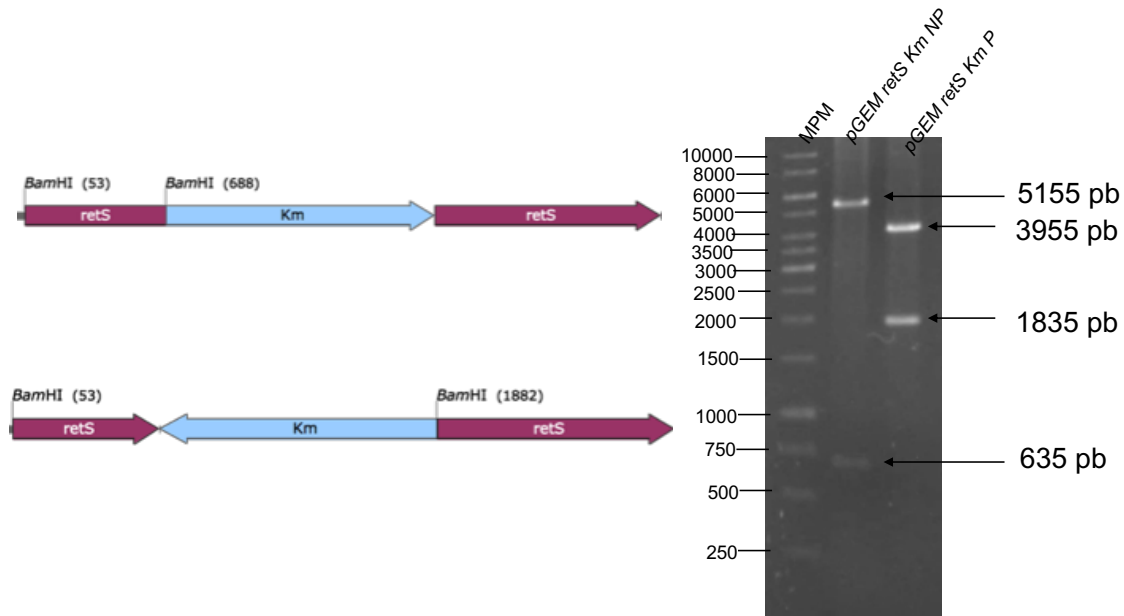
Para poder realizar la mutación de *retS*, se extrajo el gen de resistencia a kanamicina (Km) del plásmido pBSL98 (Alexeyev *et al.*, 1995) con la enzima *ClaI*. Asimismo, se linearizó el vector pGEM *retS* con la misma enzima, la cual corta en un sitio único dentro del gen *retS*, específicamente en la región codificante para el dominio catalítico de la cinasa (Figura 26).



**Figura 26. Restricciones con *ClaI* de los plásmidos pGEM *retS* y pBSL98. Arriba:** Mapa del vector pGEM *retS* mostrando el sitio de restricción *ClaI*. **Abajo:** Corrimiento electroforético de las restricciones con *ClaI*. Primer carril: MPM. Segundo carril: corte de pGEM *retS*. Tercer carril: corte de plásmido pBSL98.

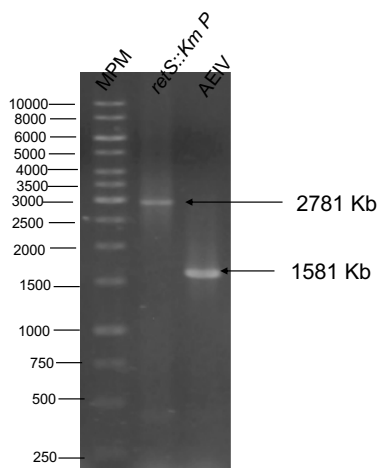
En el caso del pGEM *retS*, al contar con únicamente un sitio *ClaI*, la restricción resultó en la linearización del vector representado en el corrimiento electroforético por una banda de 4590 pb. Para el vector pBSL98, la restricción resultó en una banda de 1200 pb para el casete de Km y otra de 3100 pb para el resto del plásmido.

Posteriormente se realizó la ligación para insertar el casete de Km en el gen *retS*. El producto de la reacción fue posteriormente transformado en células electrocompetentes de *E. coli* y una vez obtenidas colonias transformantes, estas se checkaron por de patrón de restricción con la enzima *BamHI*, seleccionándose dos clonas: una con la inserción del casete en el mismo sentido de la transcripción de *retS* (no polar) y otra con la inserción del casete de resistencia en contrasentido de la transcripción d *retS* (polar). Los plásmidos fueron nombrados pGEM *retS*::Km no polar y pGEM *retS*::Km polar respectivamente (Figura 27).



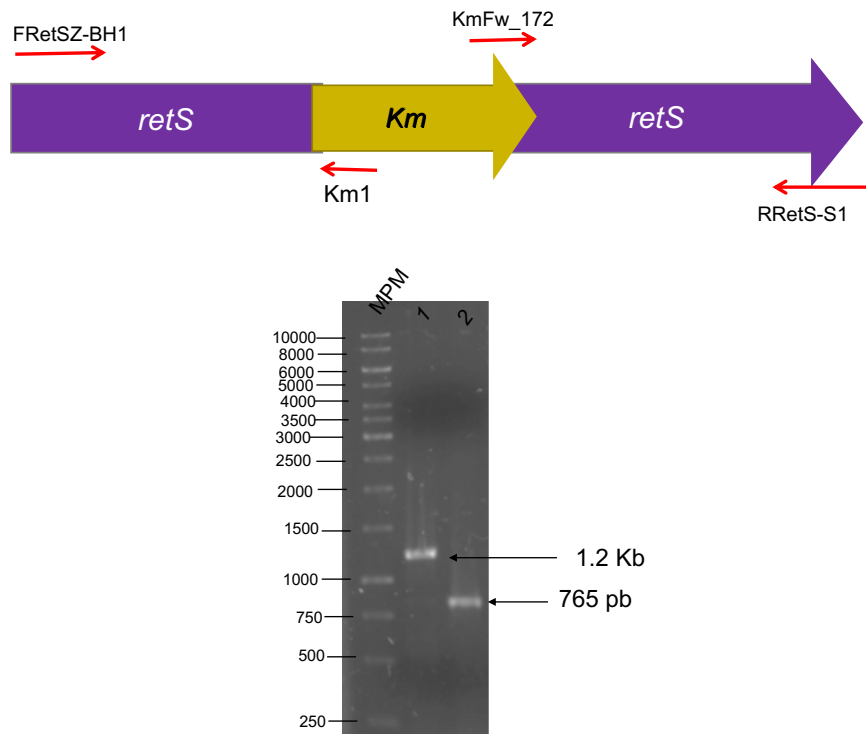
**Figura 27. Verificación por patrón de restricción con *Bam*HI de los vectores pGEM *retS*::*Km* polar y no polar. Izquierda arriba:** Mapa del vector pGEM *retS*::*Km* no polar mostrando sitios de restricción *Bam*HI. **Izquierda abajo:** Mapa del vector pGEM *retS*::*Km* polar mostrando sitios de restricción *Bam*HI. **Derecha:** Corrimiento electroforético de las restricciones con *Bam*HI. Primer carril: MPM. Segundo carril: corte de pGEM *retS*::*Km* no polar. Tercer carril: corte de pGEM *retS*::*Km* polar.

A partir de los dos vectores construidos y verificados, se hicieron las transformaciones de *A. vinelandii* AEIV con ambos de acuerdo con el protocolo de transformación descrito en material y métodos. Una vez obtenidas las cepas posibles recombinantes, estas se verificaron mediante análisis por PCR con los oligonucleótidos FRetsSZ-BH1 y RRetS-S1 previamente usados en este trabajo (Figura 28).



**Figura 28. Corrimiento electroforético del análisis por PCR de la mutación *retS*::*Km* polar.** Primer carril: MPM. Segundo carril: amplificación de *retS*::*Km* polar. Tercer carril: amplificación de región citoplasmática de *retS* silvestre (cepa AEIV).

Debido a que no se pudo corroborar mediante esta amplificación la mutación no polar de *retS*, se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos que amplificaban parte del gen *retS* y parte del casete de Km, por lo cual, además de los dos previamente usados, se utilizaron los oligonucleótidos Km1 y KmFw\_172. La combinación KmFw\_172 más RRetS-S1 debía de amplificar un fragmento de 1200 pb, y para la combinación FRetSZ-BH1 más Km1, con un amplificado de 765 pb (Figura 29).



**Figura 29. Corrimiento electroforético del análisis por PCR de la mutación de *retS::Km* no polar.**

**Arriba:** Mapa del fragmento *retS::Km* no polar mostrando los sitios de pegado de los oligonucleótidos.

**Abajo:** primer carril: MPM, segundo carril: amplificación con los oligonucleótidos KmFw\_172 + RRetS-S1, tercer carril: amplificación con los oligonucleótidos FRetSZ-BH1 + Km1.

## 6.5. Caracterización de nueva mutante *AEIV retS*

Para determinar si las nuevas mutantes *retS::Km* polar y no polar presentaban efectos similares entre ellas y con respecto a los observados a partir de los ensayos con la mutante *retS::Gm*, se realizó la cuantificación de alginato por triplicado de estas tres cepas mutantes, junto con las cepas *AEIV* y *AEIV gacA*, siguiendo la metodología del carbazol (Figura 30).

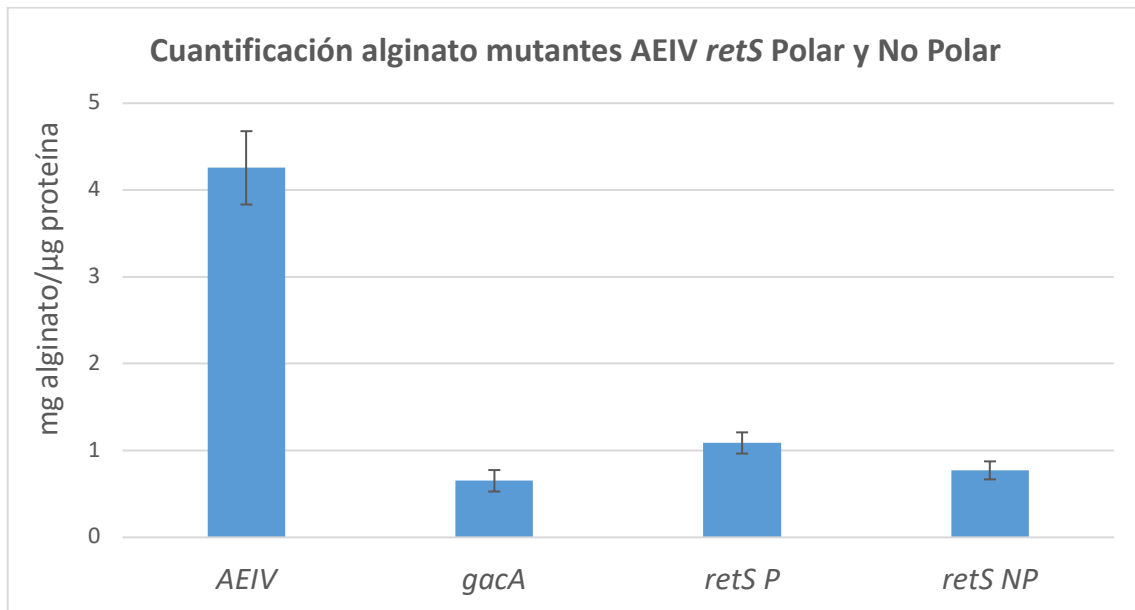


Figura 30. Cuantificación de alginato de las cepas *AEIV*, *AEIV gacA*, *AEIV retS::Km Polar* y *AEIV retS::Km No polar*.

La producción de alginato por parte de ambas mutantes *retS::Km* es muy similar, presentando menos de una cuarta parte del alginato producido por la cepa silvestre *AEIV* y disminuyendo su producción casi al nivel de la mutante *gacA*. Eso correlaciona con los datos obtenidos con la mutante *retS::Gm*, en la que igualmente se ve una marcada disminución en la producción de alginato con respecto a la cepa silvestre. A partir de estos resultados, se eligió a la mutante *retS::Km* no polar para cumplir con los siguientes objetivos propuestos en el trabajo.

Debido a que desde el inicio de este trabajo se observó que en general, las cepas mutantes *retS* retardaban su crecimiento en las primeras horas con respecto a la cepa silvestre, se realizó una curva de crecimiento. Por lo anterior era importante determinar si la mutante *retS* y la silvestre alcanzan la fase estacionaria en tiempos similares (Figura 31). Esto nos ayudaría a corroborar que las cepas se encontraban en la misma fase de crecimiento al momento de tomar las muestras para hacer las cuantificaciones tanto de la expresión de los *rsms*-sRNAs así como de los fenotipos de producción de los metabolitos cuantificados en este trabajo.

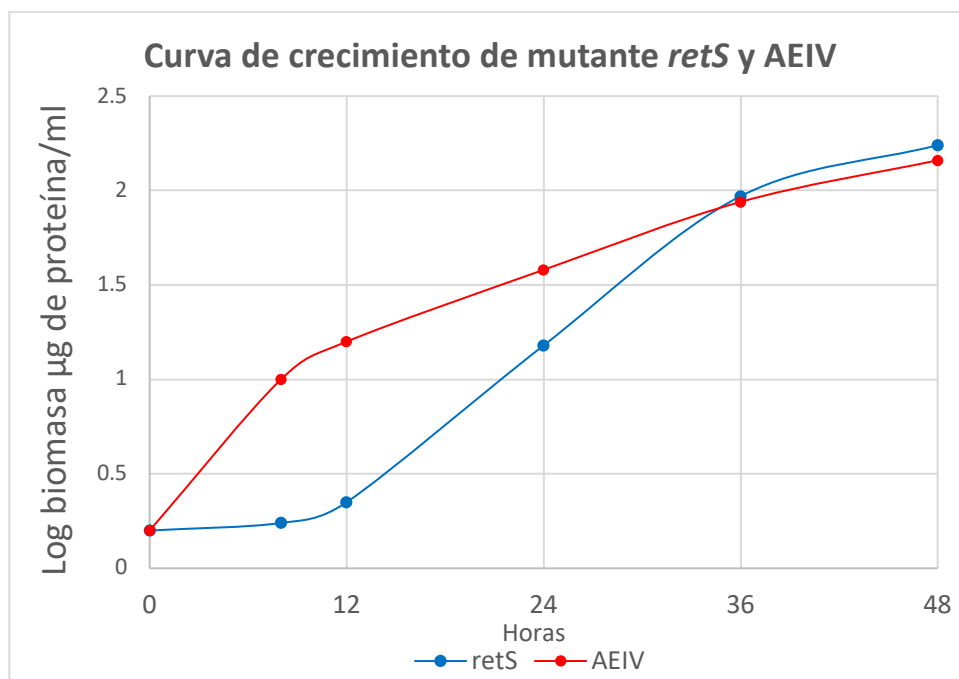


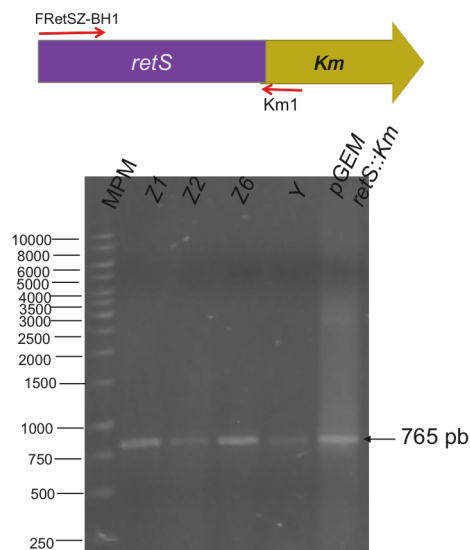
Figura 31. Curva de crecimiento la cepa silvestre AEIV y su mutante *retS*.

La gráfica anterior muestra que el crecimiento de la cepa silvestre AEIV comienza de manera más acelerada, mientras que el inicio de este por parte de la cepa mutante *retS* es considerablemente más lento. A partir de las 12 horas, AEIV empieza a desacelerar su crecimiento y contrariamente, la mutante *retS* lo acelera. Poco antes de las 36 horas (fase exponencial), la curva de crecimiento de ambas cepas se superpone y a partir de esta y hasta llegar a las 48 horas (fase estacionaria), el crecimiento se da de manera paralela y con valores muy aproximados.

## 6.6. Determinación de la regulación ejercida RetS sobre la expresión de los *rsm*s-sRNAs a partir de la nueva mutante *retS*

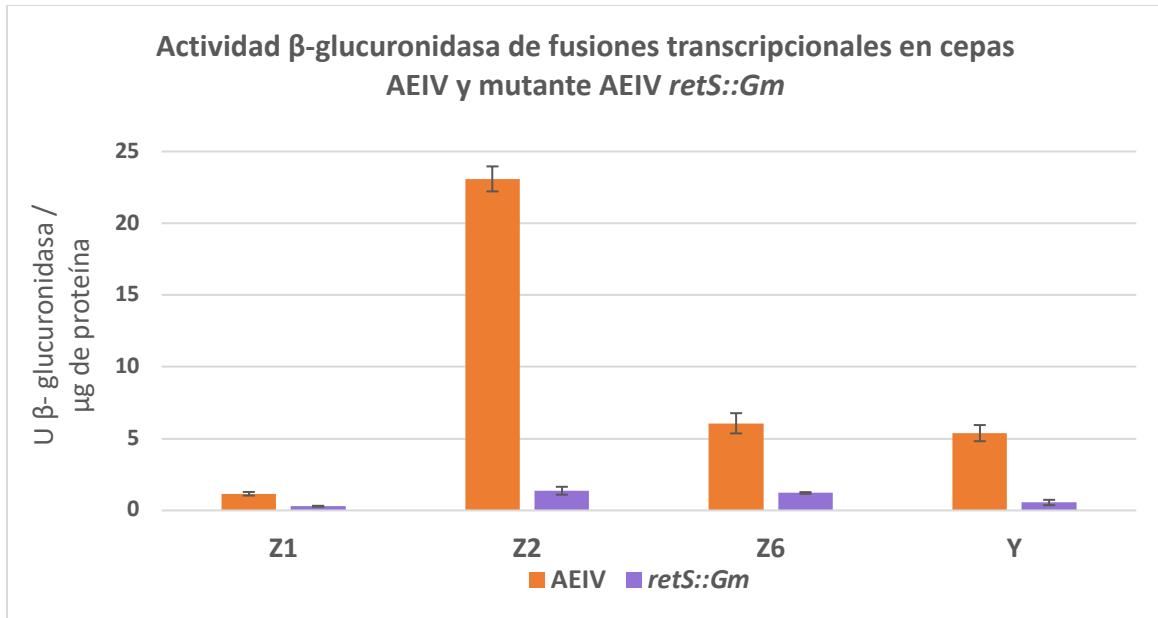
Las cepas de *A. vinelandii* AEIV con las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *Z2-gusA*, *Z6-gusA* y *Y-gusA* previamente descritas y utilizadas en este trabajo se emplearon para corroborar los resultados obtenidos con respecto al efecto regulador negativo observado en la mutante previa *retS::Gm*.

De la misma manera, estas cuatro cepas se transformaron con el vector mutagénico pGEM *retS::Km* no polar de acuerdo al protocolo descrito en metodología, y su recombinación con el cromosoma se verificó por PCR usando con los oligonucleótidos FRetSZ-BH1 y Km1 (figura 32).



**Figura 32. Verificación de la mutación de *retS* en las cepas que portan las fusiones transcripcionales *rsm-gusA*.** Arriba: Mapa de *retS::Km* NP mostrando los sitios de pegado de los oligonucleótidos usados. Abajo: Corrimiento electroforético del análisis por PCR de la mutación en *retS*. Primer carril: MPM, siguientes carriles: Amplificación en cepas con fusiones transcripcionales *rsmZ1* (2), *rsmZ2* (3), *rsmZ6* (4), *rsmY* (5) y control positivo pGEM *retS::Km* no polar (6).

El efecto de la mutación en *retS* sobre las fusiones transcripcionales se cuantificó por triplicado estableciendo la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa codificada por el gen reportero *gusA* de acuerdo con el protocolo descrito en metodología (figura 33).



**Figura 33. Efecto de la mutación *retS::Km* sobre la actividad del gen reportero *gusA* de las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *Z2-gusA*, *Z6-gusA* y *Y-gusA*.**

La gráfica anterior muestra claramente que la actividad de las fusiones transcripcionales de los cuatro *rsm*-sRNAs en el fondo mutante *retS::Km* disminuye en comparación con su actividad en el fondo silvestre, siendo los valores obtenidos aproximados a los resultantes de su cuantificación en el fondo mutante *retS::Gm*. Esto, en conjunto con los previos resultados obtenidos en este trabajo, apuntan fuertemente a que RetS actúa como un regulador positivo dentro del sistema Gac/Rsm, al menos bajo las condiciones en las que se realizaron los ensayos, en las cuales no se presenta fuente de nitrógeno.

### 6.7. Efecto de la fijación de nitrógeno sobre la expresión de los *rsm*-sRNAs en la mutante *retS*

A partir de lo anteriormente mencionado en antecedentes, la expresión de los nueve *rsm*-sRNAs disminuye en presencia de amonio en el medio. De acuerdo con esto, se propuso investigar si las condiciones de fijación de nitrógeno tenían efecto sobre la expresión de estos pequeños RNAs bajo el fondo mutante *retS*.

Para esto se utilizaron las cepas con las fusiones transcripcionales de *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY* integradas tanto en la cepa silvestre AEIV como en la cepa mutante *retS*. Su actividad se cuantificó a partir de cultivos en medio BS adicionado con amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}^+$ ) 3mM (condiciones adiazotróficas) y estos resultados se compararon con los previamente obtenidos a partir de cultivos en medio mínimo sin fuente de nitrógeno (condiciones diazotróficas) (Figura 34).

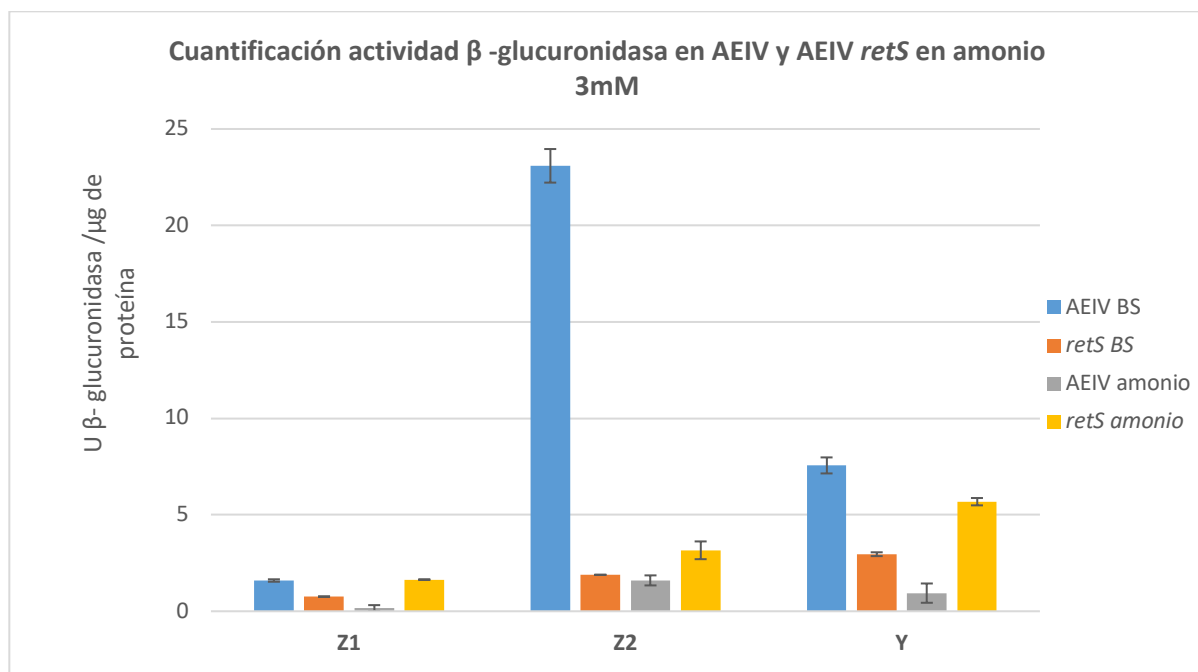


Figura 34. Cuantificación de actividad  $\beta$ -glucuronidasa en AEIV y AEIV *retS* en medio BS y en BS con amonio 3mM.

En la figura 34 se observa que en la mutante *retS* la expresión de los sRNAs *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY*, en condiciones adiazotróficas, se disminuye en comparación con su expresión en condiciones de crecimiento diazotrófico.

Asimismo, de acuerdo con un experimento previo de este trabajo, en condiciones diazotróficas la expresión de los sRNAs *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY* disminuye de forma marcada en la mutante *retS* en contraste con la cepa silvestre. Por otra parte, en condiciones no diazotróficas, la expresión de estos tres sRNAs aumenta en el fondo mutante *retS* en comparación con su expresión en el fondo silvestre. Esto sugiere una regulación diferencial por parte de RetS de acuerdo con las condiciones de fijación de nitrógeno en las que se encuentre la bacteria.

## 7. DISCUSIÓN

### Efecto de las mutaciones *retS* y *ladS* sobre los fenotipos que controla el sistema Gac/Rsm

En *P. aeruginosa*, así como otras especies de este género las cinasas histidínicas RetS y LadS tienen un efecto negativo y positivo respectivamente sobre la fosforilación del regulador de respuesta GacA, por lo que la expresión de los pequeños RNAs de la familia Rsm de ven afectados de la misma manera. En lo que respecta a RetS, se ha demostrado que el efecto negativo es dependiente de GacS, ya que, además del hallazgo de la formación de heterodímeros entre ambas, una doble mutante *retS/gacS* abate el efecto desrepressor sobre *rsmZ* de la mutante *retS* (Goodman *et al.*, 2009). Asimismo, LadS de acuerdo con Chambonnier *et al.* (2016) es dependiente de GacS para llevar a cabo su función activadora.

A partir de estudios de Cruz y por Sánchez (2012) se comprobó la presencia de ambas cinasas en *A. vinelandii* y posteriormente demostrar la interacción entre RetS con GacS, por lo que todo indicaba a que las funciones de estas HKs eran similares en esta bacteria con lo anteriormente reportado para *P. aeruginosa* (Ventre *et al.*, 2006). Por esta razón, en este trabajo se decidió realizar cepas mutantes *retS* y *ladS*, su caracterización fenotípica y la determinación de la expresión de los pequeños RNAs de la familia Rsm en la mutante *retS*.

Ambas mutantes se construyeron insertando un casete de resistencia a Gm interrumpiendo en sentido no polar (teniendo el mismo sentido de la transcripción tanto el gen interrumpido como el gen de resistencia) la región codificante para el dominio transmembranal, en el caso de *retS*, y para el dominio catalítico, en el caso de *ladS*. A partir de los primeros resultados de la observación fenotípica en placa, se mostraron diferencias claras entre la cepa silvestre y las mutantes *retS*, *ladS* proporcionando así un primer acercamiento a la función de estas dos cinasas en *A. vinelandii*, sugiriendo que ambas participan en la regulación de los fenotipos controlados por el sistema Gac/Rsm

en esta bacteria. De manera interesante, se observó que el efecto en los fenotipos de alginato, alquilresorcinoles y pioverdinas eran contrarios a lo esperado, ya que la mutante en *retS* disminuía su producción y la mutante en *ladS* la aumentaba.

Como siguiente paso, se propuso hacer la cuantificación de dos de los metabolitos regulados por el sistema Gac/Rsm y así determinar con mayor precisión el efecto de la mutación en estas cinasas. En relación a la producción de alginato, la mutante *retS* abate su producción al nivel de la mutante en *gacA* y la mutante en *ladS* produce prácticamente el doble de la cantidad de alginato producido por la cepa silvestre. En conjunto, estos resultados apuntaban fuertemente a que RetS podría estar actuando como un regulador positivo y LadS como regulador negativo en esta bacteria, contrario a lo esperado de acuerdo con las funciones reportadas de estas cinasas en *P. aeruginosa*. Los resultados de producción de alginato en la mutante *retS* se corroboraron con una segunda cepa mutante, la cual interrumpe la región codificante del dominio catalítico.

En cuanto a la producción de PHB, esta no sigue un patrón claro, debido a que no hay diferencias significativas entre lo producido por la cepa silvestre y las cepas mutantes *retS* y *ladS*. Este resultado es similar a lo que sucede en mutantes de los sRNAs del sistema Rsm en la cepa AEIV. A diferencia de esto, en de la cepa UW136 se ha demostrado la participación de la proteína RsmA como regulador negativo de la producción del polímero a través del control ejercido sobre los mensajeros del gen regulador *phbR* y el operón *phbBAC* (Hernández-Eligio *et al.*, 2012), sin embargo, la participación de los sRNAs aún necesita ser explorada. Sería interesante realizar mutantes *retS* y *ladS* en la cepa UW136 y establecer si las mutaciones afectan la síntesis de PHB.

Otra diferencia significativa que se observó desde que se comenzó el trabajo fue el retraso del inicio del crecimiento de la mutante *retS* en comparación con la cepa silvestre. Este resultado es interesante ya que presenta características similares a la curva de crecimiento de la cepa mutante *gacA* (Castañeda *et al.*, 2000). La similitud entre los fenotipos observados entre estas mutantes, así como sus respectivas curvas de

crecimiento, indica que la cinasa RetS actúa de manera positiva sobre el sistema Gac/Rsm a través del regulador de respuesta GacA.

### **Efecto de RetS sobre la expresión de los *rsms*-sRNAs**

De acuerdo con las mediciones de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales de *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ6* y *rsmY*, cada una de ellas integrada de forma independiente al cromosoma de las dos cepas mutantes *retS* (una con una interrupción en la región codificante para el dominio transmembranal y otra en el dominio catalítico) la expresión de los cuatro *rsms*-sRNAs disminuye pronunciadamente en ambos casos. Esto fortalece la idea de que RetS actúa como un regulador positivo de estos sRNAs.

De acuerdo con estudios hechos en *P. aeruginosa* por Hsu *et al.* (2008) RetS puede, además de formar heterodímeros con GacS, formar homodímeros y llevar a cabo una cascada de fosforelevo a través la proteína HptB, la cual es posee un dominio Hpt soluble que es parte de un sistema de señalización HptB-PA3346-PA3347. Esta vía consta de RetS, que como se dijo activa a HptB, y esta a su vez por fosforilación activa al regulador de respuesta PA3346. Este regulador posee un dominio de salida con actividad enzimática de fosfatasa que mediante defosforilación activa a su vez la proteína PA3347 que actúa como un factor anti-anti-sigma. A la fecha se desconoce la identidad tanto del factor anti-sigma como el factor sigma controlados por PA3347, Sin embargo, si se ha determinado que esta vía aumenta la expresión de *rsmY* (Bordi *et al.*, 2010). Asimismo, otras cinasas híbridas presentes en *P. aeruginosa* (PA1611, PA1976 y PA2824), a las cuales como a RetS también les hace falta el dominio Hpt, pueden activar la cascada controlada por HptB (Hsu *et al.*, 2008).

En una búsqueda realizada por nuestro grupo de trabajo, se encontraron en *A. vinelandii* genes homólogos codificantes para las proteínas PA1611, HptB, PA3346 y PA3647. Estos posiblemente en conjunto con GacS, GacA, RetS, LadS y tal vez otros elementos todavía no identificados, podrían estar formando una red de regulación en la que RetS ejercería un efecto regulador positivo y LadS un efecto regulador negativo sobre el

sistema. Para comenzar a estudiar esta red de regulación, de inicio se deberá establecer si las mutaciones en estos elementos tienen efectos sobre los fenotipos previamente mencionados, así como en la expresión de los *rsms*-RNAs. Posteriormente se requerirá estudiar las interacciones que puedan existir entre ellos y a partir de esto, hacer los ensayos de fosforilación necesarios. Todo lo anterior con el objetivo de ir formando un mapa muy fino que pueda ir explicando cómo es que funciona esta red grande y compleja de señalización, que tiene por finalidad el control de la expresión de los *rsms*-RNAs y por lo tanto, la adaptación a las condiciones medioambientales diversas a las que se expone la bacteria.

### **Participación de RetS en la regulación de la expresión de los *rsms*-sRNAs de acuerdo con las condiciones de fijación de nitrógeno**

Se sabe que el metabolismo en bacterias que llevan a cabo el proceso de fijación de nitrógeno cambia cuando estas crecen en condiciones diazotróficas o sin ella. De acuerdo con esto, se tenía el antecedente de que la expresión de los nueve *rsms*-sRNAs de *A. vinelandii* disminuía en condiciones adiazotróficas (Datos no publicados), y por esta razón, se quiso determinar si la cinasa RetS estaba involucrada en este fenómeno de señalización. Para analizar esto, se llevó a cabo la medición de actividad  $\beta$ -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales de tres *rsm*-sRNAs integradas en el cromosoma de la cepa AEIV y en la mutante AEIV *retS* en condiciones diazotróficas y adiazotróficas.

Primeramente, los resultados con respecto a la disminución de la expresión de los sRNAs en la cepa silvestre en condiciones adiazotróficas correlacionan con los antecedentes descritos, pero de manera muy interesante la mutación en *retS* anula el efecto represivo observado en estas condiciones. Por otra parte, en condiciones diazotróficas la mutación en *retS* tiene efectos contrarios sobre la expresión de los sRNAs, disminuyéndose de forma marcada en contraste con la cepa silvestre. En conjunto lo anterior, relaciona directamente a RetS con la respuesta de la bacteria ante la presencia de nitrógeno, faltaría por establecer si lo hace en conjunto con GacS o no.

Lo anterior hace evidente la importancia de las condiciones de cultivo en el estudio de estas cinasas, de acuerdo a esto prácticamente todos los trabajos publicados en *Pseudomonas* sp en los que catalogan a RetS como una cinasa que ejerce regulación negativa sobre el sistema Gac/Rsm se han llevado a cabo en medios ricos (Goodman *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2009; Humair *et al.*, 2009; Records *et al.*, 2010; Ventre *et al.*, 2006), a diferencia de que nuestro grupo de trabajo donde los ensayos se realizan en medio mínimo sin fuente de nitrógeno. Debido a la ausencia de condiciones experimentales similares, se imposibilita la comparación entre los trabajos anteriores sobre RetS y el presente, así como no se permite definir con exactitud la naturaleza reguladora esta cinasa, ya que esta seguramente depende en gran medida de las condiciones del medio. Algo similar podría ocurrir también en el caso de la función de LadS, pero serían necesarios más ensayos para confirmarlo.

Además, a diferencia de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. syringae* no son bacterias fijadoras de nitrógeno (Shridhar, 2012), por lo que podría existir en nuestro modelo un mecanismo por el cual RetS participa en la detección del amonio y esta cinasa podría ejercer una regulación diferencial de acuerdo con la presencia o ausencia del amonio. Esto podría explicarse en parte por la necesidad de la bacteria de controlar la producción de alginato en estado vegetativo, ya que este es un exopolisacárido necesario para la protección de las nitrogenasas. Este proceso de control se podría realizar a través un algún sistema de señalización que detectara fuentes de nitrógeno para reprimir la expresión de los *rsm*-SRNAs y así disminuir la síntesis de alginato. Al contrario, la ausencia de estos compuestos para promoverían su expresión y aumentarían la síntesis del polímero.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### Oligonucleótidos, cepas y vectores

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen a continuación:

| Cebadores  | Secuencia                                  | Longitud (Pb) | Tm (°C) |
|------------|--|---------------|---------|
| retsD      | 5'-ACC GCC GGA CTG CTG GAC AAG AAC-3'      | 24            | 65.4    |
| retsR      | 5'-GCG GCA CCT GCG GCT GGA TG -3'          | 20            | 66.8    |
| ladS1D     | 5'-CGG CAG CGC TCG GTA TTC AT-3'           | 20            | 60.4    |
| ladS1R     | 5'-CGG CTT CGA CGG CTA TCT GTT C -3'       | 22            | 60.0    |
| FRetSZ-BH1 | 5'-GGA TTC GCC AAG AGC GAA TTC CTG-3'      | 24            | 63.6    |
| RRetS-S1   | 5'-TAT GTC GAC TCA GGG ATG AAG CGC GTG -3' | 27            | 62      |
| Km1        | 5'-TTT TCC CTT GTC GAG ATA GCC C-3'        | 22            | 66.5    |
| KmFw_172   | 5'-CGG ACC GCT ATC AGG ACA TA-3'           | 20            | 56.1    |

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen a continuación:

| Cepa                                 | Características   | Referencias                     | Cultivo  |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>dlacZ</i> Delta M15 Delta( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-mK+) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> | Woodcock <i>et al.</i> , 1989.  | Medio Luria Bertani (LB)/37°C                                      |
| <i>A. vinelandii</i> UW136           | <i>algU</i> , <i>rif R</i> derivada de la cepa tipo UW (OP)   | Bishop & Brill, 1977.           | Medio BS/30°C  |
| <i>A. vinelandii</i> cepa E (AEIV)   | Cepa silvestre, Nal R   | Larsen & Haugh, 1971.           | Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.01 mg/mL                            |
| AEIV <i>gacA</i> -                   | Cepa derivada de la silvestre, deficiente en <i>gacA</i> , Gm R   | Castañeda <i>et al.</i> , 2000. | Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.01 mg/mL/<br>Gentamicina .001 mg/mL |

|  |   |               |      |  |
|--|---|---------------|------|--|
| <b>AEIV<br/><i>retS::Gm</i></b>                | Cepa derivada de la silvestre, mutante en <i>retS</i> por inserción de casete de resistencia a Gm interrumpiendo dominio transmembranal                 | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/<br>Gentamicina .001<br>mg/mL                            |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Gm<br/>rsmZ1-gusA</i></b> | Cepa AEIV <i>retS::Gm</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmZ1</i>                                     | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Gentamicin<br>a .001 mg/mL/<br>Tetraciclina .02<br>mg/mL |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Gm<br/>rsmZ2-gusA</i></b> | Cepa AEIV <i>retS::Gm</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmZ1</i>                                     | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Gentamicin<br>a .001<br>mg/mL/Tetraciclina<br>.02 mg/mL  |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Gm<br/>rsmZ6-gusA</i></b> | Cepa AEIV <i>retS::Gm</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmZ6</i>                                     | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Gentamicin<br>a .001<br>mg/mL/Tetraciclina<br>.02 mg/mL  |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Gm<br/>rsmY-gusA</i></b>  | Cepa AEIV <i>retS::Gm</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmY</i>                                      | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Gentamicin<br>a .001<br>mg/mL/Tetraciclina<br>.02 mg/mL  |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Km<br/>polar</i></b>      | Cepa derivada de la silvestre, mutante en <i>retS</i> por inserción de casete de resistencia a Gm en sentido polar interrumpiendo dominio catalítico    | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Gentamicin<br>a .001<br>mg/mL/Tetraciclina<br>.02 mg/mL  |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Km no<br/>polar</i></b>   | Cepa derivada de la silvestre, mutante en <i>retS</i> por inserción de casete de resistencia a Gm en sentido no polar interrumpiendo dominio catalítico | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Gentamicin<br>a .001<br>mg/mL/Tetraciclina<br>.02 mg/mL  |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Km<br/>rsmZ1-gusA</i></b> | Cepa AEIV <i>retS::Km</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmZ1</i>                                     | En<br>trabajo | este | Medio BS/30°C/Ac.<br>Nalidixico 0.01<br>mg/mL/Kanamicina<br>.004<br>mg/mL/Tetraciclina<br>.02 mg/mL    |

|   |   |                 |  |
|---|---|-----------------|--|
| <b>AEIV<br/><i>retS::Km</i><br/><i>rsmZ2-gusA</i></b> | Cepa AEIV <i>retS::Km</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmZ2</i> | En este trabajo | Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.01 mg/mL/Kanamicina .004 mg/mL/Tetraciclina .02 mg/mL |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Km</i><br/><i>rsmZ6-gusA</i></b> | Cepa AEIV <i>retS::Km</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmZ6</i> | En este trabajo | Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.01 mg/mL/Kanamicina .004 mg/mL/Tetraciclina .02 mg/mL |
| <b>AEIV<br/><i>retS::Km</i><br/><i>rsmY-gusA</i></b>  | Cepa AEIV <i>retS::Km</i> con fusión transcripcional pUMA Tc <i>gusA</i> T con la región reguladora de <i>rsmY</i>  | En este trabajo | Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.01 mg/mL/Kanamicina .004 mg/mL/Tetraciclina .02 mg/mL |

Los plásmidos que se utilizaron en este trabajo se describen a continuación:

| <b>Plásmido</b>                | <b>Características</b>  | <b>Referencia</b>             |
|--------------------------------|---|-------------------------------|
| <b>pGEM-T Easy</b>             | Vector de clonación, posee el promotor de transcripción T4, Amp R   | Promega                       |
| <b>pBSL98</b>                  | Vector de clonación, Amp R, Km R  | Alexeyev <i>et al.</i> , 1995 |
| <b>pBSL141</b>                 | Vector de clonación, Amp R, Gm R  | Alexeyev <i>et al.</i> , 1995 |
| <b>pGEM <i>retS::Gm</i></b>    | Vector pGEM-T Easy con fragmento de <i>retS</i> interrumpido por cassette de resistencia a Gm                   | En este trabajo               |
| <b>pGEM <i>ladS::Gm</i></b>    | Vector pGEM-T Easy con fragmento de <i>ladS</i> interrumpido por casete de resistencia a Gm                     | En este trabajo               |
| <b>pGEM <i>retS::Km P</i></b>  | Vector pGEM-T Easy con fragmento de <i>retS</i> interrumpido por casete de resistencia a Km en sentido polar    | En este trabajo               |
| <b>pGEM <i>retS::Km NP</i></b> | Vector pGEM-T Easy con fragmento de <i>ladS</i> interrumpido por casete de resistencia a Km en sentido no polar | En este trabajo               |

## Medios de cultivo

Los cultivos de las cepas de *A. vinelandii* se realizarán en medio mínimo Burk Sacarosa (BS) cuya composición es la siguiente:

|  |  |
|--|--|
| Sacarosa 2 g/l                                 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.0002 g/l |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.183 g/l      | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.06 g/mL                      |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.073 g/l | MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0.16 g/l                  |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.005 g/l | Bacto agar (sólido) 15 g/l                                     |

Para inducir el estado de competencia, las cepas de *A. vinelandii* se cultivarán en medio de competencia CM, con las mismas concentraciones de compuestos del medio BS pero sin adicionar FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

Los cultivos en medio líquido se incubarán en matraces de 125 mL con 25 mL de medio adicionados con antibióticos de selección en una incubadora a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 48 h. Los cultivos en medio sólido se incubarán en placas de Petri a 30 °C durante 48 h.

Los cultivos de las cepas de *E. coli* se realizarán en medio Luria Bertani (LB) cuya composición es la siguiente:

|                      |       |                     |       |
|----------------------|-------|---------------------|-------|
| Peptona de caseína   | 10g/l | NaCl                | 10g/l |
| Extracto de levadura | 5 g/l | Agar (medio sólido) | 15g/l |

Los cultivos de esta bacteria en medio líquidos se llevarán a cabo en matraces de 125 mL con 50 mL de medio adicionados con antibióticos de selección en una incubadora a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 12 h. Los cultivos en medio sólido se harán en placas de Petri incubadas a 37 °C durante 12 h.

### **Obtención de ADN total de *A. vinelandii*.**

- 1.- Inocular 25 mL del medio adecuado con antibiótico de selección, incubar 48h/30°C a 200 rpm.
- 2.- Empaquetar por centrifugación el cultivo celular hasta obtener una pastilla que no sobrepase de 100 µL.
- 3.-Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 300 µL de TE (Tris-EDTA) 50:20 y pasarlos a un tubo Eppendorf.
- 4.-Centrifugar a 12 000 rpm por 5 min, eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 450 µL de TE 50:20
- 5.-Agregar 50 µL de lisozima (10 mg/mL), mezclar e incubar a 37° C por 30 min.
- 6.-Agregar 50 µL de proteasa (10 mg/mL), mezclar e incubar a 37° C por 30 min.
- 7.-Agregar 50 µL de SDS al 10%, mezclar e incubar a 37° C por 15 min o hasta observar una solución viscosa.
- 8.-Agregar 100 µL de NaCl 5 M, mezclar e incubar a 65° C por 10 min.
- 9.-Agregar 80 µL de CTAB 10% / NaCl 0.7 M (esta solución se debe incubar previamente a 65° C por 5 min para facilitar su manejo).
- 10.-Mezclar e incubar a 65° C por 20 min, agregar 500 µL de Cloroformo-Alcohol Isoamilico 24:1, vortexear y centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
- 11.-Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf, hacer esto con cuidado para no arrastrar restos celulares en suspensión.
- 12.-Agregar 10µL de sílica a la muestra y dejar reposar 10 min.
- 13.-Centrifugar por 2 min y decantar el sobrenadante.
- 14.- Lavar pastilla 3 veces con 500µL de la solución de New Wash (1µL de la solución stock 10X, 9 ml de agua destilada y 10µL de etanol absoluto)
- 15.- Resuspender con vortex y centrifugar a 13,000 rpm por 2 min.
- 16.- Retirar todo el sobrenadante y se secará el pellet a 55°C.
- 17.-Resuspender en 30µL de RNAsa diluida (2µL/ml de H2O) e incubar por 1h a 37°C.
- 18.-Centrifugar 13,000 rpm y tomar cuidadosamente el sobrenadante (evitando tomar restos de sílica) para pasarlo a un nuevo tubo Eppendorf.

### **Extracción de plásmido por perclorato de *E.coli***

1. Inocular 5 mL del medio adecuado con antibiótico de selección, incubar 12 h, 37 °C a 200 rpm.
2. Centrifugar el cultivo en tubos Falcon de 15 mL, desechar sobrenadante.
3. Resuspender pastilla en 175 µL de solución TES y pasar a tubos Eppendorf.
4. Agregar 25 µL de lisozima (10mg/mL) y mantener 20 min en hielo.
5. Agregar 400 µL de agua helada e incubar 15 min a 73 °C.
6. Centrifugar 15 min y transferir sobrenadante a tubo nuevo.
7. Agregar 60 µL de NaClO<sub>4</sub> 5M.
8. Agregar 600 µL de isopropanol, mezclar y centrifugar 15 min.
9. Lavar el pellet con etanol al 70% 3 veces.
10. Secar la pastilla y resuspender en 50 µL de RNAsa diluída (20mg/mL) e incubar 1 h a 37 °C.

-Solución TES: Sacarosa al 15%, TRIS 50 mM a pH 8.5, EDTA 50 mM a pH 8.0.

### **Extracción de plásmido por MaxiPrep de *E.coli***

1. Cultivar la cepa en 50 mL de LB 12 h con antibiótico de selección a 37 °C a 200 rpm.
2. Transferir las células a un tubo Falcon de 50 mL, centrifugar 2 min.
3. Resuspender la pastilla en 10 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, centrifugar 2 min.
4. Resuspender la pastilla en 1.5 mL la solución de lisis alcalina I.
5. Agregar 3.5 mL de la solución II e invertir el tubo lentamente 2-3 veces.
6. Agregar 2.5 mL de la solución III e incubar durante 10 min en hielo, agitar fuertemente antes de incubar.
7. Centrifugar 10 min y transferir el sobrenadante a tubos Falcon de 15 mL.
8. Precipitar el DNA con 1 volumen de isopropanol, mantener en hielo 15 min y centrifugar 10 min.
9. Decantar el sobrenadante.

10. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, centrifugar 2 min.
11. Repetir el lavado 3 veces.
12. Secar la pastilla, resuspenderla en 200  $\mu$ L de RNAsa diluída (20 mg/mL), e incubar 12 h a 37 °C.

-Solución I. Para 100 mL: Glucosa 50 mM 0.9g, EDTA 10 mM 0.37 g, Tris 25 mM 0.3 g, pH 8.0

-Solución II: NaOH 2N, SDS 10%

-Solución III: Para 100 mL: Acetato de potasio 3 M 29.45 g, Ac. Acético Glacial pH 4.8.

### **Amplificación de genes por PCR**

A partir de una muestra de DNA se realiza la técnica de PCR para poder amplificar un fragmento específico de DNA. Para reacciones de 50  $\mu$ L se agregan los siguientes reactivos a cada tubo de reacción:

Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar gen.

| <b>Reactivo</b>                           | <b>Volumen</b> |
|---|----------------|
| Buffer 10X                                | 5 $\mu$ L      |
| Cebador (Delantero)                       | 1 $\mu$ L      |
| Cebador (Reverso)                         | 1 $\mu$ L      |
| Templado de DNA                           | 1 $\mu$ L      |
| Mezcla de dNTP's (A, T, G, C) 12.5 mM c/u | 8 $\mu$ L      |
| Taq ADN polimerasa                        | 0.2 $\mu$ L    |
| H <sub>2</sub> O                          | 31.8 $\mu$ L   |
| Volumen final                             | 50 $\mu$ L     |

Los pasos para llevar a cabo esta reacción son los siguientes:

1. Un ciclo de desnaturalización, 95°C/5 min
2. 30 ciclos de: a) Desnaturalización, 95°C/1 minuto; b) alineamiento Tm/1 minuto; c) extensión 72°C/ x min
3. Un último ciclo de extensión de 72°C/10 min.

### **Transformación de *E. coli* por electroporación**

1. Tomar 200 µL de células de *E.coli* competentes y 5 µL del vector a introducir.
2. Mezclar y colocar 50 µL de esta mezcla en una celda para electroporar.
3. Introducir la celda en el electroporador BIO-RAD<sup>MR</sup>.
4. Dar un pulso (25 µF and 200Ω) y posteriormente agregar 1 mL de medio SOC.
5. Pasar esta mezcla a un tubo Eppendorf e incubar durante 1 h a 37°C en agitación constante. De ese cultivo, tomar 200 µL e inocular en medio LB sólido con antibiótico de selección, incubándose a 37°C por 12-18 h, para seleccionar las colonias transformantes.

-Medio SOC: Bacto triptona 20g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 0.5 g/l, KCl 250 mM 10 mL, MgCl<sub>2</sub> 2M 5mL, glucosa 1M 20 mL, pH 7.

### **Transformación de *A. vinelandii***

1. Cultivar la cepa de *A. vinelandii* 2 veces en medio CM incubándolo 48 h a 30 °C
2. Recolectar el tapete celular para inocular 25 mL de medio CM líquido. Incubar 24-36 h a 30 °C a 200 rpm.
3. Recuperar las células por centrifugación.
4. Lavar las células con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
5. Resuspender las células en 2 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
6. Tomar 200 µL de células competentes y agregar 50 µL de DNA plasmídico en un tubo Eppendorf.

7. Colocar la mezcla sobre medio CM sólido, extender la solución células-DNA con movimientos suaves. Incubar a 30 °C durante 48 h.
8. Recolectar el tapete, lavar con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y resuspender en 200 µL de esta misma solución.
9. Plaquear en medio BS con antibiótico(s) de selección.
10. Incubar a 30 °C durante 48 h.
11. Seleccionar las colonias transformantes.

### **Cuantificación de proteína por el método de Lowry**

1. Tomar 1 mL del cultivo problema de *A vinelandii*.
2. Centrifugar células y lavar con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
3. Resuspender nuevamente el paquete celular en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM
4. Tomar de 10 a 50 µl de muestra (dependiendo de densidad celular) y llevar a 200 µl con de MgSO<sub>4</sub> 10 mM en otro tubo Eppendorf.
5. Añadir 1 mL de la solución reactiva y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
6. Añadir 100 µL del reactivo de Folin diluido con un volumen de agua destilada y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
7. Leer absorbancia 595 nm.
8. Simultáneamente realizar una curva de calibración utilizando un estándar de albúmina para calcular los µg prot/mL

| Albúmina (2 µg/µl) | H <sub>2</sub> O(µl) |
|--------------------|----------------------|
| 2                  | 198 µl               |
| 4                  | 196 µl               |
| 8                  | 192 µl               |
| 16                 | 184 µl               |
| 32                 | 168 µl               |

## Cuantificación de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.

- 1.- Obtener un pre-inóculo de 18-24 h de *A vinelandii*.
- 2.- Inocular 50 mL BS con 1 mL de preinóculo anterior, incubar a 30°C por 48 h.
- 3.- Tomar 1 mL de cultivo o más dependiendo de la densidad celular y centrifugar para obtener el paquete celular.
- 4.- Resuspender 20  $\mu$ L y agregar 710  $\mu$ L de Buffer Z. Preparar al mismo tiempo el blanco que contenga 730  $\mu$ L de buffer Z y procesarlo junto con las muestras. (Vol tRx)
- 5.- Agregar 10  $\mu$ L de lisozima 10mg/mL e incubar tubos 5 min a 37°C en baño María.
- 6.- Agregar 10  $\mu$ L de solución de Tritón 10%.
- 7.- Agregar 100  $\mu$ L del sustrato de la enzima PNPG (P-nitrofenil-  $\beta$ -D-glucopiranosido), transferir los tubos inmediatamente a un baño de agua a 28°C y cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
- 8.- Agregar 150  $\mu$ L de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para detener la reacción.
- 9.- Leer la absorbancia a 405 nm contra el blanco.

Las unidades reportadas son unidades Miller que equivalen a los nmoles de para-nitrofenil generados cada minuto a 28°C/mg de proteína.

$$U \beta\text{-glucoronidasa} = \frac{DO_{act}(405)(1000)}{(0.018)(t \text{ Rx min})(Vol \text{ Rx})(ug \text{ prot/mL})}$$

- Lisozima: Disolver 10 mg de lisozima en 1 mL de agua destilada (10 mg/mL)
- PNPG: Disolver 40 mg de PNPG (P-nitrofenil- $\beta$ -D-glucorónido) en 10 mL de agua.
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Disolver 12.72 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 100 mL de agua destilada.
- Tritón 100X: Solución 10% v/v de tritón en agua destilada estéril.

| Buffer Z                        |         | Stock de 10 mL | Pesar  | Diluir en |
|---------------------------------|---------|----------------|--------|-----------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.03 M  | 0.5 M          | 0.87 g | 3 mL      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.02 M  | 0.5 M          | 0.68 g | 2 mL      |
| EDTA                            | 0.001 M | 0.25 M         | 0.93 g | 0.2 mL    |
| DDT                             | 0.005 M | 0.25 M         | 0.38 g | 1 mL      |
|                                 |         |                |        | Vf= 50 mL |

## Cuantificación de alginato

1. Precultivo de 25 mL de medio de cultivo BS con antibiótico de selección durante 18-24 h de las cepas en cuestión a 30 °C
2. Cultivo de 48 h por triplicado sin antibióticos.
3. Tomar y centrifugar aprox. 10 mL de cultivo y coleccionar sobrenadante en tubos de 50 mL.
4. Lavar las células con EDTA 0.01 M, vortexear y centrifugar 10 min
5. Coleccionar el sobrenadante en el mismo tubo donde se coleccionó anteriormente el sobrenadante.
6. Separar las células y determinar proteína por método de Lowry.
7. Precipitar sobrenadante con 2 volúmenes de isopropanol frío.
8. Recuperar precipitado (alginato), secar y resuspender en 1 mL de agua desionizada.

### Reacción alginato carbazol:

1. Depositar 1.5 mL de solución de ácido sulfúrico- boratos en tubos de ensayo de vidrio previamente sumergidos en hielo.
2. Tomar de 50 a 150 µL de solución problema y llevarla a un volumen de 175 µL con agua desionizada.
3. Colocar esta disolución sobre la superficie de la solución de ác. Sulfúrico-boratos.
4. Correr paralelamente una curva estándar de alginato con las siguientes concentraciones:

| Tubo       | µL de solución stock | µL de agua desionizada |
|------------|----------------------|------------------------|
| 1          | 175                  | 0                      |
| 2          | 140                  | 35                     |
| 3          | 105                  | 70                     |
| 4          | 70                   | 105                    |
| 5          | 35                   | 140                    |
| 6          | 17.5                 | 157.5                  |
| 7          | 8.75                 | 166.25                 |
| 8 (Blanco) | 0                    | 175                    |

5. Añadir 50  $\mu\text{L}$  de carbazol al 0.1%, vortexear cuidadosamente
6. Colocar la reacción en baño de agua en termoblock a 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.
7. Dejar que los tubos se enfríen.
8. Medir absorbancia a 530 nm en celdas de cuarzo.
9. Reportar en mg de alginato/ mg de proteína.

-Solución ác. Sulfúrico-boratos: Ácido sulfúrico 146 mL, solución boratos 4 mL, volumen final 150 mL.

### Cuantificación de PHB

1. Precultivo de 25 mL de medio de cultivo BS con antibiótico de selección durante 18-24 h de las cepas en cuestión a 30  $^{\circ}\text{C}$
2. Cultivo de 48 h por triplicado sin antibióticos.
3. Tomar y centrifugar aprox. 10 mL de cultivo, separar la mitad para cuantificar proteína y la otra mitad para cuantificar PHB
4. Centrifugar las células y lavarlas con 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM
5. Lavar una vez con 1 mL de agua destilada
6. Agregar 1 mL de  $\text{NaHCl}$  al 30% e incubar 1-1:30 ha 37 $^{\circ}\text{C}$  en agitación y centrifugar 2 min
7. Lavar el paquete con 1 mL de agua destilada y centrifugar 2 min
8. Lavar el paquete con 1 mL de etanol al 100% y centrifugar 2 min
9. Lavar el paquete con 1 mL de acetona y centrifugar 2 min
10. Secar el paquete
11. Disolver en 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y transferir a un tubo de cristal
12. Incubar a 90 $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min
13. Leer absorbancia a 235 nm

$$A = \epsilon bc$$

$$c = \frac{A}{\epsilon b}$$

$$b = 1 \text{ cm}$$

$$\epsilon = 15,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

## 9. BIBLIOGRAFIA

Aarons, S. *et al.* (2000). "A Regulatory RNA (*PrrB* RNA) Modulates Expression of Secondary Metabolite Genes in *Pseudomonas fluorescens*". *Journal of Bacteriology*. 182(14): 3913–3919.

Alexeyev, M., Shokolenko, I. & Croughan, T. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*. 160(1):63-67. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-I](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-I)

Bishop, P. & Bott K. (1977). Genetic Analysis of *Azotobacter vinelandii* Mutant Strains Unable to Fix Nitrogen. *Journal of Bacteriology*. 130(2): 954-56.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L. *et al.* (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol*, 73(3):434-445

Bordi, C., Lamy, M.C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol*.76:1427-43.

Bustillos, M. (2005). Estudio de la regulación transcripcional del gen *rsmB* en *Azotobacter vinelandii*. (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas.

Capra, E.J. & Laub, M.T. (2012). "Evolution of two-component signal transduction systems.". *Annual Review of Microbiology*. 66: 325–47. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150039.

Castañeda, M. *et al.* (2000). "The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*." *J Bacteriol*.182(9):2624-8.

Castañeda, M. *et al.* (2001). "The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*." *J Bacteriol*. 183(23):6787-93.

Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M. *et al.* (2016) The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 12(5): e1006032. doi:10.1371/journal.pgen.1006032

Cocotl-Yanez, M., Moreno, S., Encarnación, S. López-Pliego, L., Castañeda, M. & Espin, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *A. vinelandii*. *Microbiology*. 160, 479-87.

Cruz, Y. (2012). ““Estudio de la influencia de factores ambientales y genéticos en la expresión de *rsmB* en *Azotobacter vinelandii*””. (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas.

Daines, D.A., Granger-Schnarr, M., Dimitrova, M. & Silver RP. (2002). Use of LexA-based system to identify protein-protein interactions in vivo. *Methods Enzymol* 358, 153-61.

Galindo, E.C. Peña, Núñez, C., Segura, D. & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.*16: 6:7.

Gao, R. & Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol.* 63:133-54. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214.

Gao, R., Mack, T. R., & Stock, A. M. (2007). Bacterial Response Regulators: Versatile Regulatory Strategies from Common Domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), 225–234. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.002>

Goodman, A.L. Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. & Lory, S. (2004). A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell.* 7:745–754.

Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & Development*, 23(2), 249–259. <http://doi.org/10.1101/gad.1739009>

González-Chavez, R., Alvarez, A., Romeo, T., & Georgellis, D. (2010). The Physiological Stimulus for the BarA Sensor Kinase. *Journal Of Bacteriology*, 192(7), 2009-2012.

Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D. (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 184:1046-1056.

Haas, D. & Defago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 3:307–319. doi: 10.1038/nrmicro1129.

Hay, I.D. *et al.* (2014). “*Genetics and regulation of bacterial alginate production*”. *Environmental Microbiology*. 16(10):2997-3011

Heeb, S. & Haas, D. (2001). “Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria”. *MPMI* 14(12):1351–1363.

Hernández-Eligio *et al.* (2012). “*RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in Azotobacter vinelandii*” *Microbiology*. 158:1953–1963.

Hsu, J.-L., Chen, H.-C., Peng, H.-L., & Chang, H.-Y. (2008). Characterization of the Histidine-containing Phosphotransfer Protein B-mediated Multistep Phosphorelay System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(15): 9933–9944. <http://doi.org/10.1074/jbc.M708836200>

Humair, B., González, N., Mossilaos, D., Reimann, C. & Haas, D. (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *The ISME Journal*. 3: 955–965. Doi:10.1038/ismej.2009.42

Kwon, O., Georgellis, D. & Lin, EC. (2000). Phosphorelay as the physiological route of signal transmission by the Arc two-component system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 3858-62.

Kennedy, C. & Toukdarian, A. (1987). Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:227-58.

Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H. & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* 67: 241–253.

Larsen, B. & Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginate, composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydrate Research*. 17: 287-296.

Maldonado, R., Jiménez, J., & Casadesús, J. (1994). Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology*. 176(13): 3911–3919.

Manzo *et al.* (2011). "Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*." *J Mol Microbiol Biotechnol*. 21(3-4):147-59.

Muriel-Millán, L. *et al.* (2015). The Unphosphorylated EIIA<sup>Ntr</sup> Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS One*. 10(2):e0117184. doi: 10.1371/journal.pone.0117184.

Mulcahy H, *et al.* (2008). *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect. Immun*. 76:632– 638.

Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 76(1), 46–65. <http://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>

Narula, N. (2000). *Azotobacter* in sustainable agriculture, CBS publishers.

Navarro da Silva, A. & Garcia-Cruz, C. (2010). Biopolymers by *Azotobacter Vinelandii*, *Biopolymers*, Magdy Elnashar (Ed.), ISBN: 978-953-307-109-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biopolymers-by-azotobacter-vinelandii>

*P2CS Database (Prokaryotic 2-Component System Database)*, 18 Apr. 2018. Available from: [www.p2cs.org/index.php?searchTax=azotobacter+vinelandii&subTax=nameSpecie&PHPSESSID=962663130117b6a51c1d25950bfc0449&ion=browse](http://www.p2cs.org/index.php?searchTax=azotobacter+vinelandii&subTax=nameSpecie&PHPSESSID=962663130117b6a51c1d25950bfc0449&ion=browse).

Parkinson, J.S. & Kofoed, C.E. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu.Rev. Genet* 26:71-112.

Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzman, J., González, L., & Espin, G. (2002). "Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly-Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR" *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 184(20):5672–5677

Records, A. & Gross, D. (2010). Sensor Kinases RetS and LadS Regulate *Pseudomonas syringae* Type VI Secretion and Virulence Factors. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 192(14): 3584–3596. doi:10.1128/JB.00114-10.

Reusch, R. N., & Sadoff, H.L. (1979). "5-n-Alkylresorcinols from encysting *Azotobacter vinelandii*: isolation and characterization". *J. Bacteriol.* 139:448–453.

Reusch, R.N., Sadoff, H.L. (1983). Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature*. 302:268–270.

Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology*. 29(6):1321–1330.

Romero *et al.* (1998). "Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB" *Molecular Microbiology* 29(6):1321–1330.

Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M.A., Castañeda, M. *et al.* (2016) The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE* 11(4): e0153266. doi:10.1371/journal.pone.0153266

Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516–539.

Sánchez Cuapio, Zaira (2012). Estudio de la cascada de regulación GacS/RetS/LadS/GacA-*rsmZ* en *Azotobacter vinelandii*. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas.

Segura, D., Nuñez, C. & Espín, G. (2014). *Azotobacter* Cysts. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000295.pub2

Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Wood, D. *et al.* (2009). Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534–4545. <http://doi.org/10.1128/JB.00504-09>

Shridhar, B.S. (2012). Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiological Research* 3(1): 46-52. DOI: 10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103

Stover, C.K., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406(6799):959-64. Epub 2000/09/13. doi: 10.1038/35023079

Tindale, A.E., Mehrotra, M., Ottem, D. & Page, W. J. (2000). Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology*.146:1617-26.

Ventre, I. *et al.*, (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.103(1):171-6.

Wang, S. (2012). Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms, Protein Phosphorylation in Human Health, Dr. Cai Huang (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/48277. Available from: <https://www.intechopen.com/books/protein-phosphorylation-in-human-health/bacterial-two-component-systems-structures-and-signaling-mechanisms>

West, A.H. & Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*. **26** (6): 369–76. doi:10.1016/s0968-0004(01)01852-7

Woodcok, D. M. *et al.* (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17, 3469-78.

Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., Murata, K. (2011). *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum. *J Appl Microbiol.* 111:932-938.