



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGIA**

**Estudio genético funcional de la interacción de las
cinastas GacS y LadS en *Azotobacter vinelandii***

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCION EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA
Q.F.B. Verónica Acocal González**

**DIRECTOR DE TESIS
D.C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO**

**ASESORES DE TESIS
D.C. ALBERTO RAMÍREZ MATA
D.C. BEATRIZ EUGENIA BACA
D.C. LILIANA LOPEZ PLIEGO
D.C. MIGUEL COCOTL YAÑEZ**

Puebla, Pue.

Diciembre, 2020

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mis padres, a mi tía, a mi hermano. Todo lo que soy se lo debo a ustedes.

Al D.C. Miguel por confiarme este proyecto y por guiarme durante todo este tiempo con paciencia y sabiduría. Muchas gracias.

A Lili por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

A todos los compañeros del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana que conocí durante mi estancia, especialmente a mis compañeras y amigas, Moni y Diana por haberme brindado su amistad incondicional.

Al CONACyT, VIEP, ICUAP y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, por el apoyo y becas otorgadas.



ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los sistemas de doble componente	1
1.2 El sistema de doble componente GacS/GacA	3
1.3 El sistema de regulación post-transcripcional Rsm.....	3
1.4 <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
1.5 Síntesis de alginato en <i>Azotobacter vinelandii</i>	5
1.6 Regulación de la síntesis de alginato por el sistema Gac-Rsm	7
1.7 Las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS	8
2. ANTECEDENTES	10
3. JUSTIFICACION	13
4. HIPOTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1 General.....	13
5.2 Particulares	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1 Material biológico	12
6.2 Oligonucleótidos.....	16
6.3 Vectores	16

6.4 Medios de cultivo	17
6.5 Metodologías.....	18
6.5.1 Extracción de plásmido por MaxiPrep de <i>Escherichia coli</i>	18
6.5.2 Extracción de plásmido por perclorato de <i>Escherichia coli</i>	19
6.5.3 Obtención de ADN total de <i>Azotobacter vinelandii</i>	19
6.5.4 Preparación de células competentes de <i>Azotobacter vinelandii</i>	21
6.5.4.1 Transformación de <i>Azotobacter vinelandii</i>	21
6.5.5 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	21
6.5.6 Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa.....	22
6.5.7 Cuantificación de alginato	23
6.5.8 Cuantificación de la actividad β -galactosidasa	25
6.5.9 Expresión de la región citoplasmática de LadS.....	26
6.5.10 Obtención del extracto soluble	26
6.5.11 Cromatografía de afinidad IMAC Ni-NTA	27
6.5.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes PAGE-SDS.....	28
6.5.13 Tinción con azul de Coomassie	29
6.5.14 Amplificación de genes por PCR.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 Construcción de la doble mutante <i>gacSladS</i> de <i>Azotobacter vinelandii</i> cepa E (AEIV).....	30

7.2 Efecto de la doble mutación <i>gacS</i> / <i>ladS</i> en la producción de alginatos	32
7.3 Ensayo de doble híbrido cuantitativo de las cinasas GacS/RetS y GacS/LadS de <i>Azotobacter vinelandii</i>	33
7.4 Construcción de las mutantes dobles <i>gacS</i> / <i>ladS</i> en las cepas E de <i>Azotobacter vinelandii</i> que portan las fusiones transcripcionales <i>rsmZ1-gusA</i> , <i>rsmZ2-gusA</i> y <i>rsmY-gusA</i>	34
7.5 Construcción de las mutantes <i>gacS</i> en las cepas E de <i>Azotobacter vinelandii</i> que portan las fusiones transcripcionales <i>rsmZ1-gusA</i> , <i>rsmZ2-gusA</i> y <i>rsmY-gusA</i>	35
7.6 Efecto de la mutación sencilla <i>gacS</i> y la doble mutación <i>gacS</i> / <i>ladS</i> sobre la expresión de los <i>rsms</i> -sRNAs	37
7.7 Construcción del vector de expresión pET21a+ <i>ladS</i>	40
7.8 Transferencia del plásmido pET21a+ <i>ladS</i> a la cepa de <i>E. coli</i> BL21	41
7.9 Evaluación de las condiciones para la producción de LadS.....	42
7.10 Purificación de la región citoplasmática de la cinasa LadS	46
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	50
10. PERSPECTIVAS	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria del suelo que produce dos polímeros de interés industrial: poli- β -hidroxibutirato y alginato. En *A. vinelandii*, la producción de alginato está bajo el control del sistema de dos componentes (TCS) GacS/GacA. Este TCS a su vez controla al sistema regulador postranscripcional Rsm estableciendo así una cascada que regula la biosíntesis de alginato controlando la expresión del gen estructural *algD*. GacA activa la transcripción de ocho sRNA (RsmZ1-7 y RsmY) que contrarrestan la actividad represora de la proteína RsmA que se une al mRNA *algD* impidiendo su traducción.

Adicionalmente, la actividad del sistema GacS/GacA se puede modular mediante proteínas accesorias. En *Pseudomonas aeruginosa*, las cinasas RetS y LadS tienen una influencia negativa y positiva, respectivamente, sobre la expresión del sRNA *rsmZ* dependiente de GacA. En esta bacteria RetS ejerce su actividad reguladora a través de su interacción con GacS, esta interacción bloquea funcionalmente la actividad de la cinasa. Por otro lado, LadS estimula positivamente la actividad de GacS. *A. vinelandii* tiene un homólogo de RetS y un homólogo putativo de la proteína LadS. En un trabajo previo en nuestro laboratorio, se realizó un ensayo cualitativo de dos híbridos entre RetS con GacS y LadS con GacS, observando que RetS interactúa con GacS, sin observar dicha interacción entre LadS y GacS. Posteriormente se construyeron mutantes *retS* y *ladS*, en la cepa mutante *retS* disminuyó la producción de alginato, mientras que la mutante *ladS* aumentó la producción de polímero, sugiriendo que RetS funciona como regulador positivo y LadS como regulador negativo, en contraste con lo reportado en *P. aeruginosa*.

En este trabajo, se generó una doble mutante *gacSladS*. La doble mutación *ladSgacS* generó una disminución considerable en la síntesis de alginato y en la expresión de *rsmz1*, *rsmz2* y *rsmY* a niveles de la mutante sencilla *gacS*. Los resultados obtenidos nos sugieren que GacS es dominante con respecto a LadS en el sistema regulatorio, que LadS requiere la presencia de GacS para realizar su función. Indicando también una posible interacción entre ambas cinasas. Sin embargo, llevando a cabo un ensayo de doble híbrido cuantitativo confirmamos que este sistema no detecta interacción entre GacS y LadS. Como alternativa se propone un ensayo tipo *pull down* para interacción entre proteínas, por lo que se generó la cepa de *E. coli* que expresa la región citoplasmática de LadS y se evaluaron las condiciones para su correcta expresión y purificación.

INTRODUCCION

1.1 Los sistemas de doble componente

Los sistemas de doble componente (TCS, por sus siglas en inglés) sirven como un mecanismo de acoplamiento estímulo-respuesta para permitir a los organismos detectar y responder a los cambios en diferentes condiciones ambientales (Stock et al., 2000). La mayoría de las especies bacterianas contienen varias decenas de sistemas de doble componente que regulan una amplia variedad de comportamientos, incluidos procesos fundamentales, como el metabolismo y la motilidad, además de procesos especializados, como la virulencia y el desarrollo (Gao et al., 2009).

La mayoría de los TCS bacterianos constan de dos proteínas, una cinasa histidínica (HK) y un regulador de respuesta (RR). Generalmente la HK tiene un dominio amino-terminal detector (estímulo específico, no conservado) que atraviesa la membrana. Este dominio conecta con un dominio citoplasmático conservado, llamado dominio DHp ó H1 (dimerización y fosfotransferencia a Histidina), que sucesivamente se une a un dominio llamado CA (catalítico), el cual es otro componente conservado en las HKs (Stewart, 2010). La HK detecta señales específicas, eso conduce a la activación de la actividad de cinasa y a la autofosforilación de un residuo conservado de histidina en su dominio DHp o H1. El grupo fosforilo se transfiere posteriormente a un residuo de Asp ubicado en el dominio de fosforilación del RR llamado dominio REC o D2 para activar sus funciones de regulador transcripcional. Los RR además del dominio REC poseen un dominio de salida que regularmente es un dominio de unión a DNA (Figura 1a) (Wang, 2012). Las HK funcionan como dímeros en donde se ha demostrado que se establece un mecanismo de trans-fosforilación en el cual, el dominio CA de una subunidad del dímero fosforila al residuo His específico del dominio DHp de la otra subunidad (Gao et al., 2009). En la mayoría de los casos, las HKs son bifuncionales de tal manera que, cuando no se estimulan para autofosforilarse, pueden actuar como fosfatasas para su RR afín (Capra, 2012).

Existen HKs no convencionales, llamadas HKs híbridas, que tienen una organización más elaborada, contienen dominios adicionales, estos pueden ser un dominio REC (D1) ó HPt también llamado H2. Estas cinasas utilizan un esquema de fosforilación de varios pasos, denominado fosforelevo. En este tipo de HKs la fosforilación ocurre del dominio H1 al dominio D1 y finalmente al dominio H2 (Figura 1b) (Georgellis et al., 1997).

Como se mencionó los RR poseen una arquitectura modular definida por un dominio receptor (REC) conservado y un dominio de salida o efector variable. La mayoría de los RR son proteínas de unión al ADN que funcionan como activadores o inhibidores de la transcripción de una manera dependiente de la fosforilación (Stewart, 2010; Gao et al., 2009). Aunque en menor proporción los RR también presentan dominios de salida con actividad enzimática como: metilesterasas, adenilato ciclasas, diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP, histidina quinastas, proteína quinastas serina/treonina y proteínas fosfatasas (Galperin, 2010).

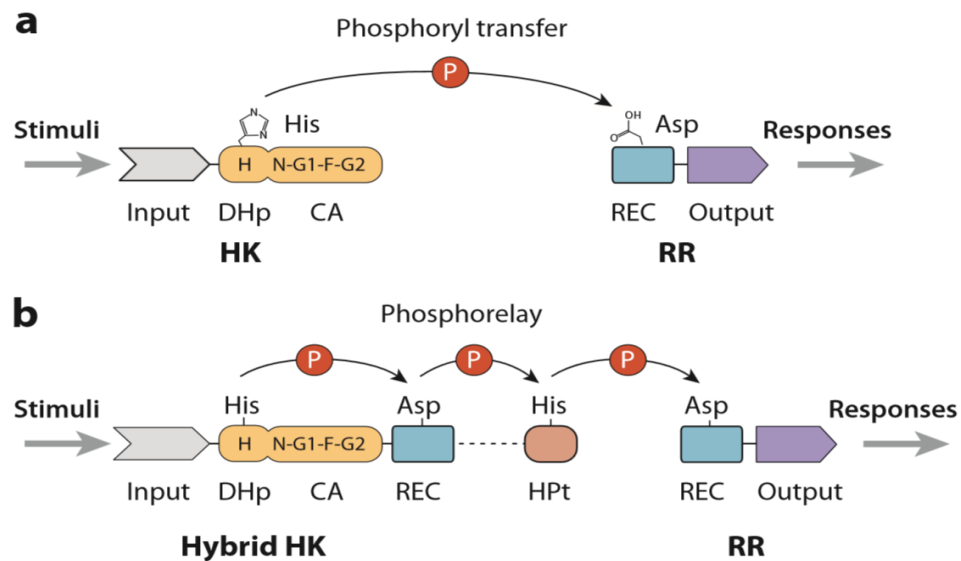


Figura 1. Sistema de doble componente. a) Fosfotransferencia entre el núcleo de la HK (DHp y CA) y el RR (REC). **b)** Esquema de fosforilación utilizado por HK híbridas que implican dominios REC y HPt adicionales para múltiples eventos de fosfotransferencia. El dominio HPt intermedio puede ser una proteína independiente o estar unido a la HK (Tomada de Gao & Stock, 2009).

1.2 El sistema de doble componente GacS/GacA

La cinasa histidínica GacS y el regulador de respuesta GacA (homólogo al sistema BarA/UvrY en *Escherichia coli*), son miembros de un sistema de doble componente que está presente en una amplia variedad de bacterias Gram-negativas y se ha estudiado principalmente en bacterias entéricas y del género *Pseudomonas*. De manera general los sistema GacS/GacA homólogos controlan la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares implicadas en la patogenicidad de plantas y animales, la formación de biopelículas y la movilidad (Heeb et al., 2001). GacS se ha clasificado como una HK híbrida, con un dominio detector entre dos motivos transmembranales, así como los dominios citoplasmáticos REC y Hpt. El regulador de respuesta GacA, posee dos dominios: un receptor y un dominio con un motivo hélice-giro-hélice implicado en la unión al DNA. GacA puede actuar activando o reprimiendo la expresión de sus genes regulados (Heeb et al., 2001).

1.3 El sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZ

En muchas γ -proteobacterias, el sistema GacS/GacA controla positivamente la expresión de genes que codifican pequeños RNAs (sRNAs) de la familia Rsm. Estos sRNAs se han clasificado en varias subfamilias, entre ellas encontramos a las denominadas RsmZ, RsmY y RsmX (en *Pseudomonas* y bacterias relacionadas) (Moll, 2001).

Estos sRNAs junto a la proteína RsmA constituyen el sistema regulador post-transcripcional Rsm, siendo este un sistema homólogo al sistema Csr de enterobacterias (Romeo, 1998). La proteína RsmA puede actuar como un activador transcripcional uniéndose al transcrito líder y alterando una estructura de ARN que de otra manera bloquearía el sitio de unión a ribosoma (Vakulskas, 2012). Sin embargo, RsmA, en la mayoría de los casos, funciona como un represor traduccional de sus ARNm diana que contienen uno o varios sitios de

unión a RsmA, uno de los cuales puede encontrarse dentro de la secuencia de unión a ribosoma o Shine-Dalgarno (Lapougue et. al, 2008). A su vez, los sRNAs Rsm contienen múltiples sitios de unión a RsmA y tienen la capacidad de secuestrar a la proteína RsmA aliviando la represión ejercida por esta proteína sobre sus ARNm diana favoreciendo su traducción y estabilidad (Heeb, 2001; Vakulskas, 2012).

1.4 *Azotobacter vinelandii*

La familia *Pseudomonadaceae*, además de numerosos géneros de *Pseudomonas* incluye los géneros *Azotobacter* y *Azomonas* (Becking, 2006). *Azotobacter vinelandii* es una bacteria Gram-negativa, aerobia, organotrófica, fijadora de nitrógeno, perteneciente a las γ -proteobacterias y a la familia *Pseudomonadaceae*. Estas bacterias son grandes, ovoides y pleomórficas observándose como bacilos o células cocoides. La morfología puede cambiar con diversas condiciones de crecimiento. Las células se encuentran normalmente en pares, pero las células individuales o las cadenas cortas se pueden visualizar también. Las células miden 2 μm de diámetro y 4 μm de longitud. Son móviles mediante flagelos periticos (Becking 2006; Segura et. al, 2014).

A. vinelandii es una bacteria poliploide, es decir posee varias copias de su cromosoma, se calcula que pueden tener hasta 80 copias cuando es crecida en medios ricos. El número de copias varía dependiendo del medio y las condiciones de cultivo, así como de la fase de crecimiento (Maldonado et. al, 1994).

Bajo condiciones ambientales adversas *A. vinelandii* puede sufrir un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación. Los quistes maduros están rodeados por dos capas denominadas exina e intina, cada una de las cuales contiene una alta proporción de alginato para mantener la integridad estructural (Sadoff, 1976). El alginato es esencial para el enquistamiento ya que es un componente de las dos capas que cubren a los quistes maduros (exina e intina), de las cuales el 32 y 13% de su peso seco es alginato. El alginato también

es producido en células vegetativas no diferenciadas, en estas condiciones la función del alginato podría estar relacionada con la formación de películas que le permiten a la bacteria adherirse a superficies o también actuar como una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados (Espín, 2009).

A. vinelandii produce también otros metabolitos secundarios relacionados con el proceso de enquistamiento: el poliéster intracelular polihidroxibutirato (PHB) que funciona como reservorio de la fuente de carbono y los lípidos fenólicos alquilresorcinoles (AR) y alquilpironas (AP) que se propone están relacionados con el control de la fluidez de la membrana (Segura et al., 2014; Romero et al., 2013).

1.5 Síntesis de alginatos en *Azotobacter vinelandii*

Una de las características por las que *A. vinelandii* ha sido objeto de estudios es su capacidad para producir el polímero de interés industrial alginato. Los alginatos son polisacáridos lineales, que se componen de cantidades variables de ácido (1-4)- β -D-manurónico (M) y su epímero, ácido α -L-gulurónico (G). Presentan un amplio rango de aplicación actuando como estabilizadores, agentes espesantes, gelificantes o agentes formadores de película, en diversos campos industriales. Actualmente los alginatos comerciales son extraídos de algas marinas cafés y son utilizados principalmente en la industria alimentaria y farmacéutica (Galindo et al., 2007). Sin embargo, el alginato algal es propenso a la variabilidad de la composición debido a cambios estacionales y ambientales.

Las propiedades físicas de una determinada molécula de alginato, por ejemplo, la resistencia del gel, la capacidad de unión al agua, la viscosidad, están determinadas por la longitud del polímero, la cantidad relativa y distribución de residuos G y el contenido de acetilo, todos los cuales están controlados por enzimas modificadoras de alginato. Por lo tanto, parece probable que estos parámetros puedan controlarse mediante ingeniería genética de productores bacterianos tales como *A. vinelandii* (Ertesvåg, 2015; Remminghorst & Rehm, 2006).

La biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* comienza a partir de la fructosa-6-P, que se isomeriza mediante la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa/guanosina difosfomanosa pirofosforilasa (PMI-GMP o AlgA) para producir manosa-6-P; que a su vez se convierte por la fosfomanomutasa (PMM o AlgC) en manosa-1-P; PMI-GMP (AlgA) cataliza la conversión de manosa-1-P en GDP-manosa. La GDP manosa se oxida por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) a GDP-ácido manurónico. La GDP-manosa deshidrogenasa, codificada por el gen *algD*, es una enzima clave ya que cataliza el paso que compromete la vía hacia la biosíntesis del alginato (Rehm, 2009).

La polimerización de GDP-ácido manurónico se lleva a cabo por la proteína Alg8, una manuronato polimerasa (MP). La molécula polimanurónica resultante se modifica luego por un complejo de acetilasa que comprende proteínas AlgI, AlgV, AlgF y algunos de los restos de manuronato no acetilados se epimerizan en guluronato mediante una epimerasa de manuronato (ME o AlgG) y luego se exporta a través de la membrana externa a través de la proteína de formación de poros AlgJ (Figura 2.) (Galindo et al., 2007).

El polisacárido exportado puede ser epimerizado por siete epimerasas extracelulares dependientes de Ca^{2+} (AlgE1-7) siendo éstas responsables de generar una variedad de patrones de epimerización, incluyendo bloques G de varias longitudes (Galindo et al., 2007). Se propone que AlgK y AlgX, que codifican proteínas periplásmicas, guían y protegen la cadena de alginato contra la degradación de AlgL, una alginato liasa ubicada en el periplasma que controla la longitud y peso molecular del polímero (Remminghorst & Rehm, 2006; Urtuvia et al., 2017).

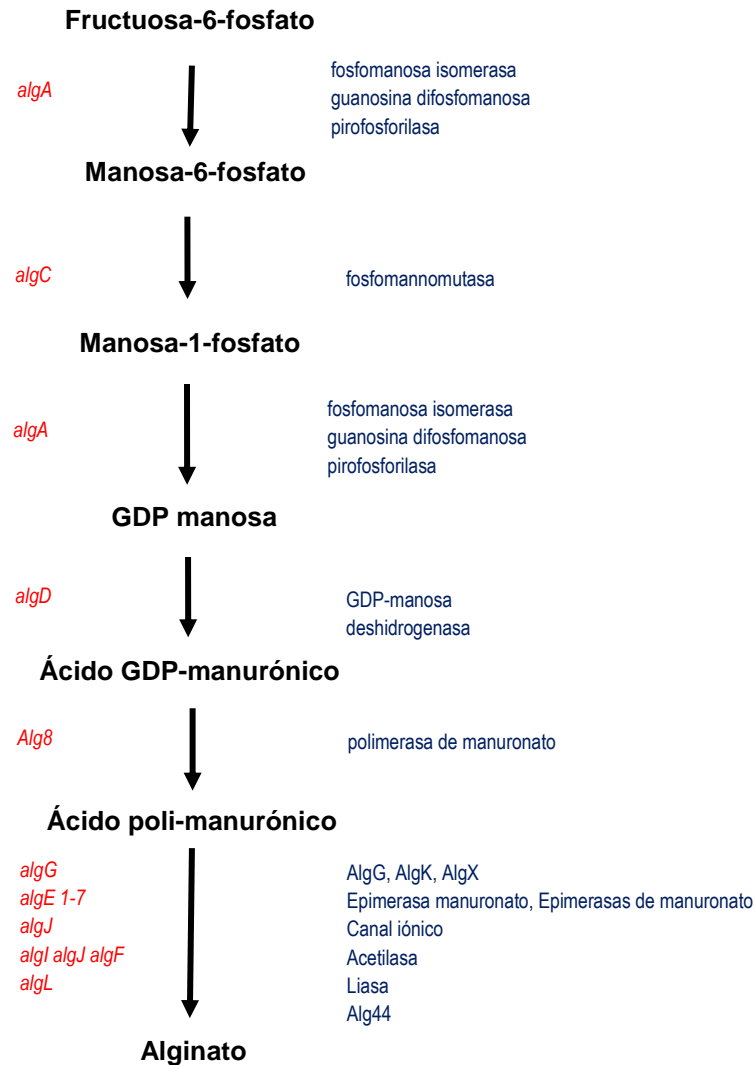


Figura 2. Biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*

1.6 Regulación de la síntesis de alginatos por el sistema GacS/A-RsmZ/Y

En *A. vinelandii* la producción de alginato está bajo el control del sistema de doble componente GacS/GacA. Se ha demostrado que en mutantes *gacS* se reduce significativamente la producción de alginato y se disminuye la transcripción de *algD*, el gen que codifica la enzima clave de la vía biosintética del alginato, durante el crecimiento exponencial y se abate en la fase estacionaria (Castañeda et al., 2000). Adicionalmente, la mutación en *gacA* anula la transcripción de *algD*, y por lo tanto la producción de alginato en *A. vinelandii* (Castañeda et al., 2001).

El sistema GacS/GacA regula la biosíntesis de alginato de forma indirecta mediante el control post-transcripcional del gen de alginato, *algD*, a través del sistema Rsm (figura 3). Al igual que en otras γ -proteobacterias en *A. vinelandii*, GacA actúa como un activador transcripcional y es necesario para la transcripción de los genes que codifican los Rsm-sRNAs (RsmZ1-8 y RsmY) (Eligio et al., 2012; Castañeda et al., 2016).

Se ha demostrado que en *A. vinelandii* la proteína RsmA interactúa con los sRNAs RsmZ1 y RsmZ2, así como con el ARNm de *algD*, a quien regula de manera negativa. Por lo tanto, se concluyó que en la mutante *gacA* la ausencia de los Rsm-sRNAs permite que la proteína RsmA libre se una al ARNm de *algD* inhibiendo su traducción. De hecho, la transcripción de un único ARN del sistema Rsm (RsmZ1) restauró la síntesis de alginato en la mutante *gacA*, indicando claramente el importante papel de los Rsm-sRNAs que actúan como anti-represores de RsmA para permitir la traducción de *algD* y la síntesis de alginato (Manzo et al., 2011)

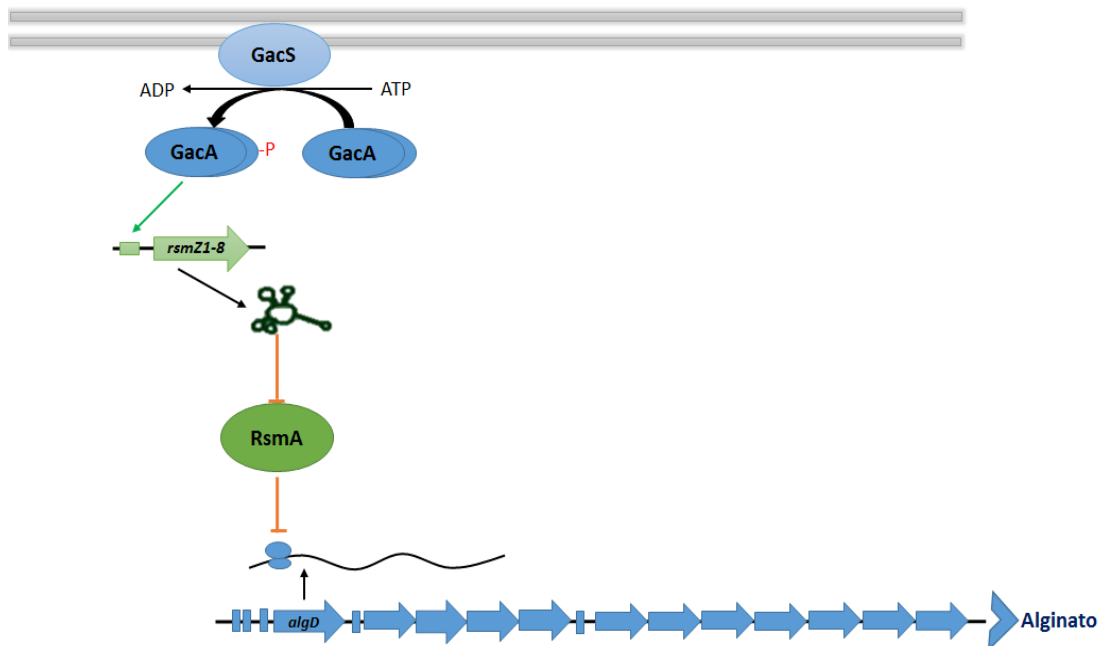


Figura 3. Representación del sistema de regulación GacS/A-RsmZ/Y sobre la síntesis de alginatos (Modificada de Segura et al., 2016).

1.7 Las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS en *Pseudomonas aeruginosa*

El patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* es responsable de una amplia gama de infecciones agudas y crónicas. Las infecciones agudas se caracterizan por la presencia de movilidad y el sistema de secreción tipo III (T3SS), mientras que las infecciones crónicas implican la producción de biopelícula y al sistema de secreción tipo VI (T6SS). La cascada Gac/Rsm en *P. aeruginosa* es de vital importancia para la regulación de la transición entre la infección aguda y crónica (Goodman et al., 2004).

GacS fosforila al RR, GacA. GacA activa la transcripción de los sRNAs, RsmY y RsmZ, que secuestran al regulador traduccional, RsmA. RsmA reprime directamente genes implicados en la progresión de enfermedades crónicas y estimula la expresión de factores de virulencia que promueven infecciones agudas como el sistema de secreción tipo III (T3SS) o el pili tipo 4. Por otra parte, los sRNAs, *rsmY* y *rsmZ*, antagonizan a la proteína RsmA permitiendo la expresión de genes que son necesarios para la formación de biopelículas, como los involucrados en la síntesis de polisacáridos, tales como Pel y Psl (Goodman et al., 2004; Brencic et al., 2009).

Dependiendo de la especie bacteriana, la actividad del sistema Gac/Rsm puede ser modulada por reguladores accesorios. En *P. aeruginosa*, dos cinasas histidínicas híbridas adicionales, LadS (Lost Adherence Sensor) y RetS (Regulator of Exopolysaccharide and Type III Secretion), modulan inversamente la cascada Gac/Rsm. Mientras que LadS estimula la actividad de GacA, teniendo un efecto positivo sobre la transcripción de RsmZ y RsmY, RetS reprime la actividad de GacA y la transcripción de estos sRNAs. La convergencia de estas vías y el control recíproco del mismo conjunto de genes por estas cinasas se ha demostrado a través del análisis de transcriptomas de cepas mutantes *retS* y *ladS* (Goodman et al., 2009; Ventre et al., 2006).

En *P. aeruginosa* RetS modula el estado fosforilación de GacS mediante la interacción directa y específica con esta cinasa. RetS forma heterodímeros con GacS, bloqueando la autofosforilación de GacS y la posterior fosfotransferencia al regulador de respuesta GacA que conduce a la reducción de la expresión de *rsmZ* (Goodman et al., 2009).

Por otra parte, LadS controla la expresión de *rsmY* y *rsmZ* a través del sistema GacS/GacA. A diferencia de RetS, LadS no forma heterodímeros con GacS. Sin embargo, LadS está involucrada en una fosforilación que requiere sus dominios H1 y D1. LadS se autofosforila en su dominio H1, transfiere el grupo fosforilo a su dominio D1, y posteriormente al dominio H2 de GacS. LadS forma así, con GacS/GacA, un sistema de transducción de señales multicomponente (Chambonnier, 2016).

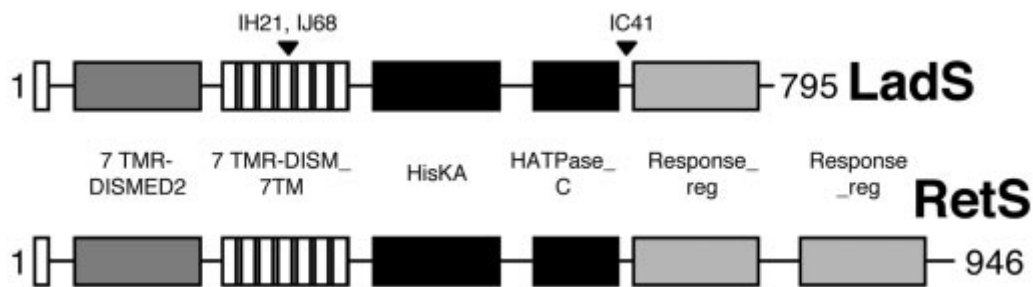


Figura 4: Estructura de las HPKs LadS y RetS (Tomada de Ventre et al., 2006).

Estructuralmente, LadS presenta una organización con un dominio N-terminal 7TMR-DISMED2 (7TM Diverse Intracellular Signalling), seguido de un dominio 7TMR-DISM_7TM (7TM Receptors with Diverse Intracellular Signalling Modules). Posteriormente se encuentra el dominio transmisor (HisKA/HATPase) y finalmente el dominio REC. Curiosamente, esta arquitectura de dominios es compartida por RetS, siendo la cinasa RetS más grande que LadS, esencialmente porque RetS posee un dominio REC adicional en su C-terminal (Fig. 4) (Ventre et al., 2006).

En *P. aeruginosa* LadS modula al TSS3, importante para la virulencia de este patógeno, a través de la vía Gac/Rsm. Se ha demostrado que el calcio se une al dominio DISMED2 periplásmico de LadS, señal que luego se transmite a GacS y GacA. GacA activa la transcripción de RsmY y RsmZ que secuestran a RsmA, estimulando así la expresión de genes que contribuyen al comportamiento crónico (Broder et al., 2016). Por otro lado, la secreción y expresión de los componentes del TSS3 se activan cuando en el medio existe una concentración de calcio bajo y RsmA está disponible, estimulando la expresión de factores de virulencia que promueven las infecciones agudas (Dasgupta et al., 2006). La importancia de la modulación de LadS sobre el TSS3 se observa en la cepa de *P. aeruginosa* PA14, que es una cepa hiper virulenta con una mutación adquirida en el gen *ladS*. Esta mutación tiene un impacto deletéreo sobre la biopelícula, mientras que resulta en un aumento de la actividad del T3SS y un aumento de la citotoxicidad hacia las células de mamíferos. Por lo tanto, la alta virulencia de *P. aeruginosa* PA14 puede ser, al menos en parte, atribuido a un T3SS hiperactivo debido a la ausencia del sensor funcional LadS (Mikkelsen et al., 2011).

2. Antecedentes

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

En un trabajo previo en el laboratorio, buscando en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* se encontró un gen (AVIN 06870) que presenta un 48% de identidad con el gen *retS* de *P. aeruginosa*. Se realizó también la búsqueda del *ladS* homólogo con el gen de *P. aeruginosa* obteniendo resultados negativos. Sin embargo, teniendo como patrón de búsqueda la proteína LadS de *P. aeruginosa* se encontró un homólogo putativo (AVIN 34990) con un 34% de identidad y con todos los dominios característicos de la cinasa (figura 5) (Cruz, 2012).

Es importante mencionar que en la cinasa LadS de *A. vinelandii* el dominio N-terminal 7TMR-DISMED y el dominio 7TMR-DISM_7TM se encuentran conservados, lo que podría indicar que al igual que en *P. aeruginosa*, LadS también podría activarse por calcio. El calcio por tanto, podría estar implicado en la regulación de la producción de alginato.

Cabe mencionar que en el contexto genómico Avin_34990 se encuentra entre dos genes flanqueantes que codifican para una peptidasa osmoprotectora del sistema NAGGIN de la familia M42 y una proteína de la familia YehU. Por su parte el gen *ladS* de *P. aeruginosa* se encuentra entre dos genes que codifican para un probable regulador transcripcional y una fosfometilpirimidina cinasa.

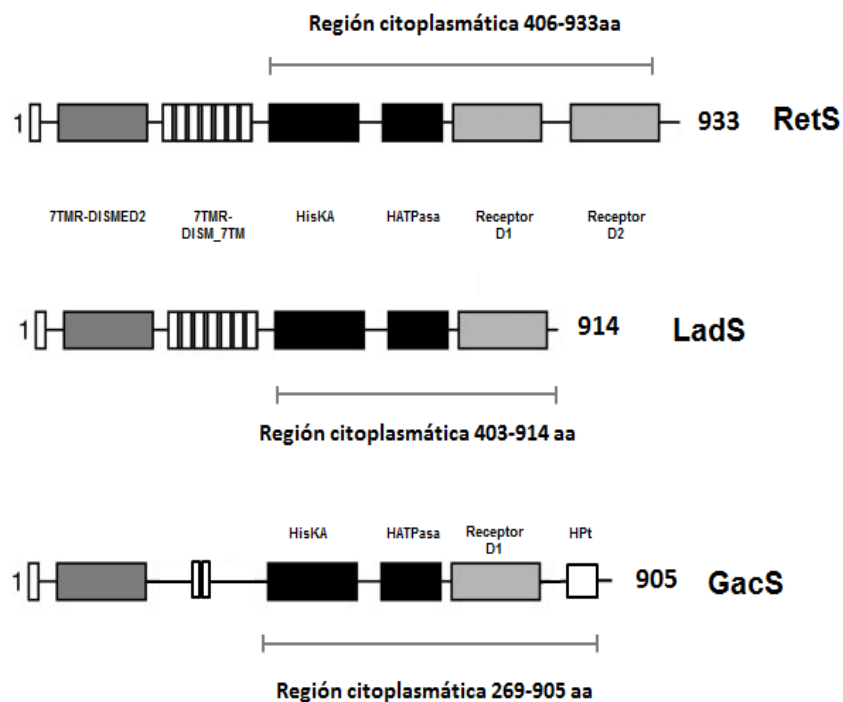


Figura 5. Dominios de las cinasas RetS, LadS y GacS de *Azotobacter vinelandii*.

(Tomada de Cruz, 2012).

2.2 Ensayo de doble híbrido de las cinasas Gacs/RestS y GacS/LadS de *A. vinelandii*

Debido a que en *P. aeruginosa* las cinasas LadS y RetS modulan la actividad del sistema Gac/Rsm, en el laboratorio se realizó un ensayo de doble híbrido cualitativo para establecer las relaciones entre las HKs dentro del sistema de Gac/Rsm en *A. vinelandii*. Utilizando el sistema LexA que evalúa la interacción de proteínas en un fondo de *E. coli*. Este método aprovecha la naturaleza de la proteína represora LexA. Esta proteína consta de dos dominios, uno que reconoce y se une a un sitio operador específico en el ADN y otro que funciona como un dominio de dimerización. El dominio de dimerización LexA puede eliminarse y reemplazarse con otra proteína o fragmento de proteína que de manera putativa interactúan. Debido a que el represor está activo solo como un dímero, la dimerización de las proteínas probadas permitirá que el LexA quimérico se una a su sitio de operador y reprima la transcripción del gen reportero *lacZ*, lo que genera un fenotipo lactosa negativo.

En este trabajo se clonó la región citoplasmática de GacS y RetS y por otra parte la región citoplasmática de GacS y LadS; demostrando que la cinasa RetS interactúa con GacS, como sucede en *P. aeruginosa*. Sin embargo, no se observó tal interacción entre las cinasas LadS y GacS (Sánchez, 2012) (Figura 6).

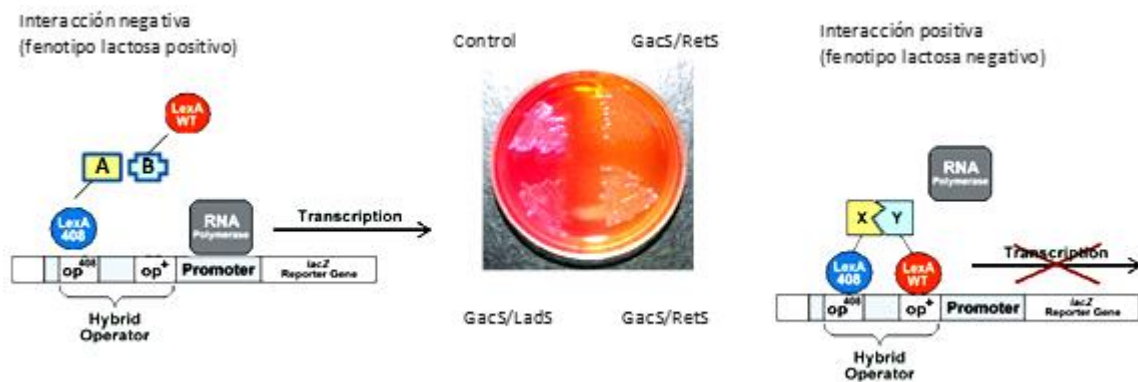


Figura 6. Ensayo de interacción de proteínas de dos híbridos. A) A la izquierda la cepa control que muestra la interacción negativa del sistema. A la derecha la interacción se visualiza por el fenotipo lactosa negativo al reprimirse la expresión del gen reportero *lacZ*. B) A la izquierda se muestra una coloración rosada intensa lo que indica ausencia de interacción (Sánchez, 2012).

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

Para estudiar la regulación ejercida por las cinasas LadS y RetS sobre los Rsm-sRNAs, en el laboratorio se construyeron mutantes *retS* y *ladS*. Como un primer acercamiento se evaluó el efecto en los fenotipos regulados por el sistema Gac/Rsm. Se observó que la mutante *retS* disminuía la producción de alginato, alquilresorcinoles y pioverdinas y la mutante *ladS* la aumentaba, sugiriendo que RetS funciona como un regulador positivo y LadS como un regulador negativo (Reyes, 2018). Estos datos sugieren que en *A. vinelandii* RetS estaría funcionando como LadS y LadS como RetS en comparación con *P. aeruginosa*.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los alginatos se utilizan en diversos campos tales como la industria alimentaria y farmacéutica, debido a que actúan como agentes estabilizadores, espesantes, gelificantes o formadores de película. Por lo que es importante comprender los mecanismos que regulan su producción en fuentes bacterianas como *A. vinelandii*. Este trabajo permitirá un mejor entendimiento de la regulación implicada en la biosíntesis de este polímero.

4. HIPOTESIS

LadS requiere de GacS para regular la síntesis de alginatos y la expresión de los sRNAs de la familia Rsm.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Estudiar el papel del sistema multicomponente GacS-LadS-RetS/GacA en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*.

5.2 Objetivos particulares:

- Construir una doble mutante *gacSladS* en la cepa silvestre E de *A. vinelandii* (AEIV) y sus derivadas que contienen las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA* y *rsmY-gusA*.
- Medir el efecto de la mutación en la producción de alginatos y en la expresión de los genes *rsmZ1* y *rsmY*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

CEPA	Características	Referencia	Cultivo
<i>E. coli</i> DH5 α	SupE44, Δ lacU169, <i>hsdR17</i> , <i>resA1</i> ,	Gibco BRL	Medio Luria Bertani (LB)/37°C
<i>E. coli</i> SU202	<i>lexA71</i> ::Tn 5(Def) <i>sulA211</i> Δ (<i>lacI</i> POZYA) 169/F/ <i>lacIqlacZ</i> Δ M15::Tn9	Daines et al., 2002	Medio Luria Bertani (LB)/37°C Cloranfenicol 20 μ g/mL Kanamicina 30 μ g/mL
<i>E. coli</i> GR SU202	Derivada de la cepa SU202 que porta los plásmidos pSR658 <i>gacS</i> y pSR659 <i>retS</i>	Sánchez, 2012	Medio Luria Bertani (LB)/37°C Kanamicina 30 μ g/mL Ampicilina 100 μ g/mL Tetraciclina 20 μ g/mL
<i>E. coli</i> GL SU202	Derivada de la cepa SU202 que porta los plásmidos pSR658 <i>gacS</i> y pSR659 <i>ladS</i>	Sánchez, 2012	Medio Luria Bertani (LB)/37°C Kanamicina 30 μ g/mL Ampicilina 100 μ g/mL Tetraciclina 20 μ g/mL
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> ⁻ , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , pLysS.	Studier & Moffatt, 1986	Medio Luria Bertani (LB)/37°C Cloranfenicol 20 μ g/mL
<i>E. coli</i> BL21 pET21a+ <i>ladS</i>	Derivada de la cepa BL21 que porta el plásmido pET21a+ <i>ladS</i>	En este trabajo	Medio Luria Bertani (LB)/37°C Cloranfenicol 20 μ g/mL Ampicilina 100 μ g/mL
<i>A. vinelandii</i> AEIV (E)	Cepa silvestre, Nal R	Larsen y Haugh (1971)	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 μ g/mL
AEIV	Derivada de la cepa E que porta la fusión	López, 2018	Medio BS/30°C

<i>rsmZ1-gusA</i>	transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>		Ac. Nalidixico 10 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i>	Derivada de la cepa E que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	López, 2018	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>rsmY-gusA</i>	Derivada de la cepa E que porta la fusión transcripcional <i>rsmZY-gusA</i>	López, 2018	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>ladS::Gm</i>	Cepa derivada de la silvestre, mutante en <i>ladS</i>	Reyes, 2018	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL
AEIV <i>ladS::gm</i> <i>rsmZ1-gusA</i>	Derivada de la cepa <i>EladS::gm</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	García, 2020	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>ladS::gm</i> <i>rsmZ2-gusA</i>	Derivada de la cepa <i>EladS::gm</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	González, 2020	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>ladS::gm</i> <i>rsmY-gusA</i>	Derivada de la cepa <i>EladS::gm</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	González, 2020	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>gacA-</i>	Cepa derivada de la silvestre, deficiente en <i>gacA</i>	Castañeda et al., 2000	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL
AEIV <i>ladS::Gm</i> <i>gacS::Sp</i>	Cepa derivada de la silvestre, doble mutante en <i>ladS</i> y en <i>gacS</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL
AEIV <i>ladS::Gm</i> <i>gacS::Sp</i> <i>rsmZ1-gusA</i>	Cepa derivada de la silvestre, doble mutante en <i>ladS</i> y en <i>gacS</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>ladS::Gm</i> <i>gacS::Sp</i> <i>rsmZ2-gusA</i>	Cepa derivada de la silvestre, doble mutante en <i>ladS</i> y en <i>gacS</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>ladS::Gm</i> <i>gacS::Sp</i> <i>rsmY-gusA</i>	Cepa derivada de la silvestre, doble mutante en <i>ladS</i> y en <i>gacS</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL

			Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>gacS</i>::<i>Sp rsmZ1-gusA</i>	Cepa derivada de la silvestre mutante en <i>gacS</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>gacS</i>::<i>Sp rsmZ2-gusA</i>	Cepa derivada de la silvestre mutante en <i>gacS</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL
AEIV <i>gacS</i>::<i>Sp rsmY-gusA</i>	Cepa derivada de la silvestre mutante en <i>gacS</i> que porta la fusión transcripcional <i>rsmY-gusA</i>	En este trabajo	Medio BS/30°C Ac. Nalidixico 10 µg/mL Gentamicina 1 µg/mL Espectinomicina 100 µg/mL Tetraciclina 20 µg/mL

6.2 Oligonucleótidos

Cebadores	Secuencia	Longitud (Pb)	Tm (°C)
WTS2D	5'- TCC CTG CGC AGC CAC GAA CT -3'	20	56.0
Sm1	5'- GAT CGG GCC TTG ATG TTA CC -3'	20	62.0
ladSZF	5'- GGA TCC ACC CAG GCC AAG AGC -3'	21	60.7
ladS1D	5'- CGG CAG CGC TCG GTA TTC AT -3'	20	60.4
gusA1	5'- TGT AAC GCG CTT TCC CAC CAC -3'	22	60.5
Tc Rv	5'- GCT AGC AGC ACG CCA TAG TGA -3'	22	59.7
ladS-Not1	5'- GTG CGG CCG CGA ATT CAC TAG TGA TGT CGA CTC AAT TGT CTA CCA GCG TCC -3'	51	70.7
WTS2R	5'- GGC GCC GAA TTT CGC CTC G -3'	19	64.0

6.3 Vectores

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación, posee el promotor de transcripción T4, Amp R	Promega
pMC7	Derivado del vector de clonación pBluescript KS (+) que porta un fragmento <i>gacS</i> ,	Castañeda et

	interrumpido con un casete que contiene un gen de resistencia a la espectinomicina.	al., 2000
pET-21 a (+)	Vector para la expresión inducible de proteínas etiquetadas con T7 en el extremo N-terminal e His en el extremo C-terminal, posee el promotor lactosa-inducible T7, Amp R	Novagen
pET-21 a (+) <i>ladS</i>	Vector de expresión con fragmento de <i>ladS</i> que codifica la región citoplasmática de esta cinasa	En este trabajo

6.4 Medios de cultivo

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

Reactivo	Cantidad (g/L)
NaCl	5.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de caseína	10.0
Agar Agua*	15.0
*Adicionar en caso de preparar medio sólido	

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

Reactivo	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	8.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Sacarosa	200.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	7.3
Na ₂ SO ₄	18.3
MgCl ₂ .6H ₂ O	16.0
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.0
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.2
Para medio sólido se adiciona:	
Agar bacteriológico	15.0

*Ajustar a pH 7.2

Para inducir el estado de competencia, las cepas de *A. vinelandii* se cultivaron en medio de competencia CM cuya composición es la siguiente:

Reactivo	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	8.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Sacarosa	200.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	7.3
Na ₂ SO ₄	18.3
MgCl ₂ .6H ₂ O	16.0
Para medio sólido se adiciona:	
Agar bacteriológico	15.0

*Ajustar a pH 7.2

6.5 Metodologías

6.5.1 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 MgSO₄ 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 μ 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.

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

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 μ L de solución TES y pasar a tubos Eppendorf.

4. Agregar 25 μ L de lisozima (10 mg/mL) y mantener 20 min en hielo.

5. Agregar 400 μ L de agua helada e incubar 15 min a 73 °C.

6. Centrifugar 15 min y transferir sobrenadante a tubo nuevo.

7. Agregar 60 μ L de NaClO₄ 5M.

8. Agregar 600 μ L 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 μ L 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.

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

- 1.- Crecer las células en medio Burk Sacarosa con antibiótico de selección durante 2 días a 30°C.
- 2.- Cosechar las células y lavar con MgSO₄ para quitar alginato.
- 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 30 μ L de RNAsa diluida (2 μ L/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.

6.5.4 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

1.- Sembrar en una placa de CM la cepa que se desea transformar, incubar por 48 horas a 30°C (1er pase).

2.- Realizar un segundo pase a placa CM cultivando sobre toda la superficie de la placa (masivo) e incubar por 18-24 horas a 30°C.

3.- Recuperar las células por centrifugación 13 000 rpm/10 min para proceder a transformar.

6.5.4.1 Transformación de *A. vinelandii*

1. Resuspender las células en 2 mL de MgSO₄ 10 mM.
2. Tomar 200 μ L de células competentes y agregar 50 μ L de DNA plasmídico en un tubo Eppendorf.
3. Colocar la mezcla sobre medio CM sólido, extender la solución células-DNA con movimientos suaves. Incubar a 30 °C durante 48 h.
4. Recolectar el tapete, lavar con 1 mL de MgSO₄ 10 mM y resuspender en 200 μ L de esta misma solución.
5. Plaquear en medio BS con antibiótico(s) de selección.
6. Incubar a 30 °C durante 48 h.
7. Seleccionar las colonias transformantes.

6.5.5 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

1. Tomar 1 mL del cultivo problema.
2. Centrifugar células y lavar con MgSO_4 10 mM.
3. Resuspender nuevamente el paquete celular en 1 mL de MgSO_4 10 mM
4. Tomar de 5 a 10 μl de muestra (dependiendo de densidad celular) y llevar a 200 μl con de MgSO_4 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 diluído con un volumen de agua destilada y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
7. Leer absorbancia 625 nm.
8. Simultáneamente realizar una curva de calibración utilizando un estándar de albúmina para calcular los $\mu\text{g prot/mL}$

Albúmina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	H₂O(μl)
2	198 μl
4	196 μl
8	192 μl
16	184 μl
32	168 μl

Solución reactiva (se prepara al momento):

Mezclar 1 mL de solución C + 1 mL de solución B + 98 mL de solución A

Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: Tartrato de Na y K 2%

Solución C: CuSO_4 1%

6.5.6 Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa.

- 1.- Obtener un pre-inóculo de 18-24 h de *A. vinelandii*.
- 2.- Inocular 50 mL BS con 1 mL de pre-inóculo 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 la pastilla en 1 mL de MgSO₄

5.- Tomar 10 µL de muestra y agregar 355 µL de Buffer Z. Preparar al mismo tiempo el blanco que contenga 365 µL de buffer Z y procesarlo junto con las muestras. (Vol tRx)

5.- Agregar 5 µL de lisozima 10mg/mL e incubar tubos 5 min a 37°C en baño María.

6.- Agregar 5 µL de solución de Tritón 10%.

7.- Agregar 50 µL del sustrato de la enzima PNPG (P-nitrofenil- β-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 75 µL de solución de Na₂CO₃ 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-β-D-glucorónido) en 10 mL de agua.

Na₂CO₃: Disolver 12.72 g de Na₂CO₃ 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 ₂ HPO ₄	0.03 M	0.5 M	0.87 g	3 mL
KH ₂ PO ₄	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

6.5.7 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. Colectar 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 1 volumen de isopropanol frío.
8. Recuperar precipitado (alginato), secar y resuspender en un volumen apropiado 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. Colocar 175 µL de la solución problema.
3. 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
------------	---	-----

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

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

6.5.8 Cuantificación de la actividad β -galactosidasa.

- 1.- Obtener un pre-inóculo de 8 h de *E. coli*
- 2.- Inocular un cultivo de LB con el pre-inóculo anterior, incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h.
- 3.- Tomar 1 mL de cultivo o más dependiendo de la densidad celular y centrifugar para obtener el paquete celular.
- 4.- Resuspender la pastilla en 1 mL de MgSO_4
- 5.- Tomar 20 μL de muestra y agregar 710 μL de Buffer Z. Preparar al mismo tiempo el blanco que contenga 730 μL de buffer Z y procesarlo junto con las muestras. (Vol tRx)
- 5.- Agregar 10 μL de lisozima 10 mg/mL e incubar tubos 5 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ en baño María.
- 6.- Agregar 10 μL de solución de Tritón 10%.
- 7.- Agregar 100 μL del sustrato de la enzima ONPG (ortho-nitrofenil- β -galactósido), transferir los tubos inmediatamente a un baño de agua a 28 $^{\circ}\text{C}$ y cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
- 8.- Agregar 150 μL de solución de Na_2CO_3 para detener la reacción.
- 9.- Leer la absorbancia a 420 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.

$$U \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{DOact (420) (1000)}}{(0.0045) (t \text{ Rx min}) (\text{Vol Rx}) (\text{ug prot/mL})}$$

Lisozima: Disolver 10 mg de lisozima en 1 mL de agua destilada (10 mg/mL)

ONPG: Disolver 45 mg de ONPG (ortho-nitrofenil- β -galactósido) en 10 mL de agua.

Na₂CO₃: Disolver 12.72 g de Na₂CO₃ en 100 mL de agua destilada.

Tritón 100X: Solución 10% v/v de tritón en agua destilada estéril.

Buffer Z		Stock	mL Stock/ 50 mL
Na ₂ HPO ₄	0.06 M	0.5 M	6 mL
NaH ₂ PO ₄	0.04 M	0.5 M	4 mL
KCl	0.01 M	1.0 M	0.5 mL
MgSO ₄	0.001 M	1.0 M	50 μ L
β -mercaptoetanol	0.05 M	14.3 M	175 μ L

6.5.9 Expresión de la región citoplasmática de LadS

- 1.- Obtener un pre-inóculo de 12 h de *E. coli* BL21
- 2.- Inocular un cultivo de LB más los antibióticos de selección (Amp/Cm) con el pre-inóculo anterior, incubar a 37°C hasta una D.O.=0.5-0.7 (2 horas aproximadamente)
- 3.- Inducir la expresión adicionando IPTG a una concentración final de 0.75 mM. Antes de la inducción, tomar 1 mL de cultivo (t=0)
- 4.- Incubar el cultivo a 37°C con agitación durante 4 horas
- 5.- Cosechar las células por centrifugación y eliminar el sobrenadante
- 6.- Lavar las células con 1 mL de MgSO₄
- 7.- Almacenar a -20 °C hasta que las muestras estén listas para procesar

6.5.10 Obtención del extracto soluble

- 1.- Descongelar las células obtenidas de la inducción
- 2.- Resuspender en 1 mL de buffer nativo de unión
- 3.- Sonicar las células con 6 o 7 pulsos de 10 segundos cada uno con una amplitud de 80
- 4.- Centrifugar el lisado a 13 000 rpm durante 15 minutos
- 5.- Separar la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (precipitado)
- 7.- Almacenar a 4°C hasta que las muestras estén listas para procesar

6.5.11 Cromatografía de afinidad IMAC Ni-NTA

- 1.- Tomar 1 mL de resina Ni-NTA y colocarlo en un tubo cónico de 15 mL
- 2.- Centrifugar 6 000 rpm, 1.5 minutos y eliminar el sobrenadante
- 3.- Resuspender en 1 mL buffer de unión, centrifugar 6 000 rpm, 1.5 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir una vez más
- 5.- Agregar 4 mL del extracto soluble a la resina previamente equilibrada, dejar en agitación durante una hora a 4 °C.
6. Colocar la resina con el extracto soluble en la columna de purificación y recuperar la fracción no pegada en un tubo cónico de 15 mL
7. Realizar 2 lavados con 4 mL de buffer de lavado, recolectar cada lavado en un tubo cónico de 15 mL
- 8.- Finalmente, adicionar 2 mL de buffer de elución y recuperar 4 fracciones en microtubos de 1.5 mL
- 9.- Almacenar las muestras a 4°C hasta que se corra la electroforesis, PAGE-SDS

Buffer de unión pH 8

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Buffer de lavado pH 8

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

Buffer de elución pH 8

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

300 mM Imidazol

6.5.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes PAGE-SDS

- 1.- Tomar 25 µL de cada una de las fracciones obtenidas de la purificación y del extracto soluble e insoluble, adicionar 25 µL de buffer reductor
- 2.- Hervir las muestras a 95 °C durante 5 minutos
- 3.- Cargar 10 µL de cada muestra en el gel de poliacrilamida
- 4.- Correr la electroforesis a 70 volts en el gel de concentrado y el gel de corrida a 100 volts.
- 5.- Retirar el gel de la cámara y proseguir con la tinción con azul de Coomassie

Buffer reductor	
Agua desionizada	3.55 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL

Glicerol	2.5 mL
SDS 10%	2.0 mL
Azul de bromofenol 0.5%	0.2 mL
Volumen total	9.5 mL

*Al momento de usar agregue 50 μ L de β -mercaptoetanol a 950 μ L de buffer reductor.

Gel de corrimiento

Reactivo	10 mL al 10%
Agua destilada	2.74 mL
Tris/HCl 1.5 M pH 8.8	3.76 mL
Acrilamida 29%/bis 1%	3.3 mL
SDS 10%	100 μ L
Persulfato de amonio 10%	100 μ L
TEMED	10 μ L

Gel de concentrado

Reactivo	
Agua destilada estéril	3.68 mL
Tris/HCl 0.5 M pH 6.8	625 μ L
Acrilamida 29%/bis 1%	584 μ L
SDS 10%	50 μ L
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L

Buffer de corrimiento

Reactivo	Concentración/L
Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

El SDS se agrega al final y se agita suavemente. Guardar el buffer a 4 °C.

6.5.13 Tinción con azul de Coomassie

- 1.- Colocar el gel de poliacrilamida en la solución de azul de Coomassie en agitación durante una hora
- 2.- Eliminar el exceso de colorante con la solución de desteñido en agitación durante 30 minutos

2.- Una vez transcurrido el tiempo cambiar la solución de desteñido y dejar en agitación hasta la visualización de las bandas (si es necesario se deja durante toda la noche)

3.- Retirar la solución de desteñido y conservar el gel en agua destilada

Solución de teñido: azul de Coomassie 0.05%, ácido acético 10% y metanol 50%

Solución de desteñido: ácido acético 10%, metanol 50%

6.4.14 Amplificación de genes por PCR

Reactivo	Volumen
Buffer 10X	5 μ L
Nucleótidos 1.25 mM	8 μ l
Primer Fw	1 μ l
Primer Rv	1 μ l
Taq ADN polimerasa	0.2 μ L
DNA 1:5	1 μ l
H ₂ O	33.8 μ L
Volumen final	50 μ L

7. RESULTADOS

7.1 Construcción de la doble mutante *gacS**ladS* de *A. vinelandii* cepa E (AEIV)

Para poder determinar la relación funcional entre GacS y LadS se generó una doble mutante en los genes que codifican para estas cinasas. La mutante doble se generó por doble recombinación homóloga utilizando el vector mutagénico pMC7 (*gacS*::Sp) (Castañeda et. al, 2000) el cual se usó para transformar células competentes de la mutante E/*ladS*::Gm, la cual presenta un fenotipo de producción de alginato aumentada (figura 7).

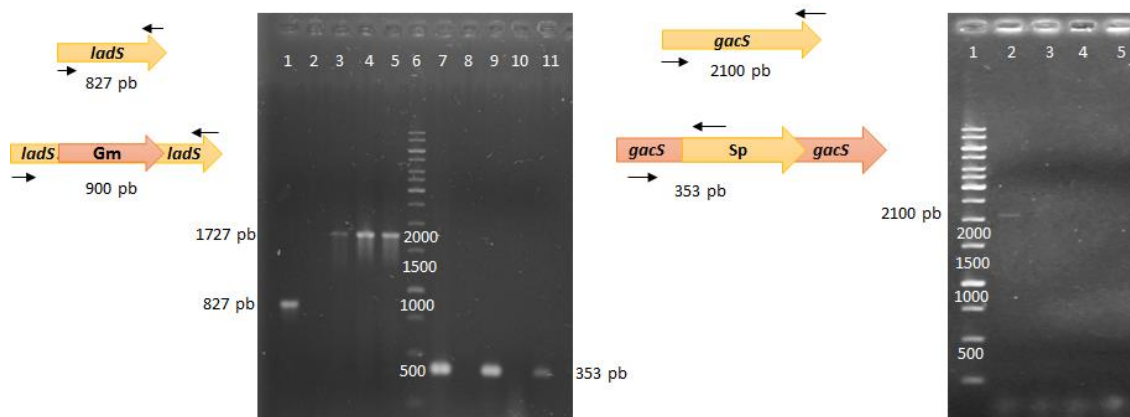


Figura 8. Corrimiento electroforético de los productos de las amplificaciones para la verificación de la doble mutante E *ladSgacS*. A) Carril 1: amplificación de *ladS*, cepa silvestre (827 pb). Carriles 3, 4 y 5: amplificación de *ladS* de la cepa mutante (727 pb) Carril 6: marcador de peso molecular, 1 Kb. Carril 7: control positivo de amplificación (353 pb). Carril 8: control negativo. Carril 9, 10 y 11: amplificación de *gacS* de las cepas recombinantes (353 pb). **B)** Carril 1: marcador de peso molecular, 1 Kb. Carril 2: amplificación de *gacS*, cepa silvestre (2100 pb). Carril 3, 4 y 5: no se observa amplificación del gen silvestre en las recombinantes.

7.2 Efecto de la mutación doble *gacS ladS* en la producción de alginatos

Una vez comprobadas las mutaciones en *ladS* y *gacS* se procedió a determinar su efecto sobre la producción de alginato mediante la cuantificación de la producción del polímero en medio líquido. En la cepa E *ladS*::Gm se observa un aumento en la producción de alginato con respecto a la cepa de tipo silvestre, resultado que confirma los datos obtenidos anteriormente por Reyes en 2018. En la mutante doble se encontró una disminución en la síntesis de alginato con respecto a la cepa silvestre y a la mutante sencilla E *ladS*::Gm (Figura 9). Interesantemente el fenotipo observado en la mutante E *gacS*/*ladS* es muy similar al observado en la mutante sencilla *gacS*.

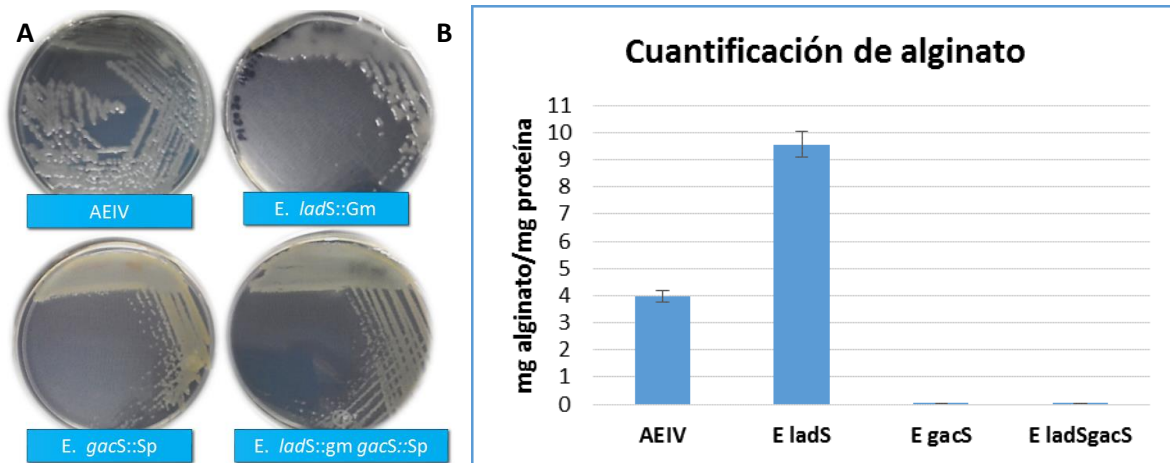


Figura 9. A) Fenotipo mucoide en diferentes cepas de *Azotobacter vinelandii*. AEIV: cepa silvestre de *A. vinelandii*, E *ladS*::Gm: mutante en *ladS*, E *gacS*::Sp: mutante en *gacS*, E *ladS*::Gm *gacS*::Sp: mutante doble en *gacS ladS*. **B)** Cuantificación de alginato de las cepas AEIV, E *ladS*, E *gacS* y E *gacS ladS*

La disminución de la síntesis de alginato observada en la mutante E *ladS*::Gm *gacS*::Sp nos sugiere que LadS requiere de la presencia de GacS para llevar a cabo su función, esta observación nos llevó a plantearnos la idea de la existencia de una probable interacción entre las cinasas LadS y GacS. Sin embargo, el ensayo de doble híbrido cualitativo previamente realizado en el laboratorio indica que no ocurre tal interacción (Sánchez, 2012).

7.3 Ensayo de doble híbrido cuantitativo de las cinasas Gacs/RetS y GacS/LadS de *A. vinelandii*

Con el objetivo de descartar una interacción mínima posible entre GacS y LadS se llevó a cabo el ensayo de doble híbrido cuantitativo de las cepas generadas en el trabajo de Sánchez (2012) para determinando la actividad β -galactosidasa del reportero del sistema.

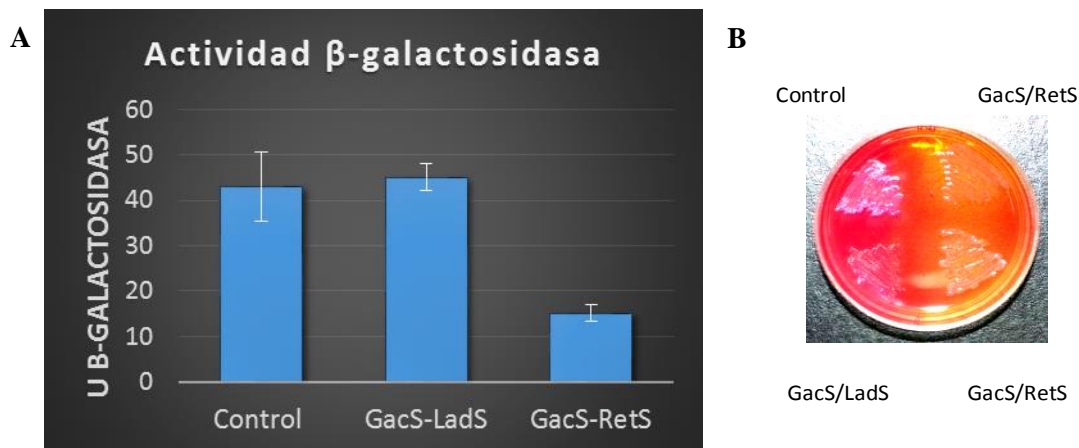


Figura 10. A) Cuantificación de la actividad β -galactosidasa del reportero del sistema de doble híbrido LexA usado para establecer la interacción entre GacS, LadS y RetS. **B)** Fenotipo observado respecto a la fermentación de lactosa asociado a la interacción en el sistema. Control: fenotipo lactosa positivo, sin interacción en el sistema. GacS/RetS: fenotipo lactosa negativo, interacción entre estas cinasas. GacS/LadS: fenotipo lactosa positivo, sin interacción de estas cinasas.

Como se observa en la figura 10, no hay interacción entre GacS y LadS ya que la actividad es semejante al de la cepa control. Por otra parte, la interacción entre GacS y RetS provoca la disminución de la actividad β -galactosidasa comparada con el control. Los resultados obtenidos de la cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa concuerdan con el fenotipo observado respecto a la fermentación de lactosa para cada cepa, confirmando que el sistema no detecta interacción entre las cinasas GacS y LadS.

En *P. aeruginosa* se han realizado de igual forma ensayos para determinar la existencia de interacción entre las LadS y GacS, demostrando que estas cinasas no forman heterodímeros entre sí (Chambonnier *et al.* 2016).

7.4 Construcción de las mutantes dobles *gacS*/*ladS* en las cepas E de *A. vinelandii* que portan las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA*

Para determinar el efecto de la doble mutación en la expresión de los genes *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY* se generaron las dobles mutantes *gacS/ladS* en cepas que portan las fusiones *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA*.

La doble mutación *gacS/ladS* se generó por el método de lisis celular en células competentes de las cepas E *ladS::gm* de *A. vinelandii* que portan las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA* previamente construidas en el laboratorio (García, 2020).

La mutación en *gacS* se verificó mediante la amplificación del locus interrumpido por el casete de resistencia a estreptomicina, usando el oligonucleótido delantero WTS2D que se ubica río arriba de la inserción del casete y el reverso Sm1 que hibrida en el gen de resistencia. Como control positivo de amplificación se utilizó el vector pMC7 y como control negativo, DNA genómico de la cepa E para la cual no se observa amplificación. Por otra parte, se verificó por PCR la presencia de las fusiones transcripcionales con el oligonucleótido Tc-Rv que hibrida en el casete de resistencia a tetraciclina y *gusA1* que empalma con el gen reportero *gusA*. Como control positivo de amplificación se utilizó el vector pUMA Tc *gusA* T (Figura 11 A). Paralelamente, se verificó por PCR la presencia de la mutación en el gen *ladS* utilizando los oligonucleótidos *ladSZF* y *ladS1D* (figura 11 B).

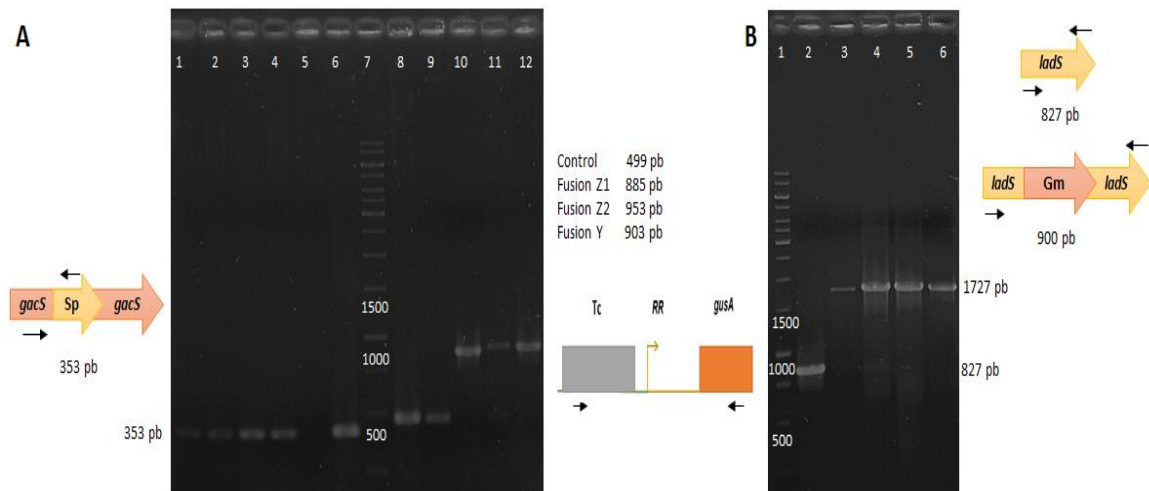


Figura 11. Corrimiento electroforético de los productos de las amplificaciones para la verificación de la doble mutación *ladS gacS* en las cepas AEIV *ladS::gm* con las fusiones *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA*. A) Carril 1, 2, 3 y 4: amplificación de *gacS* en las cepas recombinantes (353 pb). Carril 5: Control negativo de amplificación. Carril 6: control positivo de amplificación de *gacS* (353 pb). Carril 7: marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 8: control positivo de amplificación para las fusiones transcripcionales (499 pb). Carril 9, 10, 11 y 12: cepa control (sin región reguladora, 499 pb), *rsmZ1* (885 pb), *rsmZ2* (953 pb), *rsmY* (903 pb). B) Carril 1: marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 2: amplificación de *ladS*, cepa silvestre (827 pb). Carril 3, 4, 5 y 6: amplificación de *ladS* de la cepa mutante (1727 pb).

7.5 Construcción de las mutantes *gacS* en las cepas E de *Azotobacter vinelandii* que portan las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA*

Para poder comparar el efecto de la doble mutación sobre la expresión de los *rsmS*-sRNAs con respecto al producido por la mutación sencilla en *gacS*, se generó esta mutación en las cepas E de *A. vinelandii* que portan las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA* previamente construidas en el laboratorio usando el vector pUMA Tc gusA T el cual se replica en *A. vinelandii* (figura 12) (López, 2018).

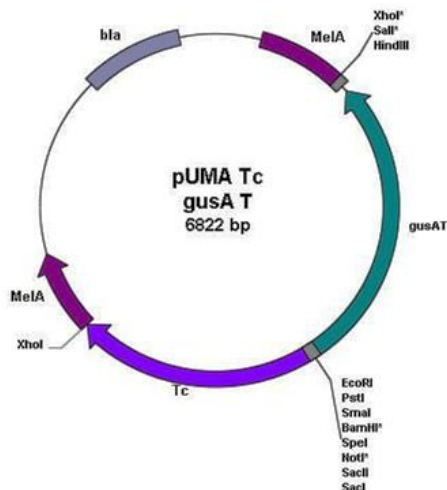


Figura 12. Plásmido con las fusiones transcripcionales y el gen reportero *gusA* (β -glucoronidasa) (López, 2018).

La mutación en *gacS* se verificó mediante la amplificación del locus interrumpido por el casete de resistencia a estreptomicina, usando el oligonucleótido delantero WTS2D que se ubica río arriba de la inserción del casete y el reverso Sm1 que hibrida en el gen de resistencia. Como control positivo de amplificación se utilizó el vector pMC7 y como control negativo, DNA genómico de la cepa E para la cual no se observa amplificación. Por otra parte, se verificó por PCR la presencia de las fusiones transcripcionales con el oligonucleótido Tc-Rv que hibrida en el casete de resistencia a tetraciclina y *gusA1* que empalma con el gen reportero *gusA*. Como control positivo de amplificación se utilizó el vector pUMA Tc *gusA* T (Figura 13 A).

Además, para descartar la presencia de alelos silvestres se realizó una PCR utilizando el par de oligonucleótidos WTSD y WTS2R que amplifican el gen *gacS*; verificando así la ausencia de alelos silvestres del gen en las recombinantes para todas las cepas generadas (figura 13 B).

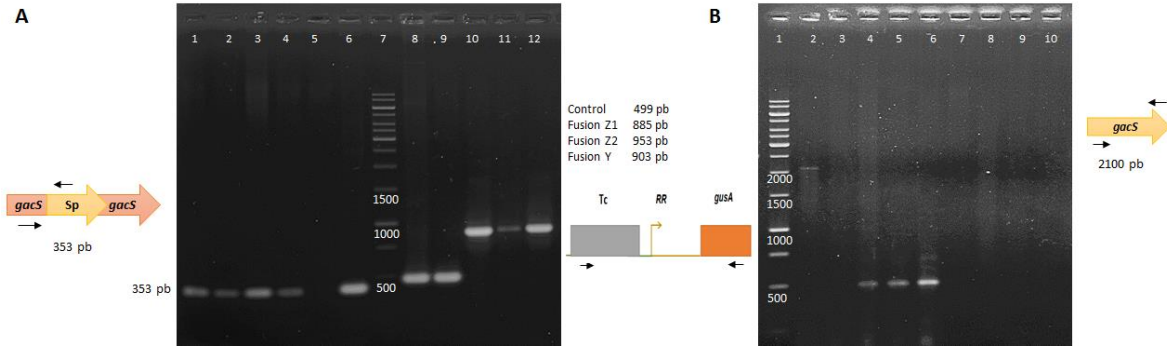


Figura 13. A) Corrimiento electroforético de los productos de las amplificaciones para la verificación de la mutación *gacS* en las cepas AEIV con las fusiones *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA*. Carril 1, 2, 3 y 4: amplificación de *gacS* en las cepas recombinantes (353 pb). Carril 5: control negativo de amplificación. Carril 6: control positivo de amplificación (353 pb). Carril 7: marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 8: control positivo de la amplificación para las fusiones transcripcionales (499 pb). Carril 9, 10, 11 y 12: cepa control (sin región reguladora, 499 pb), *rsmZ1* (885 pb), *rsmZ2* (953 pb), *rsmY* (903 pb). B) Primer carril: marcador de peso molecular. Segundo carril: amplificación de *gacS* en la cepa silvestre (2100 pb). Carril 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: amplificación del gen silvestre en las recombinantes.

7.6 Efecto de la mutación sencilla *gacS* y la doble mutación *gacS*/*ladS* sobre la expresión de los *rsms*-sRNAs

Posteriormente a la comprobación de las mutaciones y para determinar el efecto de la doble mutación *gacS*/*ladS* sobre la expresión de los genes *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY*, se procedió a medir la actividad β -glucuronidasa, enzima codificada por el gen *gusA* que es el reportero de las fusiones transcripcionales (figura 14).

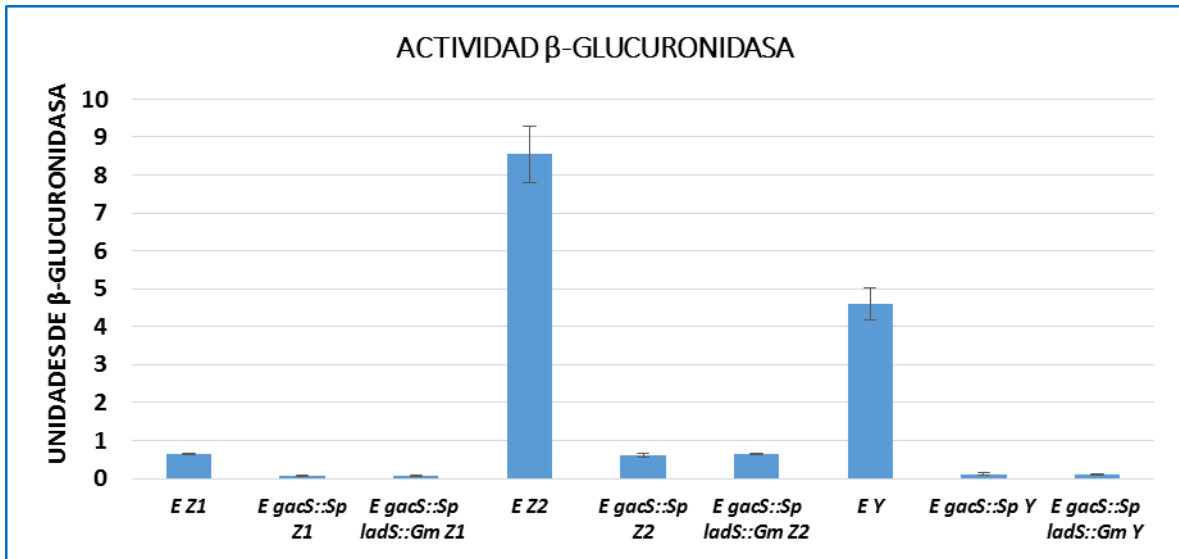


Figura 14. Efecto de la doble mutación *gacS ladS* en la actividad de gen reportero *gusA* de las fusiones transcripcionales *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY*.

El gráfico muestra cómo la actividad de las fusiones transcripcionales de los *rsm*-sRNAs cuantificados disminuye considerablemente tanto en la mutante *gacS* como en la mutante doble *gacS ladS* en comparación con la expresión observada en la cepa de tipo silvestre. Estos resultados confirman la jerarquía de GacS con respecto a LadS en la cascada de regulación, apuntando también a que el efecto de regulación de LadS es a través de GacS. Como nos planteamos anteriormente LadS estaría entonces relacionada funcionalmente con GacS.

Hasta ahora solo se había evaluado el efecto de la mutación *ladS* sobre la producción de alginato, concluyendo que LadS actúa como un regulador negativo en el sistema (Reyes, 2018); sin embargo, no se había comprobado que la regulación que ejerce esta cinasa es a través de la vía Gac-Rsm. Por lo que, en un trabajo en paralelo en el laboratorio realizado por García (2020) se cuantificó la actividad β-glucuronidasa de las fusiones transcripcionales *rsmZ1-7* y *rsmY* en el fondo genético con la mutación en el gen *ladS* (figura 15).

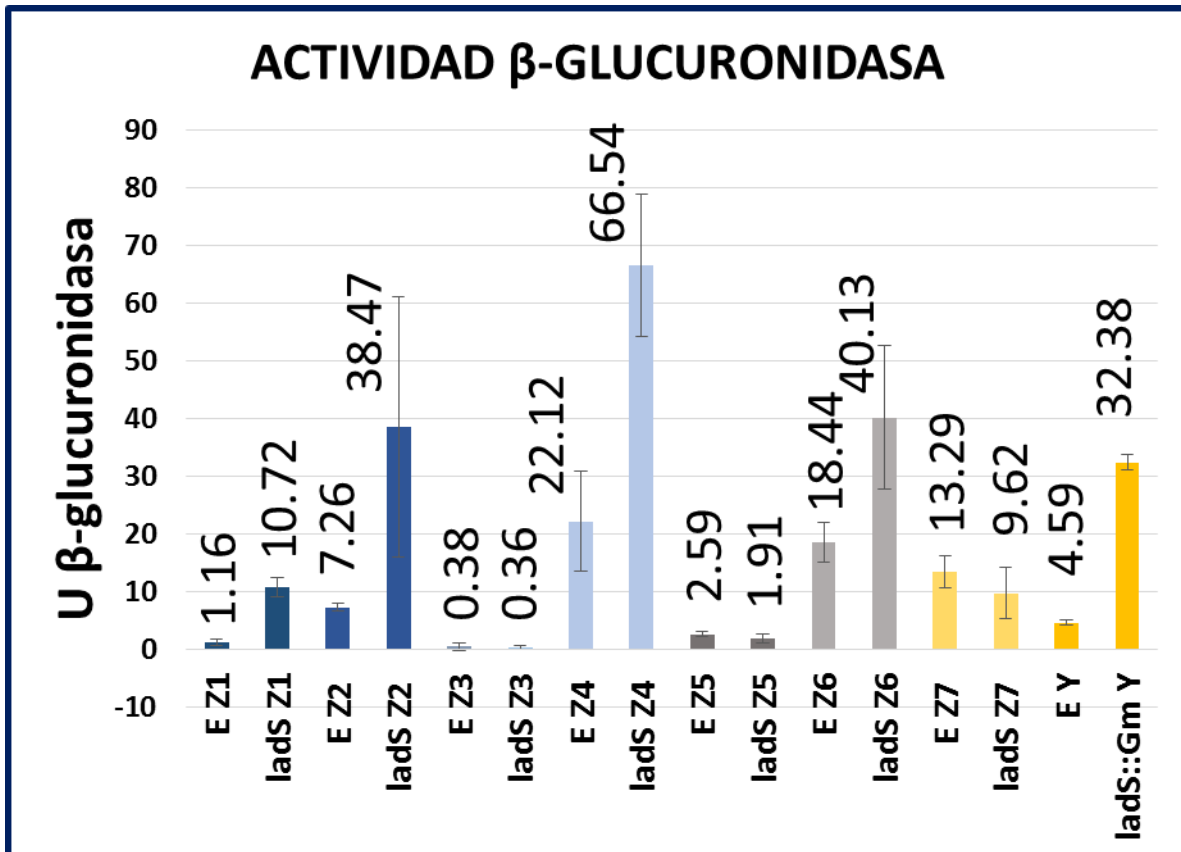


Figura 15. Efecto de la mutación *ladS* en la actividad de gen reportero *gusA* de las fusiones transcripcionales *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ3*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6*, *rsmZ7* y *rsmY*.

Como podemos observar en la gráfica, existe para la mayoría de los *rsm*-sRNAs un aumento en su expresión en la cepa mutante E *ladS::Gm* en comparación con la cepa de tipo silvestre. Además, RsmZ1 y RsmZ2, que ya se ha visto están involucrados en la producción de alginato se sobre expresan en la cepa mutante E *ladS::Gm*. Como se esperaba estos resultados coinciden con el aumento en la producción de alginato observado anteriormente en la mutante *ladS*, ya que al retirar el regulador negativo del sistema se observaría un aumento de la expresión de los *rsm*-sRNAs. El resultado obtenido, también nos estaría indicando que la regulación sobre la expresión de los *rsm*-sRNAs que ejerce LadS es a través de la vía Gac-Rsm, concordando con lo reportado en el modelo de *P. aeruginosa* donde se ha demostrado que el efecto positivo que ejerce LadS sobre la expresión de *rsmZ* y *rsmY* depende de la participación de GacS (Chambonnier et al., 2016).

En conjunto, los resultados indican que LadS regula la síntesis de alginato a través la vía Gac-Rsm y que esta regulación requiere la presencia de la cinasa GacS; sin embargo, con estos resultados una de las hipótesis sería que existe interacción directa entre GacS y LadS; sin embargo, en el ensayo de doble híbrido tanto cualitativo como cuantitativo no fue posible detectar dicha interacción.

7.7 Construcción del vector de expresión pET21a+ladS

Como una alternativa para poder determinar si LadS interactúa con GacS, decidimos llevar a cabo un ensayo tipo *pull down*. Con este enfoque, realizamos una PCR con el par de oligonucleóticos ladS-Not1/ladSZF que amplifican la región citoplasmática de LadS, después se clonó este amplicón en el vector de mantenimiento pGEMT-Easy (figura 16).

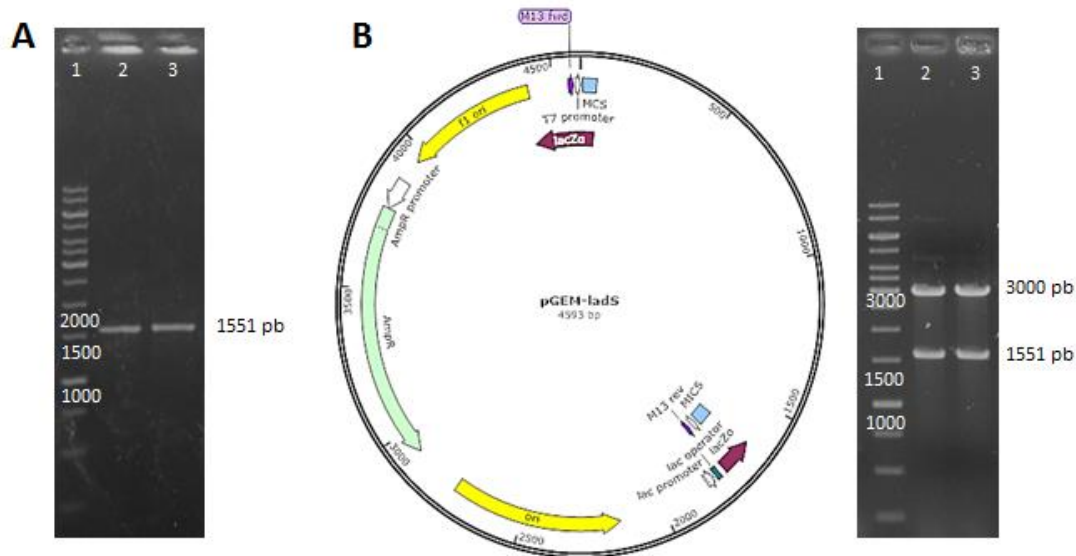


Figura 16. Clonación de la región citoplasmática de LadS en el vector de mantenimiento pGEMT-Easy. A) Carril 1: marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 2 y 3: corrimiento electroforético del producto de amplificación de la región citoplasmática de LadS (1551 pb). **B)** Carril 1: marcador de peso molecular, 1 KB. Carril 2 y 3: corrimiento electroforético de la digestión del vector pGEM *ladS* con las enzimas *NotI* y *BamHI* que liberan el fragmento de *ladS* (1551 pb) y el vector pGEM (3000 pb).

Posteriormente el fragmento *ladS* se escindió con las enzimas *NotI* y *BamHI* para finalmente subclonarlo en el plásmido de expresión pET21a+, generando así el plásmido pET21a+ *ladS*. La verificación de la construcción de este vector se realizó por patrón de restricción. Se observa en la figura 17 el corrimiento electroforético de las digestiones con *BamHI*, que lineariza el vector; utilizando las enzimas *BamHI* y *NotI*, que libera a *ladS* y al vector pET21a+; finalmente la digestión de *ladS* con *PstI*, que genera los fragmentos con un peso de 4791 pb, 1533pb y 654 pb.

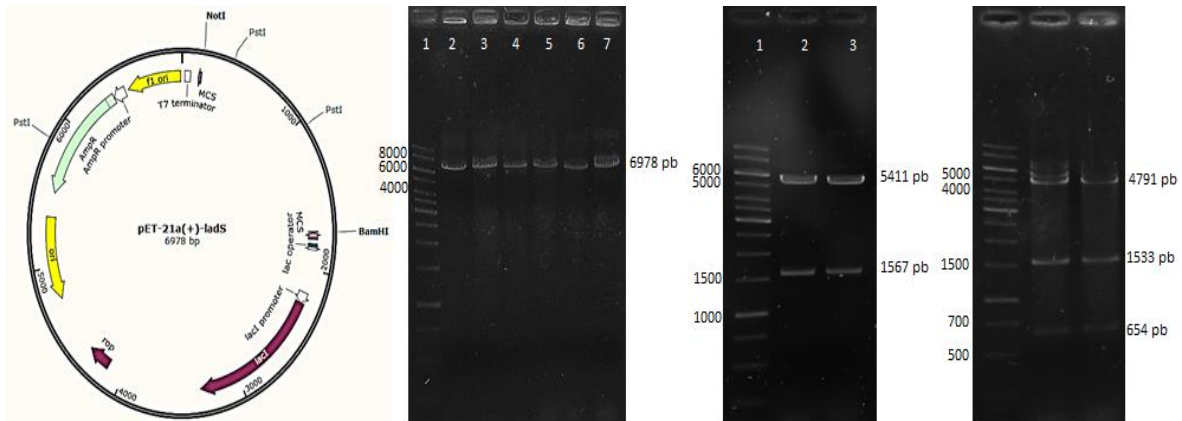


Figura 17. Verificación por patrón de restricción de la construcción pET21a+ *ladS*. **Primer gel (de izquierda a derecha).** Carril 1: Marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 2, 3, 4, 5, 6 y 7: linearización del vector pET21a+ *ladS* con *BamHI* (6978 pb). **Segundo gel.** Carril 1: Marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 3: patrón de restricción con *BamHI* y *NotI* del vector pET21a+ *ladS* que libera a *ladS* (1567 pb) y al vector pET21a+ (5411 pb). **Tercer gel.** Carril 1: Marcador de peso molecular, 1 kb. Carril 2 y 3: patrón de restricción con *PstI* del vector pET21a+ *ladS* que genera fragmentos de 4791 pb, 1533pb y 654 pb.

7.8 Transferencia del plásmido pET21a+ *ladS* a la cepa de *E. coli* BL21

La transformación del vector pET21a+ *ladS* se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* DH5 α y ya que el vector pET21a+ se utiliza para la expresión de proteínas fue necesario realizar la transformación de la cepa de *E. coli* BL21 pLysS con esta construcción. El vector pET21a+ posee una resistencia particular ampicilina, el promotor inducible por lactosa *lacI* y tiene disponible una secuencia His-Tag C-terminal.

La figura 18 muestra los corrimientos electroforéticos de la digestión con *Bam*HI, que lineariza el vector pET21a+ *lad*S y del patrón de restricción del vector que genera en el vector pLysS; también se observa el patrón de restricción del vector pET21a+ *lad*S con *Pst*I, mientras que el plásmido pLysS no posee sitios de corte para esta enzima.

7.9 Evaluación de las condiciones para la expresión de LadS

Una vez comprobada la construcción pET21a+ *lad*S en la cepa *E. coli* BL21, evaluamos su expresión. Dado que el vector recombinante donde se clonó la región citoplasmática de LadS está regulado por el promotor *lac*I, inducible por lactosa, es importante conocer la concentración de IPTG y el tiempo necesario para obtener las mejores condiciones de expresión. Con este fin, comenzamos realizando un ensayo utilizando una concentración de 1mM de IPTG y tomando muestras a diferentes tiempos después de la inducción.

En la figura 19 se presenta el corrimiento electroforético tanto de la fracción soluble como insoluble de los lisados celulares a diferentes tiempos después de la inducción con IPTG 1 mM. Se ha calculado que el peso de LadS incluyendo la etiqueta de 6 histidinas, que nos servirá para la purificación, es de alrededor de 62 kDa. Como se señala en la figura 19, se observa una mayor expresión de proteína a un tiempo de 4 horas después de la inducción con IPTG en ambas fracciones, soluble e insoluble.

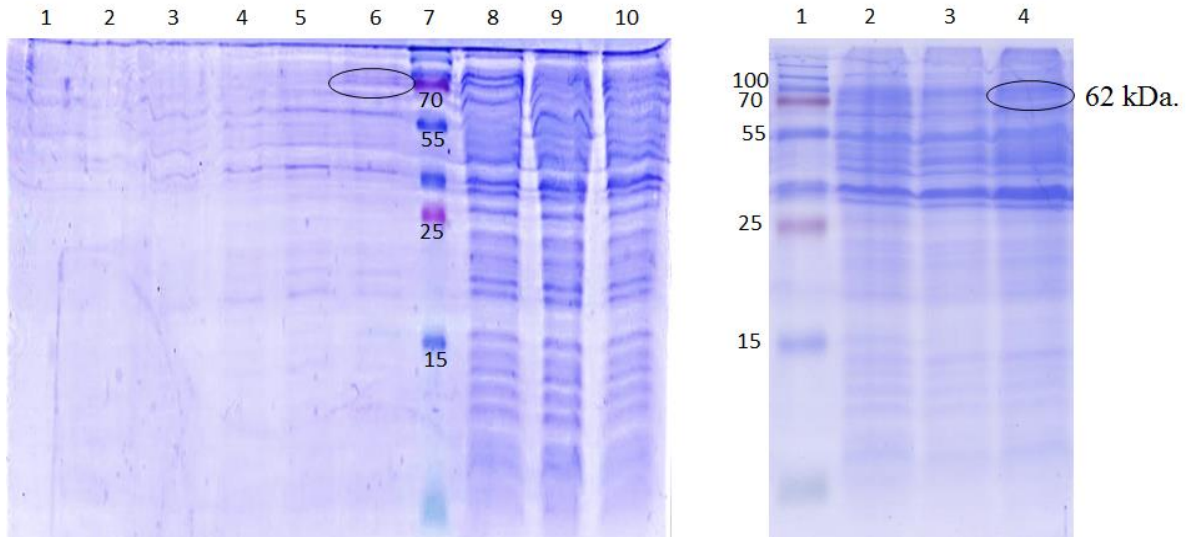


Figura 19. PAGE-SDS de la expresión de LadS a diferentes tiempos después de la inducción con IPTG 1 mM. Izquierda. Carril 1: fracción soluble, tiempo 0. Carril 2, 3 4 5, y 6: fracción soluble después de 30 minutos, 1, 2, 3 y 4 horas de inducción respectivamente. Carril 7: marcador de peso molecular, 250 kDa. Carril 8: fracción insoluble, tiempo 0. Carril 9 y 10: fracción insoluble después de 30 minutos y 1 hora de inducción. **Derecha.** Carril 1: marcador de peso molecular, 250 kDa. Carril 2, 3 y 4: fracción insoluble después de 2, 3 y 4 horas de inducción respectivamente.

Una vez establecido el tiempo de expresión, se determinó la concentración de IPTG óptima para la expresión de la proteína. En la figura 20 se presentan el corrimiento electroforético tanto de la fracción soluble como insoluble de los lisados celulares a distintas concentraciones del inductor después de 4 horas de inducción. En la figura se observa que a concentraciones de 0.5, 0.75 y 1 mM de IPTG se obtiene una expresión de LadS similar, por lo que se determinó inducir las células utilizando 0.75 mM de IPTG para ensayos posteriores.

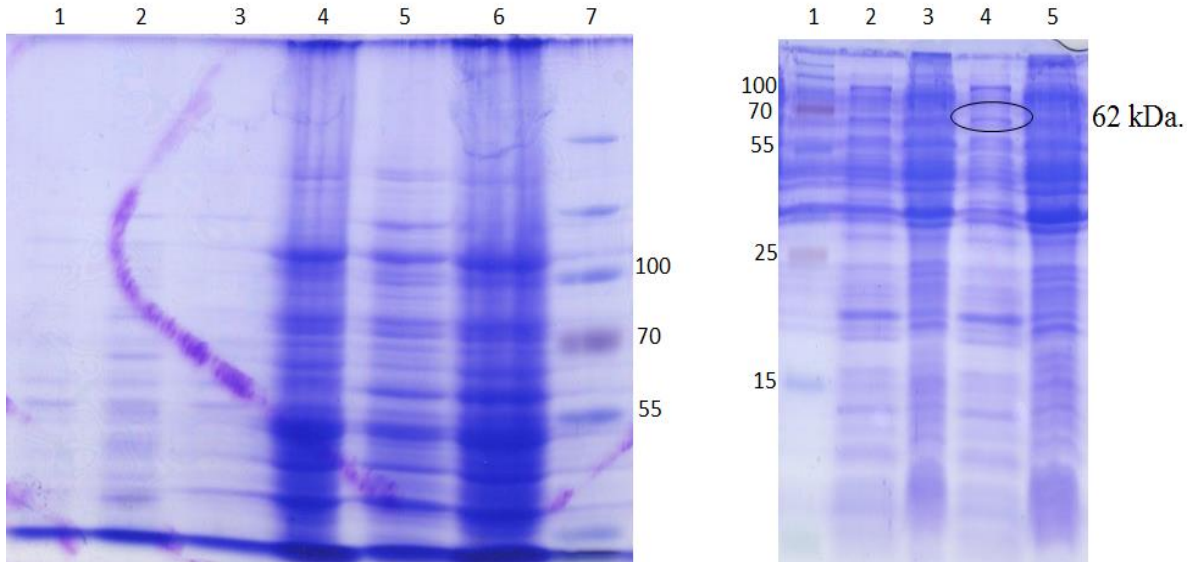


Figura 20. PAGE-SDS de la expresión de LadS a diferentes concentraciones de IPTG después de 4 horas de inducción. Izquierda. Carril 1, 2 y 3: fracción soluble sin inducir, 0.25 mM y 1 mM de IPTG. Carril 4, 5 y 6: fracción insoluble sin inducir, 0.25 mM y 1 mM de IPTG. Carril 7: marcador de peso molecular, 250 kDa. **Derecha.** Carril 1: marcador de peso molecular, 250 kDa. Carril 2 y 3: fracción soluble e insoluble, 0.5 mM de IPTG. Carril 4 y 5: fracción soluble e insoluble, 0.75 mM de IPTG.

7.10 Purificación de la región citoplasmática de la cinasa LadS

Posteriormente se realizó un primer ensayo de purificación de la cinasa LadS en condiciones nativas utilizando el sistema de purificación con níquel (Ni-NTA). En la figura 21 se muestra el resultado obtenido de dicho ensayo. Se observa en la imagen el corrimiento electroforético de las etapas de purificación de la fracción soluble del lisado celular a las condiciones establecidas anteriormente. Se puede ver que para las eluciones de la cromatografía existe una banda que corresponde con el peso esperado para LadS; además de una banda de un peso mayor. Con este ensayo concluimos que nuestra proteína se expresa poco en el sistema utilizado.

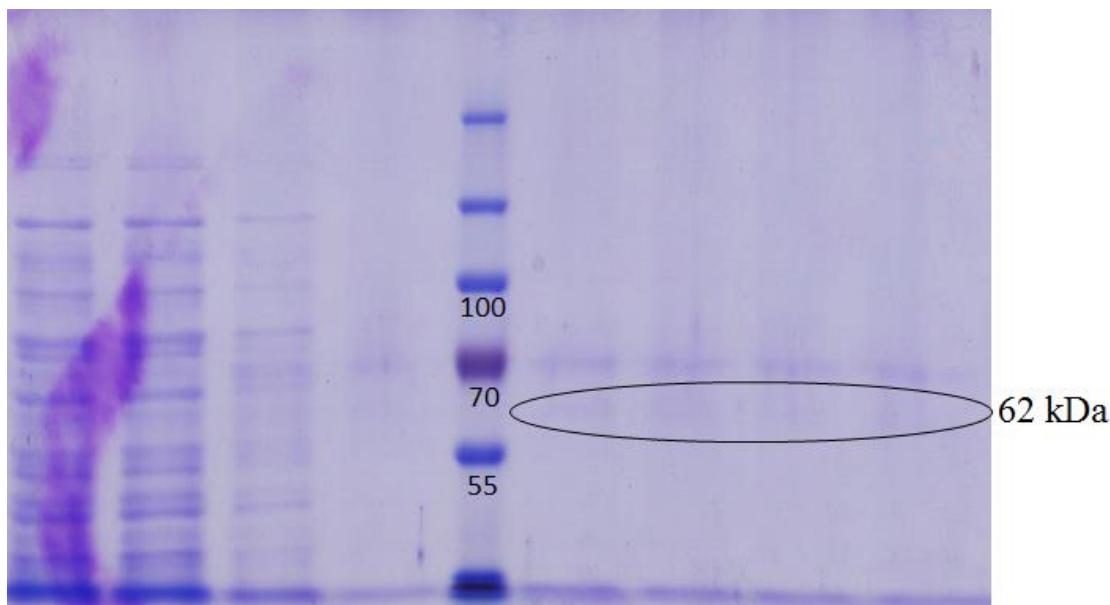


Figura 21. PAGE-SDS de los pasos de purificación de la cinasa LadS. Carril 1: fracción soluble. Carril 2: fracción no unida. Carril 3: lavado 1. Carril 4: lavado 2. Carril 5: marcador de peso molecular. Carril 6: elución 1. Carril 7: elución 2. Carril 6: elución 3. Carril 7: elución 4.

La expresión y purificación de LadS permitirá realizar el ensayo de interacción de proteínas de tipo *pull down*. Cabe la posibilidad de que esta metodología sea capaz de detectar la probable interacción entre LadS y GacS. Sin embargo, en el modelo de *P. aeruginosa* tampoco se detectó heterodimerización entre estas proteínas con este método (Chambonnier et al., 2016).

8. DISCUSIÓN

En *P. aeruginosa* LadS controla de manera positiva la expresión del gen *rsmY* y *rsmZ*, esta regulación se produce a través del sistema GacS/GacA. A diferencia de RetS, LadS ejerce este efecto sin formar heterodímeros con GacS. En cambio, LadS está involucrada en la fosforilación de GacS (Chambonnier et al., 2016).

En el trabajo realizado por Cruz (2012) se demostró la presencia de la cinasa LadS en *A. vinelandii*. Además, se evidenció que no existe interacción entre la

cinasa LadS y GacS (Sánchez, 2012). Todo lo anterior indicaba que la función de esta cinasa era similar con lo reportado para *P. aeruginosa* (Ventre *et al.*, 2006). Sin embargo, al generar una cepa mutante *ladS* se observó que existía un aumento en la producción de alginato, lo que apuntó a que LadS actúa como un regulador negativo del sistema contrario a lo esperado (Reyes, 2018).

En este punto, conviene mencionar que en *P. aeruginosa* se ha demostrado que RetS puede llevar a cabo una cascada de fosforelevo a través la proteína HptB. HptB es una proteína citoplásmica con un dominio Hpt, que puede ser fosforilada además por las cinasas histidínicas híbridas, PA1976, PA2824 y PA1611 (Hsu *et al.*, 2008). HptB, por fosforilación activa al regulador de respuesta PA3346; a su vez PA3346 activa mediante desfosforilación a una proteína que actúa como un factor anti-anti-sigma (PA3347). Hasta la fecha se desconocen tanto el 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).

En *A. vinelandii* existe un homólogo a HptB y homólogos putativos para el RR PA3346 y para el anti-anti-sigma PA3347, lo cual sugiere que en *A. vinelandii* existe una cascada de regulación alternativa que podría controlar la expresión de *rsmY*.

Con lo anteriormente mencionado, cabía la posibilidad de que LadS ejerciera su efecto regulador a través de la vía alternativa de HptB; puesto que carece del dominio Hpt. Para comprobar si la función de LadS depende de la vía Gac/Rsm o de la vía de HptB, se realizó la doble mutación *gacS ladS* observando una disminución sobre la síntesis de alginato y la expresión de *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY*. Estos resultados apuntan a que el efecto ejercido por LadS depende del sistema GacS/Rsm, ya que de manera contraria la mutación en *gacS* no habría suprimido el efecto de la mutación en *ladS*. Es decir, si el efecto de la doble mutación resultaba en la persistencia del aumento de la síntesis de alginato esto significaría la participación de la vía HptB como mediador de la función de LadS.

Si bien los resultados obtenidos indicaban que LadS actúa mediante la vía Gac/Rsm, el trabajo realizado en paralelo por García (2020) reforzó esta conclusión. En este trabajo se evaluó el efecto de la mutación *ladS* sobre la expresión de los genes *rsmZ1-7* y *rsmY*, donde se observó, que de manera general existe un aumento en la expresión de los *rsms-sRNAs*. Es importante destacar que el gen *rsmZ3* no presenta cambio en su expresión y que para *rsmZ5* y *rsm7* existe una disminución de la expresión en el fondo genético mutante. Esto podría explicarse debido a que los *rsms-sRNAs* se expresan y afectan de una manera diferencial la producción de alginato en *A. vinelandii* (López et al., 2018).

Con estos experimentos, demostramos también que GacS tiene una jerarquía mayor con respecto a LadS en el sistema de regulación y que ambas cinasas están relacionadas funcionalmente. Esta relación supone la interacción entre ambas cinasas; sin embargo, el ensayo de doble híbrido cuantitativo llevado a cabo no fue capaz de detectar esta interacción. Por lo tanto, propusimos realizar un ensayo tipo *pull down* para la detección de interacciones proteicas.

Mediante la construcción del vector de expresión pET21a+ *ladS*, en el cual se clonó la región citoplasmática de LadS, generamos la cepa que expresa dicha cinasa. Los resultados de la expresión y purificación de LadS nos indican que en el sistema utilizado la expresión de la proteína es muy baja y que convendría evaluar el vector de expresión utilizado o modificar las condiciones de expresión.

A diferencia de *P. aeruginosa*, en *A. vinelandii* LadS es un regulador negativo del sistema, lo que plantea la interrogante del mecanismo de acción de la cinasa. Se ha demostrado que RetS, el regulador negativo del sistema en *P. aeruginosa*, no sólo actúa formando heterodímeros con GacS para impedir su fosforilación y la represión de la transcripción de *rsmY* y *rsmZ*, sino que también posee dos mecanismos adicionales para ejercer tal efecto. En el primer mecanismo el dominio REC de RetS es capaz de tomar el grupo fosforilo del residuo de His en el dominio HisKA de GacS, en el segundo mecanismo RetS utiliza su actividad de fosfatasa para acelerar la defosforilación del dominio REC de GacS-P (Francis et al., 2018)

En este trabajo de tesis, con base a los resultados obtenidos hipotetizamos que en *A. vinelandii* LadS puede estar actuando como una fosfatasa sobre GacS para poder, de esa forma ejercer su efecto regulatorio sobre la expresión de los *rsm*-sRNAs y su control sobre la síntesis de alginato. En los trabajos posteriores esto podría demostrarse realizando ensayos de fosforilación entre GacS y LadS, resaltando que estos experimentos requieren obtener a LadS de forma purificada, por lo que el primer acercamiento a los ensayos de expresión y purificación realizados en este trabajo son importantes para poder determinar el flujo de fosforilación entre estas proteínas.

9. CONCLUSIONES

LadS regula la síntesis de alginato a través del sistema Gac-Rsm en *A. vinelandii*.

LadS requiere de la presencia de GacS para ejercer su efecto regulador sobre la síntesis de alginatos y la expresión de *rsmz1*, *rsmZ2* y *RsmY*.

El sistema de doble híbrido LexA no detecta la interacción entre las cinasas LadS y GacS.

10.PERSPECTIVAS

Establecer si el efecto sobre la síntesis de alginato y la expresión de *rsmz1*, *rsmZ2* y *rsmY* se debe a la mutación doble *gacS::Sp ladS::Gm* realizando la complementación de la doble mutante.

Comprobar mediante un Western Blot si la proteína recuperada de la purificación corresponde a LadS.

Realizar los ensayos de pull down entre las cinasas LadS y GacS

11. BIBLIOGRAFÍA

- Becking, J. H. (2006). The Family Azotobacteraceae. *Prokaryotes*. 6:759–783.
- 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.
- 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
- Broder, U. N., Jaeger, T., & Jenal, U. (2016). LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature microbiology*, 2, 16184.
- Capra, E.J. & Laub, M.T. 2012. "Evolution of two-component signal transduction systems". *Annual Review of Microbiology*. 66: 325–47.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín, G. 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol*. 182:2624-2628.
- 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, de Bentzmann S, Bordi C. 2016. The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* May 13; 12(5): e1006032.
- 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 investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
- Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G. W., & Yahr, T. L. (2006). Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infection and immunity*, 74(6), 3334–3341.
- Espín, G. (2009). Biología de *Azotobacter vinelandii*. Obtenido de Microbios: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>
- Ertesvåg H. (2015). Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in microbiology*, 6, 523.
- Francis, V. I., Waters, E. M., Finton-James, S. E., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A. R., & Porter, S. L. (2018). Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature communications*, 9(1), 2219.

- Galindo E., C. Peña, C. Núñez, D. Segura, and G. Espín. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.* 16: 6:7.
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 150-159.
- Gao, R. & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:133–54.
- Georgellis, D., Lynch, S., & Lin, E. (1997). In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 5429–5435.
- 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.
- Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 14(12), 1351–1363.
- Hernández-Eligio, A., Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millán LF, Espín G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 158:1953-63.
- 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.
- Lapouge, K. Schubert, M. Allain, F. H. & Haas D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*. 67, 241–253.
- López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., Núñez, C., & Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular biotechnology*, 60(9), 670–680.
- Maldonado, R., Jiménez, J., & Casadesús, J. (1994). Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology*. 176(13): 3911–3919.
- Manzo J, Cocotl-Yañez M, Tzontecomani T, Martínez V M, Bustillos R, Velásquez C, Goiz Y, Solís Y, López L, Fuentes LE, Núñez C, Segura D, Espín G, Castañeda M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 21:147-59.

- Mikkelsen, H., McMullan, R., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS one*, 6(12), e29113.
- Moll, e. a. (2001). Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *RNA Biology*, 508-516.
- Rehm B.H.A. (2009). Alginates: Biology and Applications. *Microbiology Monographs* 13.
- Remminghorst, U. Rehm, H. A. B. (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* 28:1701–1712.
- Reyes, N. J. I. (2018). Estudio del efecto regulador de las cinasas RetS y LadS sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm en *Azotobacter vinelandii*. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
- 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, Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G., & Segura, D. (2013). Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 195(8), 1834–1844.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516–539.
- Sanchez 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 investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
- Segura, D. Núñez, C. Espín, G. (2014). *Azotobacter* Cysts, In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Stewart, R. C. (2010). Protein Histidine Kinases: Assembly of Active Sites and Their Regulation in Signaling Pathways. *Curr Opin Microbiol*. 13(2): 133–141.
- Stock, A. M. Robinson V. L, Goudreau P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*. 69:183–215
- Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(11), 198.
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M. & Romeo, T. (2015) Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 193–224.
- Ventre, e. a. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 171-176.

Wang, S. (2012). Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms, In: Huang C (ed) Protein phosphorylation in human health. IntechOpen, London, United Kingdom, pp 339–464.