



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



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

Estudio del Efecto de RsmA sobre la Expresión del gen *algD*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

I.B.Q. María Eugenia Valentina García Aguilar

ASESOR DE TESIS:

D.C. Miguel Castañeda Lucio

Puebla, Pue., México

Octubre del 2016

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia

Porque de todas las riquezas y de todas las bellezas que se pueden tener en la vida Dios me regaló lo más perfecto y maravilloso que se puede anhelar: mi familia.

Los amo con todo mi corazón

AGRADECIMIENTOS

A Dios, solo deseo y trato día con día de retribuir a este mundo de todas las maneras posibles y de manera multiplicada todas y cada una de las bendiciones con que has colmado mi vida. A ti te agradezco y te ofrezco todos mis triunfos, mis éxitos, mis fracasos, mis intentos, mis acciones y mi vida.

A mi mamá, no hay día que no despierte agradecida con Dios por la mujer tan maravillosa que me dio como mamá, como ejemplo, como mujer, como amiga y como ángel. Gracias por dar siempre más de lo que se puede esperar, por estar siempre para mí y gracias por la familia que tú y papá nos han regalado. Te amo mami.

A mi papá, eres mi inspiración y motivación. Aprendo diario de tu bondad y de tu forma de ver la vida, porque sé que a donde vaya y dónde este estas conmigo y ese apoyo me tiene dónde estoy y me impulsa a buscar más en esta vida. Gracias por ser tú y por siempre ponernos a tu familia en primer lugar. Te amo papi.

A mi hermano Jorge (Vito), un día me preguntaron a quién admiraba en esta vida y pensé en ti. Eres mi ejemplo, admiro tu gran corazón, tu entereza, tu talento, esfuerzo, entusiasmo y todos tus éxitos. Me inspiras a intentar más, a entender que no existen imposibles y tenerte conmigo ha hecho que la vida sea increíble. Te amo muchísimo.

A mi hermana Ceci, porque eres mi otra mitad. Esta vida es perfecta por ti, porque no importa a donde vayamos siempre formas parte de mí. Gracias por creer en mí, porque me inspiras y me motivas a no dejar de soñar y creer que es posible, pero sobre todo gracias por soñar conmigo, porque tengo la seguridad que lo vamos a lograr y que llegaremos mucho muy lejos. Te amo cookie.

A mis tíos Marty y Toño, gracias porque más que ofrecerme una casa me dieron un hogar, porque estuvieron siempre para mí y me hicieron sentir siempre segura y feliz. Soy muy afortunada de tenerlos en mi vida y doy gracias por permitirme compartir este tiempo con ustedes. Les estoy eternamente agradecida y recuerden siempre que tienen un lugar muy especial en mi corazón. Los quiero muchísimo.

A Miguel, la vida te llena de muchas sorpresas y la más bonita ha sido coincidir contigo. Gracias por compartir conmigo esta etapa, porque estuviste para mí, siempre apoyándome, queriéndome y cuidándome. Contigo aprendí que cuando se quiere la distancia no existe y comprendí lo que significa el amor. Te amo.

A Gama, contigo aprendí que la familia es más que solo sangre y que donde menos te lo esperas encuentras a una de las personas más importantes en tu vida. Gracias por tu amistad, por estar siempre, porque los momentos y experiencias que compartimos

son invaluable. Te admiro por la gran persona que eres. Te quiero muchísimo y aunque no siempre sea en persona siempre estaré contigo desde mi corazón.

Gracias Doc Miguel Castañeda por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo incondicional, por las enseñanzas, la paciencia y por la ayuda a cada momento para formarme, aprender y desarrollar este proyecto de investigación. Gracias por el espacio, el tiempo y por su amistad, porque llegar a conocerlo me permitió admirarlo aún más como profesionalista y como persona. Espero algún día ser capaz de remunerar todo lo que me facilitó, permitió y ayudo a lograr.

Gracias Lili, por tu amistad y tus enseñanzas, porque aprendí mucho de ti y porque siempre tuviste el tiempo y la disponibilidad. Gracias por hacer de este laboratorio mucho más que un lugar de trabajo, porque nos apoyas siempre. Gracias por ser parte de esta experiencia y ten por seguro que cuentas con mi amistad siempre.

Gracias a todos y cada uno de la familia Miguelandis, porque somos mucho más que un equipo de trabajo, somos una familia. Gracias por los momentos compartidos, porque todos y cada uno de ustedes hicieron que esta etapa fuera muchísimo mejor y porque de ustedes aprendí cosas de laboratorio pero también muchas cosas de la vida, porque me llevo su amistad y tengan por seguro que cuentan con la mía siempre. Gracias Flor e Inés porque fueron mi equipo y mis amigas, Lau, Pau, Gis, Chucho, Thali por todas las risas y las platicas interminables, Hassam, Jimena, Gaby y Chato, Vicky, Araceli, Larisa, Dalia y a las niñas Diana y Karla.

Gracias a mis amigos Elena y Migue por su amistad y a todos mis compañeros de generación. A mis amigas Yunuén y Karla porque desde siempre y para siempre tienen un lugar en mi corazón, a Fanny y Claudia por estar siempre, a Pato, Rodrigo y Guti porque el tiempo y la distancia no borra la amistad. A Juan Pablo porque desde el cielo sigues siendo siempre ese gran amigo.

A mis sinodales D.C. Cinthia Nuñez López, D.C. Rebeca Martínez Contreras, D.C. Alberto Ramírez Mata y al D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez. Gracias por su tiempo y su dedicación, porque me ayudaron durante mi formación, por las enseñanzas y por compartir sus conocimientos a lo largo de este proyecto.

Al Conacyt agradezco por el apoyo y la oportunidad para poder pertenecer a esta Institución.

Gracias a todos los que conforman el CICM, a todos los Doctores que me impartieron clases y que compartieron conmigo un poco de su experiencia y conocimientos. Gracias a Ángeles porque su actividad y presencia es parte esencial del Instituto y gracias a Don Sergio porque es parte importante del departamento y porque con sus saludos y sus buenos deseos hizo siempre todas las mañanas más alegres.

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa, de vida libre, que posee varias características particulares. Es una bacteria poliploide, fija nitrógeno en condiciones aerobias, además tiene la habilidad de producir dos polímeros de interés industrial, el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB). El alginato es un polisacárido importante por su capacidad viscosificante y gelificante, el PHB es un polímero biodegradable acumulado por la bacteria como fuente de carbono y energía.

La GDP-manosa deshidrogenasa es una enzima clave en la biosíntesis del alginato, el gen que codifica para esta enzima es *algD*. La expresión desde los promotores de *algD* está bajo el control del sistema de dos componentes GacS/GacA. En muchas γ -proteobacterias, homólogos a GacA controlan la expresión de los pequeños RNAs reguladores de la familia Rsm Z/Y/X (CsrB/CsrC), que interactúan con la proteína RsmA (CsrA). Esta proteína se pega a los mRNAs blanco actuando como represor traduccional. La interacción de los pequeños RNAs Rsm/Csr con RsmA/CsrA contrarresta su actividad represora. En *A. vinelandii*, mutaciones en los genes *gacS/gacA* abaten la síntesis de alginato, esto se explica por el control que GacS/A tiene sobre la expresión del gen *algD*.

Se ha demostrado que RsmA se une a la región no codificante de los mRNAs del gen *algD*; sugiriendo que la expresión de estos genes está regulada a nivel postranscripcional por RsmA. Por otro lado, la dificultad de obtener mutantes nulas del gen *rsmA* en un fondo genético productor de alginato y la posibilidad de generar mutantes nulas en un fondo no productor de alginato ubican a RsmA como un regulador importante en la producción de alginato. Aunado a esto la interacción *in vitro* de RsmA con la región 5' de *algD* apuntaban a que el efecto regulador de RsmA sobre la producción de alginato, se establecía a nivel postranscripcional directamente sobre la expresión de *algD*. Sin embargo, las evidencias generadas hasta ese momento fueron obtenidas por experimentos *in vitro*, haciendo falta pruebas *in vivo* que nos permitieran probar fehacientemente la aseveración anterior.

En este trabajo se generaron evidencias *in vivo* de que RsmA regula post-transcripcionalmente la expresión del gen *algD*. Evaluamos el efecto de RsmA sobre la expresión de *algD* mediante la sobreexpresión de *rsmA*, de tal manera que el grado de expresión de *algD* se pudiera determinar a través de una fusión de la región reguladora de *algD* con el gen reportero *gusA*. Se optó por generar dos versiones de la fusión del gen reportero, una transcripcional y una traduccional. En las fusiones traduccionales la actividad enzimática del gen reportero se vio disminuida en un 70%, cuando se sobre expresó a *rsmA*, indicando que RsmA tiene efecto sobre la expresión del gen *algD* y que este efecto es negativo.

ABSTRACT

Azotobacter vinelandii is a Gram-negative; this is a free-living soil bacterium, which includes several interesting characteristics. It is a polyploidy bacterium, capable of fixing atmospheric nitrogen in aerobic conditions. Besides, *A. vinelandii* has the ability to produce two polymers of industrial interest: the extracellular polysaccharide alginate and the intracellular polyester poly- β -hidroxibutirate (PHB). The alginate is an important polymer because of its viscosifier and gelling ability, and the PHB is a biodegradable plastic accumulated by the bacteria as a result of carbon and energy reserves.

GDP-mannose dehydrogenase is an important key enzyme for the alginate biosynthetic pathway, the gene encoding for this enzyme is *algD*. The expression from the *algD* promoters is under control of the two-component system GacS/GacA. In many γ -proteobacteria, GacA homologs control the expression of the small regulatory RNAs of the RsmZ/Y/X (CsrB/CsrC) family, which interacts with RsmA (CsrA) proteins. This protein binds their target mRNAs by acting as translational repressors. The interaction of Rsm/Csr small RNAs with RsmA/CsrA counteracts its repressor activity. In *A. vinelandii* mutations in the *gacS/gacA* genes appeals the alginate synthesis, this can be explained by the control that GacS/A has on the expression of the *algD* gene.

It has been demonstrated that RsmA protein binds the non-coding region of the messenger RNAs *algD* gene; this suggests that the expression of these genes is regulated at the post-transcriptional level by RsmA. In the other hand, it has been found that overproduction of alginate makes unfeasible mutants with total removals of *rsmA* gene and only in a non-producing alginate background it has been possible to obtain mutants with total removals of *rsmA* gene, placing RsmA as an important regulator in alginate production.

Besides the *in vitro* interaction of RsmA with the 5'-UTR region of *algD* gene suggested that the regulating effect of RsmA on the alginate production was established at posttranscriptional level directly on the expression of *algD*. Nevertheless, the generated evidences until now were obtained by *in vitro* experimentation, lacking in *vivo* testing that allows us to probe irrefutably the previous statement.

In this work, *in vivo* evidences that show that RsmA regulates at posttranscriptional level the expression of *algD* gene were generated. We evaluate the effect of RsmA on the expression of *algD* gene through the overexpression of *rsmA*, in such a way that the degree of *algD* expression could be determinate using a fusion of the *algD* regulatory region together with the reporter gene *gusA*. It was chosen to generate two versions of the *algD-gusA* fusion, a transcriptional and a translational. In the case of the translational fusion the enzymatic activity was decreased in a 70% when *rsmA* was overexpress, indicating that RsmA has effect on the expression of *algD* gene and that this expression is negative.

INDICE

RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>.....	1
1.2 Los alginatos.....	3
1.2.1 Composición y función biológica.....	4
1.2.3 Biosíntesis de los alginatos.....	5
1.2.4 Genética de la síntesis de los alginatos.....	7
1.3 Regulación de la síntesis de los alginatos.....	8
1.3.1 Sistemas de dos componentes.....	8
1.3.2 El sistema de regulación postranscripcional Rsm.....	10
II ANTECEDENTES.....	11
2.1 La ruta de transducción de señales Gac/Rsm.....	11
2.1.1 Regulación postranscripcional por el sistema Gac/Rsm en <i>A. vinelandii</i>	12
2.1.2 Regulación de la expresión de <i>algD</i> por el sistema GacS/GacA.....	13
2.2 Esencialidad condicional de CsrA/RsmA.....	15
2.3 Mutantes <i>rsmA</i>.....	16
III HIPÓTESIS.....	19
IV JUSTIFICACIÓN.....	19
V OBJETIVOS.....	19
5.1 General.....	19
5.2 Particulares.....	19
VI MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Cepas y material biológico.....	20
6.2 Medios de cultivo.....	22
6.3 Técnicas empleadas.....	23
Oligonucleótidos utilizados para PCR's.....	30
VII RESULTADOS.....	31
7.1 Generación de las fusiones <i>RRalgD-gusA</i> recombinadas en el locus <i>algD</i>.....	32
7.1.1 Construcción de las fusiones <i>algD-gusA(T/PT)-Gm</i>	33
7.1.2 Fusiones <i>algD::gusA(T/PT)-Gm</i> en <i>A. vinelandii</i>	38
7.2 Sobreexpresión de RsmA.....	40
7.2.1 Sobreexpresión de <i>rsmA</i> bajo el promotor inducible <i>tac</i>	40
7.2.2 Sobre-expresión constitutiva de <i>rsmA</i>	41
7.3 Medición de expresión de fusiones <i>RRalgD-gusA</i> bajo la sobreexpresión de <i>rsmA</i>.....	44
VIII DISCUSIÓN.....	45
IX CONCLUSIÓN.....	49
X PERSPECTIVAS.....	49
XI BIBLIOGRAFÍA.....	50

Índice de Figuras

FIG	TITULO	P
.	.	
1	<i>Azotobacter vinelandii</i> en su forma bacilar	1
2	Diagrama esquemático del ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i>	2
3	Quiste maduro de <i>A. vinelandii</i>	2
4	Célula vegetativa de <i>A. vinelandii</i> cerca del término de su división.....	2
5	Inmovilización de levaduras en alginato de calcio.....	3
6	Estructura secundaria del Polimanurato (MM) y el Poligurunato (GG)	4
7	Modelo "Caja de Huevo" que describe la estructura del alginato.....	4
8	Pasos Citosólicos de la Biosíntesis de Alginato para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
9	Polimerización/complejo de secreción, desde membrana interna hasta membrana externa.....	7
10	Organización de los genes de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	7
11	Modelo de la ruta de transducción de señales mediada por el sistema de dos componentes GacS/GacA.....	9
12	Mecanismo general del sistema de regulación postranscripcional Csr/Rsm.....	10
13	Características generales de la ruta de transducción de señales Gac/Rsm en γ -proteobacterias.....	11
14	Modelo de la Activación Transcripcional de <i>rsmZ1</i> y <i>rsmZ2</i> en <i>A. vinelandii</i>	12
15	Tabla de la Producción de alginato en cepas de <i>A. vinelandii</i>	13
16	Modelo de Regulación de la expresión de <i>algD</i> por el regulador global GacA y σ^S	14
17	Interacción de RsmA con la región reguladora de <i>algD</i>	15
18	Acumulación Excesiva de glucógeno en mutante $\Delta csrA::cat$ perjudica la viabilidad en fuentes de carbono glucolíticas.	16
19	Merodiploida al intentar obtener una mutante nula <i>rsmA</i> en <i>Azotobacter vinelandii</i> Cepa E.....	17
20	Fenotipo mucóide de la cepa JGDE y JGDE <i>rsmA</i>	17
21	Obtención de mutante nula en <i>rsmA</i> . a)Esquema de la Cepa JGED.....	18
22	Vectores de la serie pUMA para realizar fusiones cromosomales.....	31
23	Vector pUMA-Km- <i>tac</i>	32
24	Esquema de la secuencia de la región promotora del gen <i>algD</i> (<i>RRalgD</i>).....	32
25	Diagrama descriptivo del Interposón transcripcional contenido en pUMAT <i>cgusAT-Gm</i>	33
26	Diagrama descriptivo del Interposón traduccional contenido en pUMAT <i>cgusAPT-Gm</i>	34
27	Diagrama pGem- <i>algD-gusAT-Gm</i>	35
28	Patrón de Restricción correspondiente al plásmido pGem- <i>algD-gusAT-Gm</i> al cortar con la enzima <i>SacI</i>	35
29	Patrón de Restricción correspondiente al plásmido pGem- <i>algD-gusAT-Gm</i> al cortar con la enzima <i>EcoRV</i> ...	36
30	Diagrama pGem- <i>algD-gusAPT-Gm</i>	36
31	Patrón de Restricción al cortar con <i>SacI</i> el plásmido pGem- <i>algD-gusAPT-Gm</i>	36
32	Patrón de restricción obtenido con la Enzima <i>EcoRV</i> al cortar el plásmido pGem- <i>algDgusAPT-Gm</i>	37
33	Esquema de los amplicones y oligonucleótidos utilizados para comprobar fusiones cromosomales.....	37
34	Construcciones <i>algD::gusA (T/PT)-Gm</i> en una placa de LB con sustrato Xgluc.....	38
35	Recombinantes de las fusiones cromosomales transcripcional y traduccional.....	38
36	Producto de PCR para comprobar las fusiones cromosomales en <i>A. vinelandii</i>	39
37	Actividad enzimática en fusiones cromosomales <i>algD::gusAT-Gm</i> y <i>algD::gusAPT-Gm</i>	39
38	pUMA Km <i>tac-rsmA</i>	40

39	Plásmido pKT 0.3 <i>rsmA</i>	41
40	Transconjugantes pMCY2 <i>algD::gusA (T/PT)-Gm</i>	42
41	Conjugación Inversa de los plásmidos <i>algD</i> pKT 230 y pMCY2 transcripcionales y traduccionales.	43
42	Comprobación PCR conjugación inversa (Oligos Sm)	43
43	Medición de la Expresión de Actividad Enzimática de las fusiones cromosomales <i>algD::gusA (T/PT)-Gm</i> bajo la sobreexpresión de <i>rsmA</i>	44
44	Diagrama del gen <i>gusA</i> transcripcional.....	46
45	Diagrama del gen reportero <i>gusA</i> en su forma traduccional.....	46

I INTRODUCCIÓN

1.1 *Azotobacter vinelandii*

Las bacterias del género *Azotobacter* que se han identificado hasta ahora son inocuas y muchas exhiben un gran potencial para la síntesis de diferentes productos de interés para el ser humano (Peña Malacara, 2013).

Azotobacter vinelandii es una bacteria que se desarrolla en suelos, es de vida libre y se encuentra ampliamente distribuida. Es Gramnegativa y estrictamente aerobia, además de que posee varias características interesantes, incluyendo la habilidad de crecer en una amplia variedad de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos, así como la capacidad de producir alginato, poli- β -hidroxibutirato (PHB) y la de fijar nitrógeno (Setubal et al, 2009).



Fig 1 *Azotobacter vinelandii* en su forma bacilar (Nagpal et al, 1989)

A. vinelandii presenta variación morfológica, desde bacilo hasta coco (pleomorfismo) durante su desarrollo, dependiendo de las condiciones ambientales en que se encuentre. Estas células presentan un tamaño que puede llegar a alcanzar los 5 μm de diámetro. Puede crecer en forma planctónica y tiene la capacidad de formar agregados irregulares (Peña Malacara, 2013). Es capaz de fijar nitrógeno en presencia de concentraciones de oxígeno más altas respecto a la mayoría de los diazotrofos. Para proteger su nitrogenasa de la inactivación por oxígeno, esta bacteria está equipada con mecanismos fisiológicos particulares, tales como una alta tasa de respiración (Setubal et al, 2009).

A. vinelandii es una bacteria poliploide, es decir que cada célula llega a tener varias copias de su cromosoma. El estado de poliploidía se ve modificado durante el ciclo celular en medio rico; células en fase exponencial tardía llegan a tener más de 40 copias del cromosoma, mientras que en la fase estacionaria temprana el número es mayor a 80 copias por célula. En fase estacionaria tardía el contenido de DNA por célula es incluso mayor, probablemente más de 100 copias del cromosoma (Maldonado, 1994).

El ciclo de vida de *A. vinelandii* se presenta esquemáticamente en la Fig. 2. Las células vegetativas son móviles por flagelos peritricos, además las células en proceso de división tienen una forma típica parecida a un maní. Tras la inducción de enquistamiento, las células pierden movilidad, se tornan esféricas y sus paredes engrosan en un periodo de horas. El proceso morfogénico produce una célula en reposo o cuerpo central, que se encuentra revestido por una cubierta interna (intina) y una cubierta externa (exina) (Winogradsky, 1938). La acumulación de lípidos en el cuerpo central consiste de PHB.

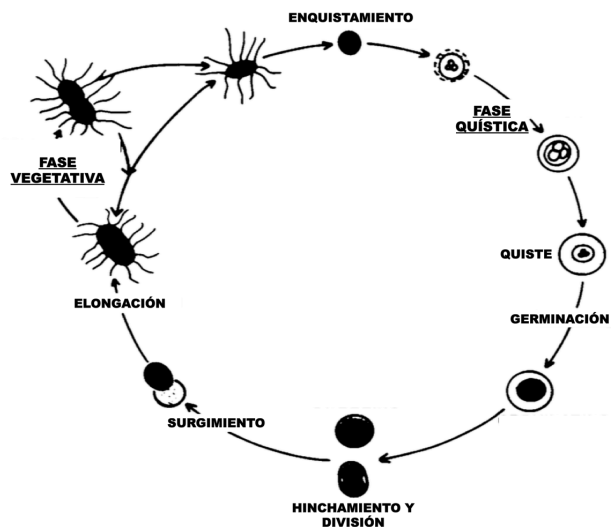


Fig 2 Diagrama Esquemático del Ciclo de Vida de *A. vinelandii*.
Tomado de (Sadoff, 1975)

Los quistes son esferoides achatados de 1.5 μm por 2.0 μm y son aproximadamente la mitad del tamaño en estado vegetativo. Son células metabólicamente latentes, mucho más resistentes que las células vegetativas en condiciones físicas perjudiciales aparte del calor. En el laboratorio son viables por más de 10 años en almacenamiento en lugares secos, sugiriendo que la resistencia a la desecación quizá sea una cualidad de supervivencia natural (Sadoff, 1975).

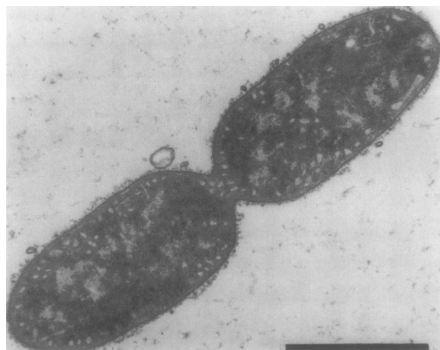


Fig 4 Célula vegetativa de *A. vinelandii* cerca del término de su división. El marcador representa 1.0 μm . Tomada de (Hitchins, 1970)

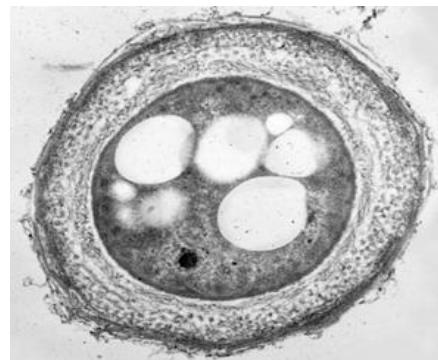


Fig 3 Quiste maduro de *A. vinelandii*.
Tomado de (Brock, 1999)

A. vinelandii tiene la capacidad de producir dos polímeros de interés industrial: PHB y alginato. El PHB se acumula como fuente de reserva de carbono y energía, el cual es utilizado como un plástico biodegradable y termoestable; mientras que los alginatos que forman parte del quiste son utilizados a nivel industrial.

1.2 Los alginatos

La importancia a nivel industrial de los alginatos radica en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos. Las especies de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* son productoras de este polímero (López-Munguía, 1993) (Rehm, 1997).

La aplicación de los alginatos se basa en cuatro propiedades principales. La primera es su habilidad como espesante en soluciones acuosas, generando un aumento en la viscosidad de la solución en que se disuelven. La segunda es su capacidad de retener agua. La tercera se debe a su habilidad de formar un gel a partir de una serie de reacciones químicas de intercambio iónico que dan lugar a la formación de enlaces entre las cadenas adyacentes del polímero de alginato. La cuarta se basa en la propiedad de formar películas (Funami, 2009).

Los geles de alginato se generan cuando el alginato interactúa con un catión divalente como el calcio o sodio. Estos geles son capaces de formar microesferas (perlas de alginato), a las que se les incorporan enzimas o células vivas completas y su aplicación ha generado demasiado interés en la industria alimenticia, biotecnológica y en el sector de biomedicina (Smidsrod, 1990).

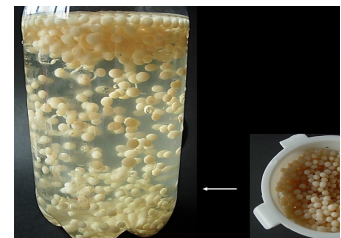
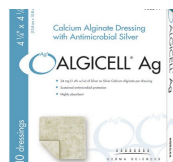


Fig 5 Inmovilización de Levaduras en alginato de calcio

En la industria alimenticia, los alginatos son ampliamente utilizados como aditivos debido a su habilidad para incrementar viscosidad, estabilizar, emulsificar y gelificar soluciones acuosas. Su aplicación principal es en la producción de helados para prevenir la cristalización. También se utiliza para estabilizar y evitar la separación de fases y en la formulación de productos con bajas calorías (Navarro et al., 2010).

En el campo de la medicina, el alginato se ha utilizado para obtener impresiones dentales y de los tejidos blandos adyacentes y en la elaboración de prótesis; así como en el recubrimiento y la protección de heridas. Un uso del alginato muy importante es como componente activo en productos farmacéuticos contra desordenes gastroesofageales (Clementi, 1997).



1.2.1 Composición y función biológica

Los alginatos son una familia de copolímeros no repetitivos, con cantidades variables de β -D- ácido manurónico y su epímero el α -L- ácido gulurónico, unidos por enlaces (1-4). Los monómeros están distribuidos en bloques homopoliméricos de residuos manuronato continuos (M-M), o residuos de gulurinato (G-G), o bien bloques heteropoliméricos de residuos alternados (M-G), como se muestra en la Fig. 6 (Rehm, 1997). Estudios de resonancia magnética nuclear han demostrado que también hay secuencias de triadas (GGG, MGG, MGM) (Yabur et al., 2007) (Smidrod, 1996)(Murillo & Hernández, 2007).

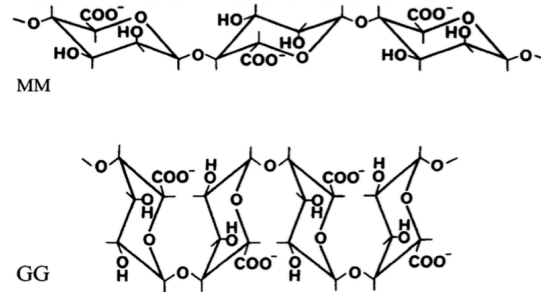


Fig 6 Estructura secundaria del Polimannurato (MM) y el Poligulurinato (GG). Tomado de (Rehm, 1997).

Los alginatos aislados de diferentes fuentes naturales varían en su longitud y distribución de los tipos de bloques. Los residuos de manuronato presentes en alginatos bacterianos pueden ser acetilados en un grado variable en la posición O-2 y/o O-3 (Skjak-Brake, 1996).

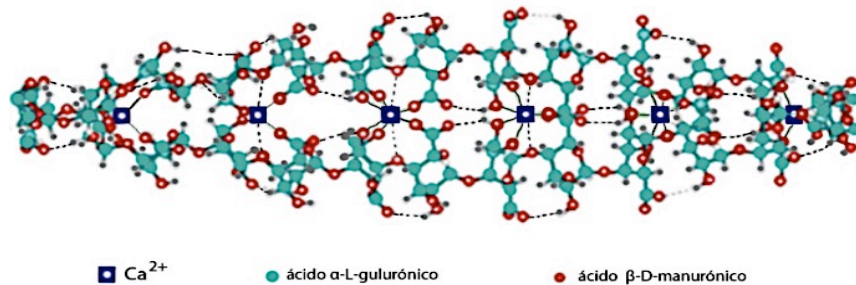
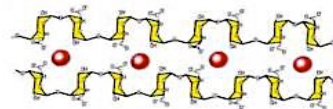


Fig 7 Modelo "Caja de Huevo" que describe la estructura del alginato. Tomado y adaptado de (Reddy & Reddy, 2010)



Cuando dos cadenas de bloques G se alinean, se forman sitios de coordinación con cavidades que tienen el tamaño adecuado para acomodar un catión divalente (el más común es Ca^{2+}), además están revestidas con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno electronegativos. Después de la adición de iones de calcio, el alginato sufre cambios conformacionales, dando lugar al conocido modelo de gelificación del alginato "caja de huevo" (Fig. 7). La fuerza de los geles de alginato depende del número de enlaces cruzados formados del tipo de reticulación iónica, de la longitud y la rigidez de los bloques entre los enlaces (Mancini, 1999).

Los alginatos que presentan grandes regiones de bloques G forman un gel de fuerza alta y exhiben una alta porosidad. Los que presentan grandes bloques M forman un gel de fuerza media, pero una alta resistencia a la sinéresis y exhiben poros más pequeños que los hacen más suave (Hernández, 2005).

El alginato participa en la adaptación y procesos de supervivencia en diversos hábitats. Tiene implicaciones en la formación de biopelícula, estructura de la cápsula, virulencia, etc.

El mecanismo de biosíntesis de alginato es muy similar entre *Pseudomonas* spp. y *A. vinelandii*, sin embargo, el papel físico y las propiedades de los polímeros resultantes en estas dos bacterias son sustancialmente diferentes. En el caso de *Pseudomonas* su producción es percibida como un importante factor de virulencia en plantas y humanos (Halverson, 2009). El alginato participa en la maduración de biopelícula y en la formación de biopelículas gruesas y altamente estructurada con micro colonias diferenciadas (Nivens et al, 2001). Se ha sugerido que también participa manteniendo los niveles de hidratación de las células y es requerido para la supervivencia y formación de biopelículas en condiciones de desecación. Además la producción de alginato se ve inducida bajo condiciones de desecación (Chang et al., 2007). La producción de biopelículas gruesas con alginato impiden la difusión de agentes antimicrobianos y protege a la bacteria de bactericidas comunes, además de que puede proteger de especies de oxígeno reactivas (Learn et al., 1987).

El alginato en *A. vinelandii* participa en la formación del quiste resistente a la desecación en estado latente y la cubierta extracelular que tiene la bacteria está compuesta de una alta concentración de alginato (Campos et al., 1996). El alginato es necesario para el enquistamiento, como componente esencial de las dos capas que cubren los quistes maduros: exinas e intinas, de las cuales el 32 y 13% de su peso en seco es alginato (Page, 1975). Cabe destacar que *A. vinelandii* muestra un fenotipo mucoide y secreta alginato durante su estado vegetativo. Esto puede indicar que hay diferentes señales reguladoras y rutas involucradas en la producción de alginato en *A. vinelandii*.

1.2.3 Biosíntesis de los alginatos

Las rutas biosintéticas para la producción de alginato son similares en *Azotobacter* y *Pseudomonas*. La biosíntesis puede ser dividida de forma general en cuatro pasos:

- 1) Síntesis de precursores
- 2) Polimerización
- 3) Modificaciones/Tránsito en el periplasma
- 4) Exportación.

La formación del precursor activo (GDP)-ácido manurónico es un proceso bien caracterizado, que involucra una serie de pasos enzimáticos en el citosol que alimentan a la maquinaria de polimerización de alginato localizada a nivel de membrana (Hay, 2013).

El alginato es sintetizado a partir de fructuosa-6-P. Tres enzimas bien caracterizadas, AlgA, AlgC y AlgD, catalizan los cuatro pasos biosintéticos para convertir la fructuosa-6-fosfato a GDP-ácido manurónico (Fig. 8).

En primera instancia, la conversión de fructuosa-6-fosfato a manosa-6-fosfato es catalizada por la actividad fosfomanosa isomerasa de una proteína bifuncional AlgA (May, 1994).

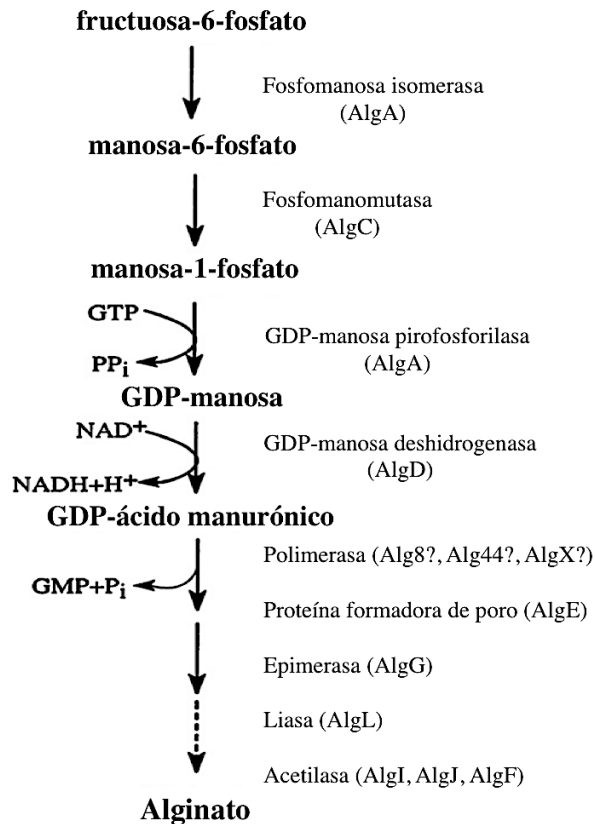


Fig 8 Pasos Citosólicos de la Biosíntesis de Alginato para *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*. Tomado y modificado de (Rehm, 1997)

Después AlgC (fosfomanomutasa) convierte la manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato (Zielinski, 1991), seguido por la conversión a GDP-manosa, que es catalizada por la actividad GDP-manosa pirofosforilasa de AlgA, por la hidrólisis de GTP (Shinabarger, 1991). Curiosamente, este paso catalizado por AlgA favorece una reacción reversible, pero la tracción generada en el paso subsecuente, catalizado por AlgD (GDP-manosa deshidrogenasa) desplaza la reacción hacia la producción de GDP-manosa. El paso final, catalizado por AlgD es irreversible y genera el ácido GDP-manurónico, sustrato activo para la maquinaria de polimerización de alginato. El paso de oxidación catalizado por AlgD se piensa que es una reacción limitante de velocidad clave en la ruta de biosíntesis de alginato (Roychoudhury, 1989; Tatnell, 1994; Tavares, 1999).

En la Fig. 9 se muestra la polimerización del ácido GDP-manurónico, la que se efectúa por la proteína Alg8, una manuronato polimerasa (MP) (Remminghorst y Rehm, 2006). La molécula polimanurónica resultante es entonces modificada por un complejo acetilasa que contiene a las proteínas AlgI, AlgJ, AlgF. Algunos de los residuos manuronato no acetilados son epimerizados a guluronato por una manuronato epimerasa (ME o AlgG), para su posterior exportación por membrana externa, a través de la proteína formadora de

poro AlgJ (Galindo et al., 2007). El polímero exportado es convertido al producto final alginato por una familia de siete homólogos de epimerasas extracelulares secretoras de C-5 manurano (AlgE1-7) (Ertesvag, 1995).

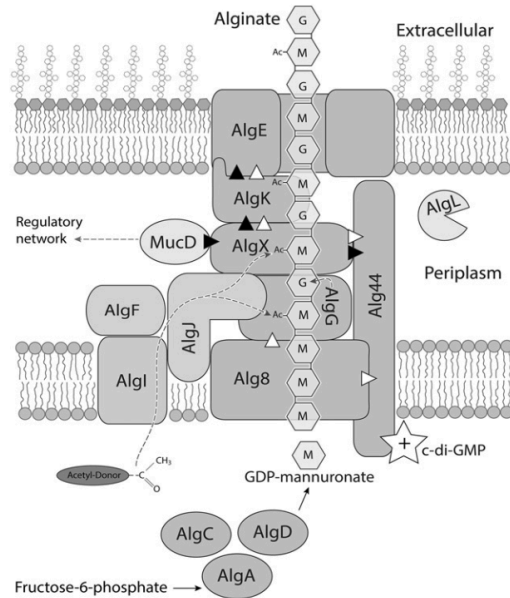


Fig 9 Polimerización/complejo de secreción, desde membrana interna hasta membrana externa. La acetilación por AlgI, AlgJ, AlgF y AlgX y su epimerización por AlgG se muestran con líneas punteadas (---). No queda claro si AlgJ, AlgX o ambos son responsables de la acetilación directa de la cadena de alginato. Interacciones deducidas se muestran con triángulos, con triángulos blancos (Δ) se indica una relación estable mutua y con triángulos negros (\blacktriangle) se representa una interacción directa como se demostró con datos de pull down. Tomado de (Hay I. D., 2013)

1.2.4 Genética de la síntesis de los alginatos

Los genes involucrados en la biosíntesis son virtualmente idénticos entre *Pseudomonas* y *Azotobacter* aunque su regulación es ligeramente diferente. Los genes que codifican para las enzimas en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* han sido todos identificados en su totalidad y se muestran en la Fig. 10. Con la excepción de *algC*, se encuentran formando parte de un único operón *algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A* (Galindo et al., 2007).

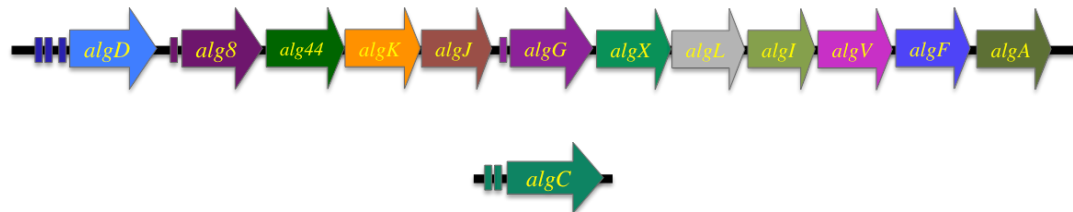


Fig 10 Organización de los genes de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. Tomado y modificado de (Galindo et al., 2007).

Se han identificado varios promotores transcribiendo este grupo de genes biosintéticos del alginato. El gen *algD* que codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa tiene tres promotores río arriba: *algDp1*, *algDp2* y *algDp3* (Campos et al., 1996), donde p1 es AlgU-dependiente y p2 es RpoS (σ^s)-dependiente (Castañeda et al., 2001).

A. vinelandii tiene tres promotores internos adicionales, un promotor σ^s situado río arriba de *alg8*, otro promotor río arriba de *algG* (control desconocido) y otro promotor río arriba de *algA* (control desconocido) (Campos et al., 1996; Lloret et al., 1996; Mejía et al., 1997; Vázquez et al., 1999).

El hecho de que varios de estos promotores se encuentren río arriba de genes responsables de la modificación del polímero (acetilación y epimerización) quizá sugiere que estos promotores internos están involucrados en la regulación del nivel o modificación del polímero (Hay et al., 2014).

La expresión de estos promotores está bajo el control de los dos componentes del sistema regulación global de doble componente GacS-GacA (Castañeda et al., 2000; Castañeda et al., 2001).

1.3 Regulación de la síntesis de los alginatos

1.3 .1 Sistemas de dos componentes

Los microorganismos unicelulares experimentan “una vida al borde de la supervivencia”, al tener poca habilidad para cambiar su ambiente y enfrentar la constante competencia por recursos limitados. Ante este constante bombardeo de todo tipo de moléculas en el medio, es necesario que monten una respuesta de manera rápida y precisa. Para ello, disponen de numerosos sistemas de señalización esenciales, para generar diversas respuestas adaptativas frente a estímulos ambientales específicos (Gao et al., 2007).

Estos eventos ocurren a nivel molecular, dilucidando los mecanismos de detección de señales extracelulares y transduciendo tales señales en un evento intracelular apropiado. Los mecanismos de transducción de señales en bacterias son muy diversos, oscilando desde sistemas reguladores formados por una única proteína hasta cascadas de señalización integradas por múltiples proteínas. En la mayoría de los casos, estas rutas de señalización involucran la fosforilación de proteínas efectoras clave por proteínas cinasas. La ruta más común en procariontes es un mecanismo de control de fosforilación denominado “Sistema de Dos Componentes”(Nixon et al., 1996; Parkinson et al., 1992).

Un sistema básico de dos componentes involucra rutas de señalización, formadas por una cinasa histidínica (HK) junto con su correspondiente regulador de respuesta (RR). Se generan respuestas mediante un proceso que normalmente implica un único evento de fosfotransferencia entre ambas proteínas. Estas rutas se emplean para la regulación de una

amplia variedad de funciones celulares que incluyen, entre otras, metabolismo, movilidad por quimiotaxis, transporte de nutrientes, adaptación a agentes de estrés, virulencia, diferenciación y desarrollo (Bekker et al., 2006).

1.3.1.2 El sistema de doble componente GacS/GacA

La cinasa histidínica GacS y el regulador de respuesta GacA forman parte de un sistema de dos componentes presente en una gran variedad de bacterias Gramnegativas y ha sido estudiado principalmente en *Enterobacterias* y *Pseudomonas*. El sistema GacS/GacA controla la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares involucradas en la patogenicidad de plantas y animales, biocontrol, tolerancia a estrés, etc. El modelo actual propone que GacS detecta una señal aún desconocida y activa, a través de un mecanismo de fosforelevo, al regulador transcripcional GacA, que a su vez desencadena la expresión de genes blanco (Heeb y Hass, 2001).

La proteína GacS pertenece a las cinasas sensoras que poseen un transmisor del fosforilo, un receptor y un dominio de salida histidín fosfotransferasa (Hpt) (Perraud et al., 2000). GacA, al igual que otros reguladores de respuesta, posee un motivo hélice-giro hélice involucrado en la unión a DNA. Se cree que el mayor efecto del sistema GacS/GacA sobre genes blanco es indirecto (Fig. 11)(Heeb y Hass, 2001).

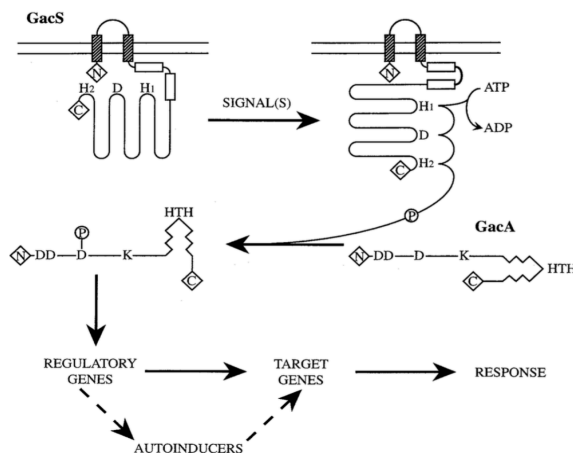


Fig 11 Modelo de la Ruta de Transducción de Señales mediada por el sistema de dos componentes GacS/GacA. Autofosforilación de GacS en el primer residuo conservado de histidina (H₁) disparado por una señal desconocida. Un grupo fosfato se transfiere por fosforelevo a un aspartato conservado y un residuo de histidina en un dominio D y H₂, respectivamente, de GacS. Un aspartato conservado en GacA actúa como un aceptor de fosfatos. El regulador de respuesta fosforilado GacA activa (o reprime) la transcripción de elementos reguladores no identificados que a su vez controlan la expresión de genes blanco, al menos en parte, a un nivel post-transcripcional. Tomado de (Heeb y Hass, 2001).

La expresión de ciertos genes, que se encuentra regulada por el sistema GacS/GacA, son regulados de forma paralela por la proteína de unión a los pequeños RNAs RsmA (CsrA) a un nivel postranscripcional. Esto sugiere que el sistema GacS/GacA opera como un interruptor entre metabolismo primario y secundario, con una participación importante de los mecanismos de control postranscripcional (Heeb y Hass, 2001). La secuencia de DNA reconocida por GacA y los genes directamente controlados por GacA siguen siendo objeto de estudio.

1.3.2 El sistema de regulación postranscripcional Rsm

Las bacterias han desarrollado mecanismos elaborados para detectar y responder a diversos cambios ambientales. En la mayoría de las especies, redes reguladoras globales modulan la expresión de genes que participan en numerosos procesos celulares en respuesta a demandas fisiológicas y ambientales (Gottesman,1984; Neidhart,1996). Estos efectos son mediados en gran parte a través de la activación y represión de la iniciación de la transcripción de mRNA por proteínas de unión a DNA, factores σ y sistemas de transducción de señal correspondientes. Los mecanismos de regulación postranscripcionales son también determinantes críticos para la expresión génica. Se ha identificado un sistema de regulación global llamado Csr (Carbon storage regulator), que actúa postranscripcionalmente (Liu et al., 1995; Liu et al., 1997).

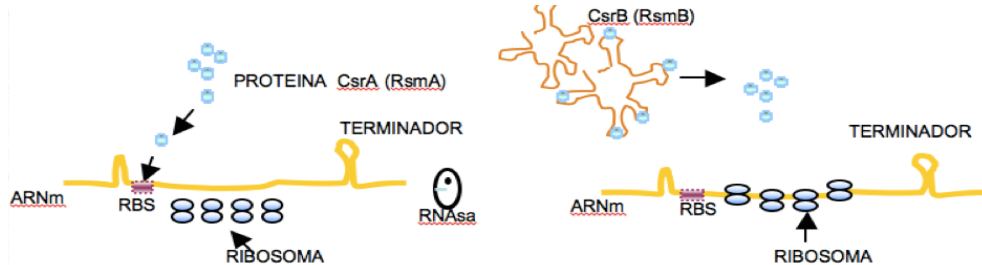


Fig 12 Mecanismo General del Sistema de Regulación Postranscripcional Csr/Rsm Modificado de (Romeo, 1998)

El sistema Csr/Rsm (Fig. 12) incluye dos componentes críticos CsrA/RsmA y CsrB. CsrA/RsmA es una proteína efectora de 61 aminoácidos que se relaciona con varias proteínas de unión a RNA (Romeo et al., 1993; Liu et al., 1995). CsrA impide la unión del RNA mensajero al ribosoma y facilita el decaimiento del transcrito (Liu et al., 1997). El segundo componente CsrB, es una molécula de RNA no codificante de aproximadamente 360 pb que forma un complejo globular con 18 polipéptidos de CsrA, antagonizando la actividad de la misma (Liu et al., 1997). CsrA reprime o activa la expresión de genes al desestabilizar o estabilizar mRNAs blanco, respectivamente (Liu et al., 1995; Wei et al., 2001).

Cada miembro de la familia CsrB de sRNAs posee múltiples secuencias con el motivo GGA. Estas secuencias repetidas se encuentran de manera típica en las asas de las horquillas de los pequeños RNAs. Estas secuencias funcionan como sitios de unión a CsrA o RsmA. Así pues los sRNAs tienen su actividad al secuestrar a los dímeros de CsrA, de este modo evitan la interacción de los homólogos de CsrA con sus RNAs mensajeros (Babitzke et al., 2007).

II ANTECEDENTES

2.1 La ruta de transducción de señales Gac/Rsm

En *Pseudomonas*, los pequeños RNAs que se unen a proteínas RsmA/CsrA son típicamente producidos bajo el control positivo de sistemas de dos componentes, GacS/GacA (por Global Activation of Antibiotic and Cyanide Synthesis). Otras γ -proteobacterias también tienen homólogos GacS/GacA (Lapouge et al., 2008). En *A. vinelandii*, el sistema GacS/GacA se encuentra relacionado principalmente con los fenotipos que involucran producción de alginato, poli- β -hidroxibutirato y enquistamiento (Castañeda et al., 2001).

Las características generales de la ruta de transducción de señales se muestran en la Fig. 13. Los genes blanco regulados a nivel traduccional por esta cascada de regulación, varían considerablemente entre los sistemas homólogos encontrados en diferentes bacterias. Sin embargo se conservan dos características: en general, las mutaciones que bloquean esta ruta de regulación se ven afectadas en su comportamiento social y parece ser que existe una base molecular común en la interacción del RNA con la proteína RsmA/CsrA (Lapouge et al., 2008).

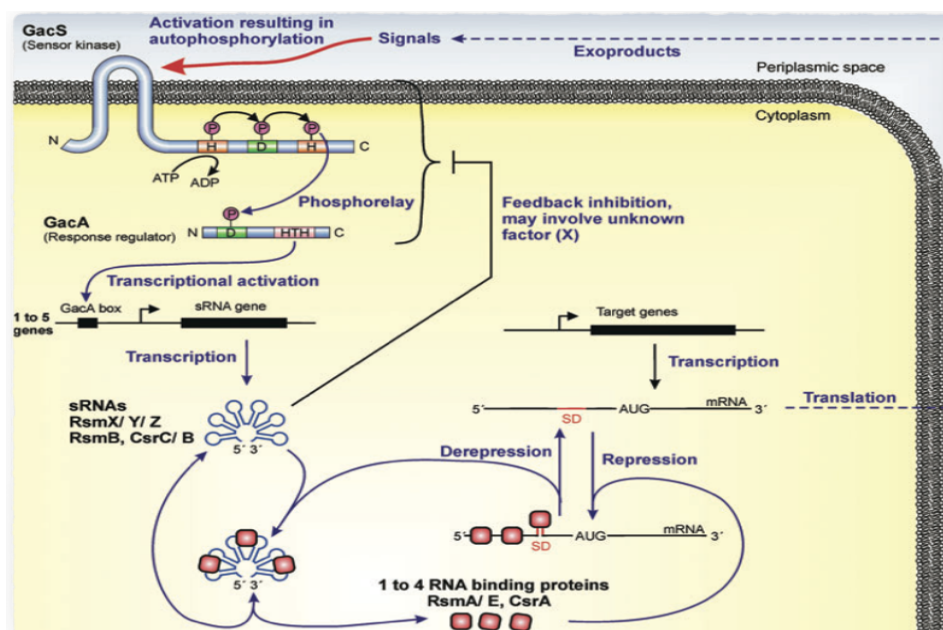


Fig 13 Características generales de la Ruta de Transducción de Señales Gac/Rsm en γ -proteobacterias. \downarrow efecto positivo, L efecto negativo, línea punteada: bucle de retroalimentación positiva, X componente hipotético desconocido. Tomado de (Lapouge et al., 2008)

La relación entre el sistema de dos componentes GacS/GacA y el regulador postranscripcional RsmA/CsrA junto con los sRNAs antagonistas fue observada originalmente en *P. fluorescens* (Blumer et al., 1999; Aarons et al., 2000).

Tras la activación, el sistema de dos componentes GacS/GacA promueve la transcripción de los genes de sRNA denominados *csrB*, *csrC* (enterobacterias), *rsmB* (*E. carotovora*) y *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* (en *Pseudomonas* y bacterias relacionadas) (Lapouge et al., 2008). Cuando el regulador de respuesta GacA está activado (fosforilado), se cree que se une a sitios conservados río arriba denominados caja GacA (consenso TGTAAGN₆CTTACA) en los promotores de los genes de los pequeños RNAs antes mencionados (Valverde et al., 2004; Lenz et al., 2005; Kay et al., 2005; Kulkarni et al., 2006). Al transcribir los pequeños RNAs, la ruta de transducción de señales Gac/Rsm aumenta la producción de numerosas proteínas cuya producción es reprimida por las proteínas RsmA/CsrA (Lapouge et al., 2008).

Análisis de los transcriptomas de mutantes *gacA*, *rsmY* y *rsmZ* en *P. aeruginosa*, sugirieron que el sistema GacS/GacA controla sus genes blanco exclusivamente a través del sistema Rsm (Brencic et al., 2009).

Para buscar homólogos a *rsmZ* y *rsmA* en la secuencia del genoma de la cepa DJ en *A. vinelandii* (Setubal et al., b 2009) y debido a la cercanía filogenética entre *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Rediers et al., 2004; Setubal et al., 2009) se utilizaron a los genes *rsmZ* y *rsmA* de *P. fluorescens* como patrón de búsqueda. Al encontrarse homólogos, se presumía la existencia de un sistema Rsm en *A. vinelandii*, compuesto por una proteína RsmA y nueve homólogos sRNAs, siete pertenecientes a la familia RsmZ y dos a la familia RsmY (Manzo et al., 2011).

2.1.1 Regulación postranscripcional por el sistema Gac/Rsm en *A. vinelandii*

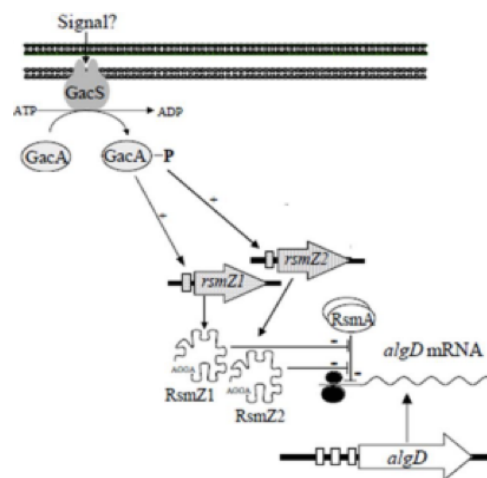


Fig 14 Modelo de la Activación Transcripcional de *rsmZ1* y *rsmZ2* en *A. vinelandii*. (Manzo et al., 2011).

Al estudiar los genes que codifican para los pequeños RNAs del sistema Rsm de *A. vinelandii* se identificaron cajas putativas GacA río arriba de *rsmZ1* y *rsmZ2* y se demostró que GacA se requiere para su transcripción. Adicionalmente las cajas de Gac fueron identificadas en las regiones promotoras de todos los genes *rsm* de los sRNAs, excepto *rsmY2*, sugiriendo que la expresión de estos genes está bajo el control de GacA (Manzo et al., 2011).

Mutantes *gacA* en *A. vinelandii* son incapaces de producir alginato (Castañeda et al., 2001). La inactivación de *rsmZ1*, *rsmZ2* o ambos, reduce la producción de alginato en un 80%. De igual manera, la expresión del gen *rsmZ1* desde un promotor constitutivo restaura la biosíntesis de alginato en una mutante *gacA* (Figura 15). Estos datos indicaron que GacA, RsmZ1 y RsmZ2 formaban parte de una cascada que controla la síntesis de alginato (Fig. 14) (Manzo et al., 2011).

En contraste a la mutante *gacA* que es incapaz de producir alginato, las mutantes en *rsmZ1*, *rsmZ2* o la doble mutante *rsmZ1-Z2* producen el polímero aunque sea en un nivel muy bajo. Esto podría atribuirse a la presencia de los siete genes adicionales de la familia *rsmZ/Y* (Manzo et al., 2011).

Strain	Genotype	Alginate production, $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein [†]
AEIV	wild-type	1,147 \pm 89
AEIV <i>rsmZ1</i>	<i>RsmZ1::Km</i>	250 \pm 18
AEIV <i>rsmZ1/pCV2</i>	<i>RsmZ1::Km/rsmZ1⁺</i>	840 \pm 65
AEIV <i>rsmZ2</i>	<i>RsmZ2::Gm</i>	315 \pm 43
AEIV <i>rsmZ1rsmZ2</i>	<i>RsmZ1::Km,rsmZ2::Gm</i>	230 \pm 28
AEIV <i>gacA</i>	<i>gacA::Gm</i>	≤ 0.01
AEIV <i>gacA/pMM2</i>	<i>gacA::Gm/rsmZ1⁺</i>	720 \pm 83
AEIV/pMCY2	AEIV/ <i>rsmA⁺</i>	200 \pm 15

Fig 15 Tabla de la Producción de alginato en cepas de *A. vinelandii*. Tomado de (Manzo et al., 2011)

2.1.2 Regulación de la expresión de *algD* por el sistema GacS/GacA

La cinasa histidínica GacS controla la producción de alginato en *A. vinelandii*. La transcripción de *algD* en mutantes *gacS* se reduce significativamente durante la fase exponencial y se abate en fase estacionaria (Castañeda et al., 2000). La regulación de la síntesis del alginato por GacS durante la fase estacionaria es ejecutada sobre la transcripción de *algD* desde sus tres promotores (Fig. 16) (Castañeda et al., 2000).

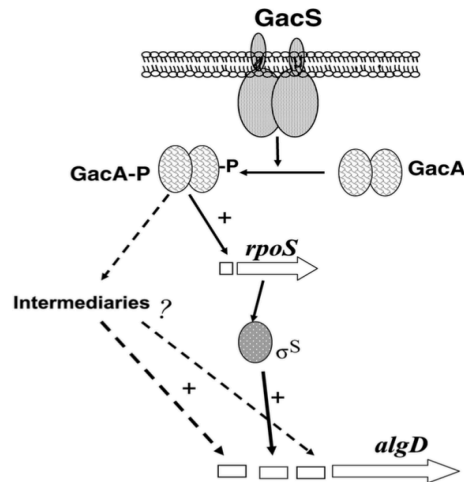


Fig 16 Modelo de Regulación de la expresión de *algD* por el regulador global GacA y σ^S . Tomado de (Castañeda et al., 2001).

El rol de GacS como regulador positivo de la síntesis del polímero y dado que el regulador de respuesta es GacA, suponía que al igual que GacS, GacA podría actuar como regulador positivo de la síntesis de alginato.

Una mutación en *gacA* abroga la transcripción de *algD* y *rpoS*, indicando el rol predominante de GacA en la cascada de regulación que controla la expresión de genes en fase estacionaria y la producción de alginato en *A. vinelandii* (Castañeda et al., 2001).

El hecho de que el sistema GacS/GacA sea esencial para la activación de los tres promotores de *algD* durante la fase estacionaria, sugería que el control de la síntesis de alginato era en cierta medida dependiente de la fase de crecimiento. GacA y σ^S participan en la misma cascada reguladora y GacA funciona río arriba de σ^S (Castañeda et al., 2001).

De tal manera que, GacA media la transducción de señales entre GacS y la activación del promotor *rpoS*; sucesivamente σ^S interviene en la activación del promotor *algD* por GacA (Castañeda et al., 2001).

Por otro lado, se ha establecido de manera *in vitro* que existe interacción entre RsmA y la región 5' del gen *algD*. La predicción de un sitio de unión a RsmA en la región reguladora del gen *algD* (*RRalgD*) se realizó buscando la presencia de sitios consenso de unión a CsrA. En la Fig. 17 se muestra la presencia de la secuencia consenso GGA en los sitios de unión a CsrA localizados en la *RRalgD*. De igual manera, se presenta el análisis de movilidad en gel, en el que se estableció la unión de RsmA con la *RRalgD*. Los datos obtenidos, junto con la presencia de un sitio putativo de unión a RsmA en la región Shine-Dalgarno, sugieren fuertemente que el sistema Gac-Rsm regula de manera postranscripcional a *algD* (Manzo et al., 2011).

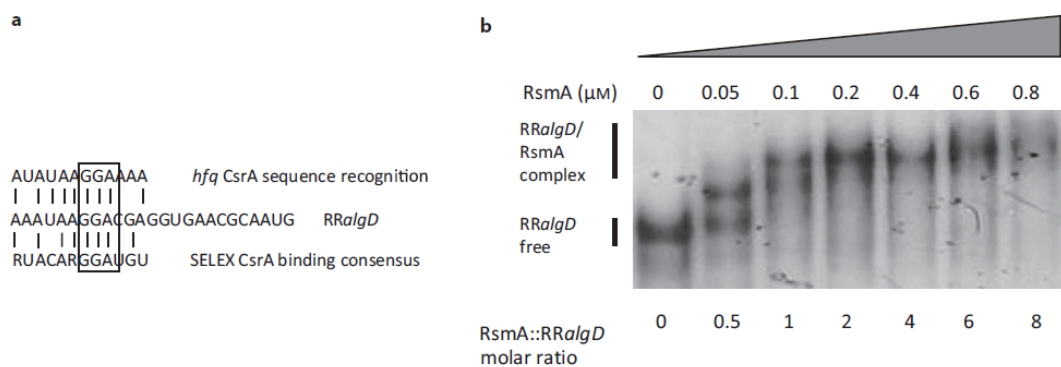


Fig 17 Interacción de RsmA con la región reguladora de *algD*. a) Sitios de unión a RsmA predichos en la región reguladora de *algD* (*RAlgD*), b) Análisis de Movilidad en gel de ARN que muestra la unión de RsmA a la *RAlgD*. Tomado y modificado de (Manzo et al., 2011)

2.2 Esencialidad condicional de CsrA/RsmA

El gen *csrA* en *Escherichia coli* codifica para un regulador global que controla una gran variedad de procesos biológicos. CsrA regula la expresión de genes tanto positiva como negativamente a nivel postranscripcional al modular la traducción (Babitzke et al., 2007; Baker et al., 2002; Dubey et al., 2003).

La unión de CsrA a la región líder del mRNA blanco bloquea la unión del ribosoma a la secuencia Shine-Dalgarno (Babitzke et al., 2007; Baket et al., 2002; Wang et al., 2005), y lo más probable es que propicie su rápida degradación (Liu et al., 1995). Como regulador positivo, CsrA mejora la eficiencia de traducción al estabilizar a sus mRNAs blancos (Wei et al., 2001).

En *E. coli* CsrA controla el flujo intracelular de carbono por una regulación positiva que ejerce sobre la glucólisis, pero al mismo tiempo regula negativamente la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno. Por lo tanto, en ausencia de CsrA la síntesis de glucógeno es fuertemente favorecida, lo cual genera un estrés metabólico en la bacteria que la hace perder viabilidad. Tal como se muestra en la Fig. 18, al crecer mutantes *csrA* en glucosa y/o fructuosa-6-fosfato como única fuente de carbón no se mostró crecimiento. Sin embargo, creció cuando la fuente de carbono era piruvato. Esto muestra que al crecer a la bacteria en fuentes de carbono glucolíticas, el flujo de carbono se direcciona hacia la síntesis de glucógeno, disminuyendo de esta manera la glucólisis y el ciclo de Krebs. Para superar esta condicionalidad, se generaron mutantes incapaces de sintetizar glucógeno (mutantes en el gen *glgC*) las cuales fueron capaces de soportar sin mayor problema la mutación nula en *csrA* (Timmermans et al., 2009).

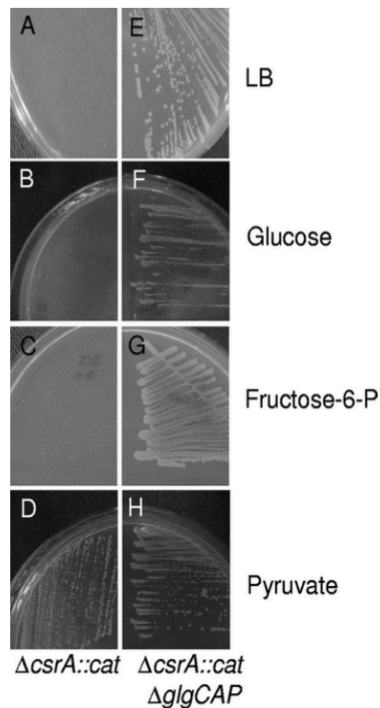


Fig 18 La acumulación excesiva de glucógeno en mutante $\Delta csrA::cat$ perjudica la viabilidad en fuentes de carbono glucolíticas. La mutante $\Delta csrA::cat$ (**panel izquierdo**) y la mutante $\Delta csrA::cat \Delta glgCAP$ (**panel derecho**) Ambas mutantes con un plásmido pWSK-*csrA* fueron estriadas con IPTG en LB (A y E) o en medio mínimo con aminoácidos, con glucosa (B y F), fructuosa-6-fosfato (C y G), o piruvato (D y H) como únicas fuentes de carbono. Tomado de (Timmermans et al., 2009)

2.3 Mutantes *rsmA*

En muchas especies bacterianas, es muy difícil generar mutantes de *rsmA* (*csrA*), ya que presentan fuertes agregaciones de célula-célula y/o un crecimiento muy lento (Romeo *et al.*, 1993; Lawhon *et al.*, 2003; Molofsky and Swanson, 2003). En *P. aeruginosa* la mutación de *rsmA* resulta en un fenotipo de colonias pequeñas (Heurlier *et al.*, 2005).

En *E. coli* el gen *csrA* se identificó mediante mutagénesis al azar con transposones. La inserción del transposon en el codón 51 (Timmermans et al., 2009), permitió obtener una mutante viable en cualquier fuente de carbono, dejando ver la posibilidad de que los primeros 50 aminoácidos mantuvieron una actividad parcial. La generación de un péptido CsrA₁₋₅₀ restauró el crecimiento de mutante nulas *csrA* en fuentes de carbono glucolíticas. *A. vinelandii* no ha sido la excepción, también se han presentado dificultades para obtener mutantes nulas en *rsmA* sobre todo en la cepa E productora de alginato (Fig. 19).

La poliploidía ha propiciado la obtención de mutantes merodiploides donde la mutación no se logra segregarse a todos los cromosomas (Morales, 2013). De tal manera que la bacteria conserva tanto el alelo silvestre como el alelo que presenta la mutación.

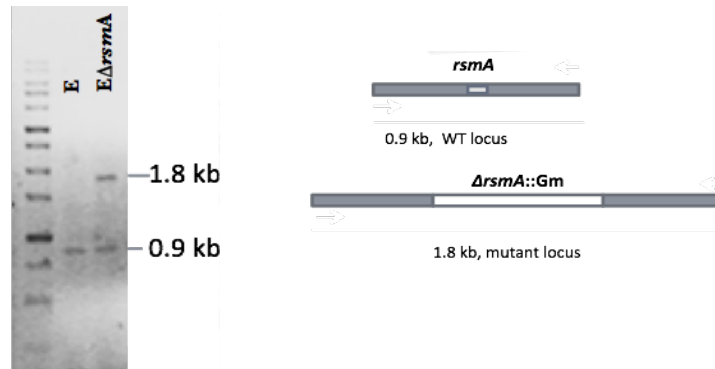


Fig 19 Merodiploidía al intentar obtener una mutante nula *rsmA* en *Azotobacter vinelandii* Cepa E. En la cepa silvestre se presenta el alelo nativo *rsmA* (0.9 kb), mientras que en la cepa con la mutación en *rsmA* ($\Delta rsmA::Gm$) se presenta el alelo silvestre (0.9 kb) y el alelo que porta la mutación (1.8 kb). Tomado de (Morales, 2013)

Ante lo anteriormente discutido, se planteó la posibilidad de que el alginato jugara un papel semejante al glucógeno en *E. coli*, por lo que se mutó el gen *rsmA* en un fondo genético no productor de alginato. Para ello, se trabajó con la mutante JGDE, una derivada de la cepa E con una mutación por inserción en el gen *algD*. De manera interesante al mutar a *rsmA* por remoción, tanto parcial como total, la mutante JGDE recuperó su capacidad de producir alginato (Fig. 20). La inserción del casete de resistencia a Km en la mutante JGDE se localiza a la mitad de los subdominios catalíticos pudiendo dejar una proteína parcialmente funcional. De esta forma, al mutar a *rsmA* una probable sobreexpresión del gen *algD::Km* compensaría su función defectiva haciendo posible nuevamente la producción del polímero (Morales, 2013).

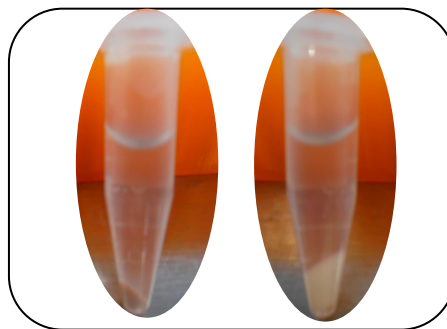


Fig 20 Fenotipo Mucoide de la Cepa JGDE y JGDEΔ*rsmA*. Izquierda JGDE , Derecha JGDEΔ*rsmA*. Tomado (Morales, 2013).

Posteriormente se construyó una mutante en el gen *algD*, en el que se removió su centro catalítico y se sustituyó por un casete que confiere resistencia a Km. En esta mutante sí fue posible mutar al gen *rsmA* sin restaurar la síntesis de alginato, lo cual indirectamente apoya la hipótesis de que la enzima con actividad parcial (*algD*) en la mutante JGDE original se activa por sobre-expresión. De manera interesante en esta mutante fue posible obtener cepas con la mutación de *rsmA* completamente segregada (Fig.21).

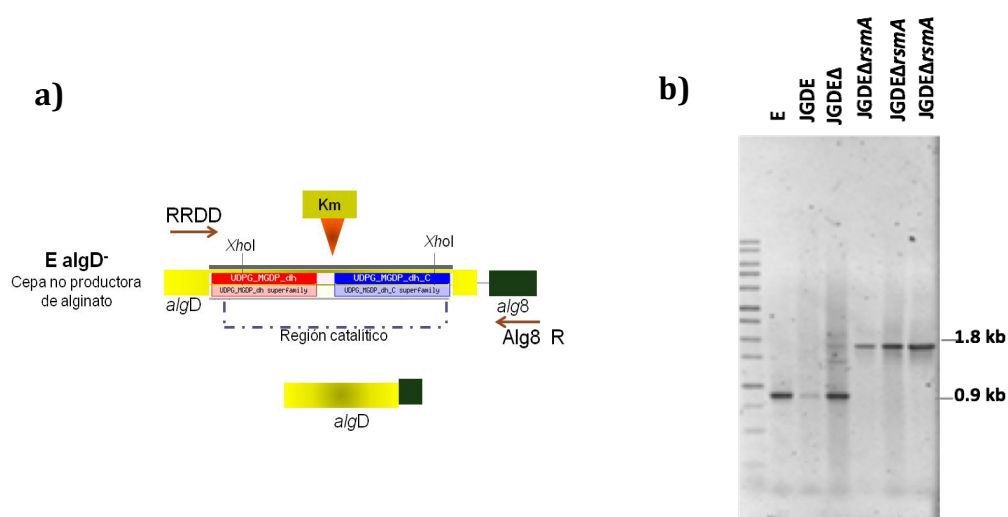


Fig 21 Obtención de mutante nula en *rsmA*. a)Esquema de la Cepa JGED. Sustitución de la región catalítica de *algD* por un casete de Km. b)Obtención de la mutante nula *rsmA* en la cepa JGDE. Se muestra el alelo silvestre *rsmA* en la cepa E y JGDE (0.9 kb) y la mutante nula en *rsmA* en la cepa JGDE (alelo mutante 1.8kb). Tomado (Morales, 2013)

En trabajos anteriores se reportó la dificultad de obtener mutantes nulas del gen *rsmA* en un fondo genético productor de alginato (Cocotl, 2007; Morales, 2013). Morales en 2013, logró obtener una mutante nula en *rsmA* en un fondo no productor de alginato (mutante en gen *algD*), mientras que la sobreexpresión del gen *rsmA* en la cepa silvestre E de *A. vinelandii* presenta una disminución en la producción de alginato (Cocotl, 2007). Estos datos ubican a RsmA como un regulador importante de la producción de alginato.

Aunado a esto, la interacción *in vitro* de RsmA con la región 5' de *algD* apuntaban a que el efecto regulador de RsmA sobre la producción de alginato, se establecía a nivel postranscripcional directamente sobre la expresión de *algD*. Sin embargo, las evidencias generadas hasta ese momento fueron obtenidas por experimentos *in vitro*, haciendo falta pruebas *in vivo* que nos permitieran probar fehacientemente la aseveración anterior.

III HIPÓTESIS

RsmA regula post-transcripcionalmente la expresión del gen *algD*

IV JUSTIFICACIÓN

La cascada de regulación GacS/A – RsmA/B parece ser una vía de regulación común al menos en bacterias de la subdivisión γ . El conocimiento generado contribuirá a mejorar la comprensión de la cascada de regulación, de manera general, en esta subdivisión bacteriana y de forma particular en *A. vinelandii*. Por otra parte dará nuevos elementos que permitirán entender de mejor manera la regulación de la producción de alginato y PHB en *A. vinelandii*.

El estudio del sistema Rsm puede ayudarnos a entender qué transcritos están siendo regulados a través de la proteína represora RsmA. La producción de alginatos y PHB es de gran interés biotecnológico y el estudio de los mecanismos implicados en la regulación de la producción de estos polímeros proporcionará conocimiento que tendrá impacto sobre las estrategias para impulsar su producción.

V OBJETIVOS

5.1 General

Estudiar el efecto regulador que ejerce RsmA sobre el gen *algD* involucrado en la producción de alginato en *A. vinelandii*.

5.2 Particulares

- ✓ Generar fusiones transcripcionales y traduccionales del gen *algD*.
- ✓ Determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *rsmA* en la expresión del gen *algD*.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y material biológico

Modelo de estudio: *A. vinelandii*

Todas las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio mínimo Burk-Sacarosa (BS), a una temperatura de 30°C por 48 horas y en el caso de cultivos líquidos a 200 rpm, permitiendo una aireación en una relación 1:5. Las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron en una relación 1µl de antibiótico por ml de medio cultivo, es decir al 0.1%.

CEPA	CARACTERÍSTICAS	RESISTENCIA	Referencia
E	Fondo Silvestre	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml	
EgT	Cepa E recombinante, que porta en el locus <i>mela</i> el gen reportero <i>gusA</i> transcripcional.	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Tetraciclina 40 mg/ml	
<i>EalgD::Gm gusAT</i>	Recombinante de la cepa E, porta la fusión transcripcional <i>gusAT</i> (propio ATG y Shine Dalgarno), al término de la región promotora de <i>algD</i> . La cepa es no mucoide debido a la mutación en <i>algD</i> .	Resistencia Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Gentamicina 1.5 mg/ml (medio sólido) y 0.3 mg/ml (medio líquido)	Este trabajo
<i>EalgD::Gm gusAPT</i>	Fusión Traduccional <i>gusAPT</i> (no tiene ATG ni Shine Dalgarno), recombinada al término de la región reguladora del gen <i>algD</i> . La cepa es no mucoide por la mutación generada en <i>algD</i> .	Resistencia Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Gentamicina 1.5 mg/ml (medio sólido) y 0.3 mg/ml (medio líquido)	Este trabajo
<i>EalgD::Gm gusAT pKT 230</i>	Transconjugante de la cepa <i>EalgD::Gm gusAT</i> (fusión transcripcional), que porta el plásmido pKT 230. El mantenimiento del plásmido en la cepa es inestable, y la cepa se utilizó como control negativo	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Gentamicina 1.5 mg/ml (medio sólido) y 0.4 mg/ml (medio líquido) Estreptomycinina 8 mg/ml Kanamycinina 8 mg/ml	Este trabajo
<i>EalgD::Gm gusAPT pKT 230</i>	Cepa transconjugante de la fusión traduccional <i>EalgD::Gm gusAPT</i> , que mantiene el plásmido pKT 230. El mantenimiento del plásmido en la cepa es inestable, y esta cepa fue utilizada como control negativo.	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Gentamicina 1.5 mg/ml (medio sólido) y 0.4 mg/ml (medio líquido) Estreptomycinina 8 mg/ml Kanamycinina 8 mg/ml	Este trabajo
<i>EalgD::Gm gusAT pMCY2</i>	Fusión Transcripcional <i>EalgD::Gm gusAT</i> , que porta el plásmido pKT 0.3 <i>rsmA</i> . El mantenimiento del plásmido en la cepa es inestable.	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Gentamicina 1.5 mg/ml (medio sólido) y 0.4 mg/ml (medio líquido) Estreptomycinina 8 mg/ml	Este trabajo
<i>EalgD::Gm gusAPT pMCY2</i>	Transconjugante de la Cepa <i>EalgD::Gm gusAPT</i> (fusión traduccional), porta el plásmido pKT 0.3 <i>rsmA</i> . El mantenimiento del plásmido en la cepa es inestable.	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml Gentamicina 1.5 mg/ml (medio sólido) y 0.4 mg/ml (medio líquido) Estreptomycinina 8 mg/ml	Este trabajo

***E. coli* : mantenimiento y propagación de plásmidos**

La bacteria *E. coli* se utilizó para realizar la manipulación genética necesaria para la construcción de plásmidos, así como para mantener los plásmidos. Las condiciones de cultivo fueron en medio LB, a 37°C , en un período de 12 a 14 h y en medio líquido a 200 rpm, con una relación de aireación de 1:5.

CEPA	CARACTERÍSTICAS	Resistencia
DH5α <i>gusA</i> ⁻	<i>EndA1 hsdR17 supE44 thi-1λ- recA1 gyrA96 relAΔlacU169φ80 (ΔlacZ ΔM15)</i>	Ac. Nalidíxico 10 mg/ml
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lac^rZAM15Tn10 (Tet^r)).</i> Cepa transformable a eficiencias altas y deficiente en sistemas de recombinación homóloga. F' permite selección colonias blancas/azules en XGal.	Tetraciclina 20 mg/ml
DH5α (pRK2013)	Contiene plásmido helper pRK2013, que provee genes <i>tra</i> y <i>mob</i> necesarios para transferencia de ADN clonado en plásmido puTn mini Tn5, desde célula carente de estos.	Kanamicina 20 mg/ml

VECTORES COMERCIALES

Vector	Características	Resistencia	Referencia
pGem-T Easy	Vector de clonación para productos de PCR	Ampicilina 100 mg/ml	Promega
pUC19	Vector de clonación de alto número de copias	Ampicilina 100 mg/ml	Invitrogen

PLÁSMIDOS

Plásmido	Características	Resistencia	Referencia
pUMA Tc <i>gusAT</i>	Plásmido integrativo en el locus <i>mela</i> de <i>A. vinelandii</i> , que porta el gen reportero <i>gusA</i> transcripcional.	Ampicilina 100 mg/ml Tetraciclina 20 mg/ml	(Castañeda,2012)
pUMA Tc <i>gusAPT</i>	Plásmido integrativo en el locus <i>mela</i> a del cromosoma de <i>A. vinelandii</i> , que porta el gen reportero <i>gusAPT</i> .	Ampicilina 100 mg/ml Tetraciclina 20 mg/ml	(Morales Ruiz, 2013)

pKT 230	Derivado del plásmido de amplio rango de hospedero RSF1010, de alto número de copias	Kanamicina 20 mg/ml Estreptomicina 20 mg/ml	(Bagdasarian, 1981)
pMCY2	Derivado del plásmido pKT 230, que porta el ORF de <i>rsmA</i> bajo el promotor de Kanamicina. Se generó una interrupción en el casete de Km al término de la región promotora	Estreptomicina 20 mg/ml	(Cocotl, 2007)
pGEM <i>algD</i>	Derivado del Vector pGem T easy, tiene clonada la región reguladora del gen <i>algD</i> y parte del gen aledaño <i>alg8</i> .	Ampicilina 100 mg/ml	(Morales, 2013)
pUMA Tc- <i>gusAT</i> -Gm	Generación del interposón <i>gusAT</i> -Gm. Derivado del plásmido pUMA Tc <i>gusAT</i> , al que se insertó el casete de resistencia a Gentamicina.	Ampicilina 100 mg/ml Tetraciclina 20 mg/ml Gentamicina 10 mg/ml	Este trabajo
pUMA Tc- <i>gusAPT</i> -Gm	Generación del interposón <i>gusAPT</i> -Gm. Derivado de pUMA Tc <i>gusAPT</i> , se clonó el casete de resistencia a Gentamicina.	Ampicilina 100 mg/ml Tetraciclina 20 mg/ml Gentamicina 10 mg/ml	Este trabajo
pGEM <i>algD gusAT</i> -Gm	Derivado de pGEM <i>algD</i> , se interrumpió el gen <i>algD</i> al término de la región reguladora por la inserción del gen reportero <i>gusA</i> transcripcional.	Gentamicina 10 mg/ml	Este trabajo
pGEM <i>gusAPT</i> -Gm	Derivado del plásmido pGEM <i>algD</i> , con una interrupción de <i>algD</i> al término de la región reguladora por la inserción del gen reportero <i>gusAPT</i> .	Gentamicina 10 mg/ml	Este trabajo

6.2 Medios de cultivo

Medio Luria Bertani (LB)

Fórmula	Cantidad (g/l)
Cloruro de Sodio (NaCl)	5.0
Extracto de Levadura	5.0
Peptona de Caseína	10.0
Agar Agua*	15.0

*Se adiciona en caso de prepara medio sólido

Medio Mínimo Burk-Sacarosa (BS)

Fórmula	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 también

Agar bacteriológico	15.0
---------------------	------

Ajustar a pH de 7.2

Medio de Competencia (CM)

Fórmula	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 también

Agar bacteriológico	15.0
---------------------	------

Ajustar a pH de 7.2

6.3 Técnicas empleadas

EXTRACCIÓN DNA PLASMÍDICO MINIPREP

Extracción por Perclorato

1. Inocular 3 ml de LB líquido con antibiótico con la cepa de interés.
2. Incubar a 37°C y 200 rpm durante un tiempo aproximado de 14 horas.
3. Centrifugar el medio de cultivo y decantar para recuperar la pastilla celular.
4. Lavar la pastilla con un 1 ml de MgSO₄ 10 mM.
5. Adicionar a la pastilla celular 175 µl de TES y vortexear hasta resuspender las células.
6. Adicionar 25 µl de solución de lisozima (10 mg/ml) y mezclar por inversión suavemente.
7. Mantener en hielo por 20 minutos.
8. Agregar 400 µl de agua tridestilada helada.
9. Incubar a 73°C durante 15 minutos.
10. Dejar enfriar durante 5 min en hielo.
11. Centrifugar 15 minutos a 13 000 rpm.
12. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
13. Adicionar 60 µl de NaClO₄ y 600 µl de isopropanol.
14. Reposar en hielo durante 5 minutos.

15. Centrifugar 15 minutos a 13 000 rpm.
16. Lavar el pellet con etanol 70% (500 μ l, 3X).
17. Secar completamente la pastilla a 37°C y resuspender en 30 μ l de RNAsa.
18. Incubar a 37°C durante uno hora.

Extracción por Lisis Alcalina

1. Inocular 3 ml de LB líquido con antibiótico con la cepa de interés.
2. Incubar a 37°C y 200 rpm durante un tiempo aproximado de 14 horas.
3. Centrifugar el medio de cultivo y decantar el medio para recuperar la pastilla celular.
4. Lavar la pastilla con un 1 ml de MgSO₄ 10 mM.
5. Adicionar 100 μ l de Solución I y resuspender completamente.
6. Adicionar 200 μ l de Solución II (preparada al momento 80% H₂O, 10% NaOH 2N, 10% SDS).
7. Mezclar muy suavemente por inversión y dejar en reposo en hielo por 10 minutos.
8. Adicionar 150 μ l de Solución III.
9. Reposo en hielo durante 10 minutos.
10. Centrifugar durante 15 minutos a 13 000 rpm.
11. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
12. Adicionar 10 μ l de sílica y 500 μ l de NaI.
13. Reposo durante 15 minutos.
14. Centrifugar 2 minutos.
15. Lavar el pellet con New Wash (500 μ l, 3X).
16. Secar completamente a 37°C y resuspender en 30 μ l de solución RNAsa.
17. Incubar durante una hora.
18. Centrifugar y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.

EXTRACCIÓN DNA PLASMÍDICO MAXIPREP

1. Partir de un cultivo de 40 ml.
2. Bajar células y lavar con 5 ml de MgSO₄.
3. Resuspender completamente en 1.5 ml de Solución I.
4. Agregar 3.5 ml de Solución II y mezclar lentamente por inversión.
5. Se deja durante 10 minutos en hielo.
6. Se agregan 2.5 ml de Solución III y se mezcla suavemente.
7. Dejar en reposo durante 10 minutos.
8. Centrifugar por 10 minutos a 6 000 rpm.
9. Transferir cuidadosamente con una punta el sobrenadante a tubos limpios.
10. Adicionar 5 ml de isopropanol.

11. Mantener en hielo durante 10 minutos.
12. Centrifugar a 6 000 rpm durante 10 minutos.
13. Decantar el sobrenadante.
14. Lavar la pastilla con etanol con etanol al 70% (3X, 2 a 3 ml).
15. Secar completamente a 37°C y adicionar 200 µl de RNAsa.
16. Incubar a 37°C hasta eliminar por completo RNA.

EXTRACCIÓN DNA CROMOSOMAL DE *A. vinelandii*

1. Hacer un cultivo de *A. vinelandii* en 25 ml de BS con el antibiótico correspondiente.
2. Incubar a 30°C y 200 rpm durante 48 horas.
3. Bajar las células de un ml de cultivo aproximadamente.
4. Lavar las células con MgSO₄ hasta eliminar completamente el alginato.
5. Resuspender completamente en 450 µl de buffer TE 50/20 (Tris/EDTA).
6. Agregar 50 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubar 30'/37°C.
7. Adicionar 50 µl de proteasa (10 mg/ml) en incubar 30'/37°C.
*Se pueden adicionar juntas la lisozima y la proteasa y dejar incubando una hora.
8. Agregar 50 µl de SDS 10% e incubar 15'/37°C (tiempo necesario hasta que se observe una solución turbia y viscosa).
9. Agregar 100 µl de NaCl 5M. Mezclar e incubar 10'/65°C.
10. Agregar 80 µl de CTAB 10% NaCl 0.7 M e incubar de 15-20 minutos a 65°C.
*Incubar previamente el CTAB a 65°C antes de utilizarla.
11. Extraer una vez con un volumen de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, vortexear y centrifugar por 5 minutos.
12. Recuperar el sobrenadante (con cuidado y con una punta pasar el sobrenadante a un tubo nuevo).
13. Agregar 10 µl de sílica y dejar en reposo durante 10 minutos.
14. Centrifugar durante 2 minutos a 13 000 rpm.
15. Lavar la pastilla con New Wash (3X, 500 µl).
16. Secar la pastilla completamente a 37°C.
17. Resuspender en 50 µl de RNAsa e incubar durante 1 hora a 37°C.
18. Centrifugar y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.

TRANSFORMACIÓN DE *A. vinelandii*

1. Mezclar en un tubo Eppendorf 200 µl de células competentes y 10-20µg de DNA plasmídico (MaxiPrep) y mezclar completamente.
2. En una placa chica de CM se vierte toda la mezcla en el centro y con cuidado se expande un poco en la placa.

3. Dejar secar completamente a temperatura ambiente.
4. Incubar durante 48 horas a 30°C.
5. Recolectar el tapete celular con cuidado de no tomar agar de la placa.
6. Colocar en un tubo eppendorf y adicionar 1 ml d MgSO₄.
7. Vortexear hasta resuspender completamente el tapete celular.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 13 000 rpm.
9. Retirar el sobrenadante y el alginato. Hacer lavados hasta obtener solo el paquete celular.
10. La pastilla celular se resuspende en MgSO₄ o medio BS líquido de acuerdo a la cantidad de células.
11. Plaquear con perlas de vidrio las células resuspendidas en una placa de BS con el antibiótico que nos permitirá seleccionar posibles recombinantes.
12. Dejar secar completamente.
13. Incubar durante 48 horas a 30°C.
14. Seleccionar posibles candidatas.

PREPARACIÓN DE CELULAS COMPETENTES *A. vinelandii*

1. De una placa fresca BS con la cepa que se desea transformar se cultiva una placa CM. Incubar por 48 horas a 30°C (1° Pase).
2. Realizar un segundo pase a una placa de CM, cultivando sobre toda la superficie de la placa (masivo). Incubar por 48 horas a 30°C.
3. Recoger todo el tapete celular y pasarlo a 25 ml de medio CM líquido. Incubar durante 24 horas a 30°C.
4. Bajar células de todo el cultivo celular y lavar con MgSO₄ 10 mM (asegurarse de eliminar todo el alginato).
5. De acuerdo al tamaño de la pastilla celular resuspender en 1 ml de medio (840 µl de CM líquido y 160 µl de MgSO₄ 0.1 M).
*Aproximadamente salen 2 ml de células competentes.

Protocolo corto

1. A partir de una placa fresca de medio BS sólido subcultivar la cepa *A. vinelandii* en medio CM sólido. Incubando durante 48 horas a 30°C.
2. De este cultivo sembrar una placa de CM en toda su superficie con asa. Incubar a 30°C por 12-15 horas.
3. Recolectar todas las células en 1 ml de MgSO₄ 10 mM con la ayuda de una espátula estéril.
4. Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm/10 minutos.
5. Lavar las células 2 veces con MgSO₄ 10 mM.
6. Proceder a transformar.

METODO DE CONJUGACIÓN

1. Inocular 25 ml de medio BS, adicionado con el antibiótico correspondiente con una asada de cultivo fresco de *A. vinelandii* (cepa receptora). Incubar a 30°C /24 horas/200 rpm.
2. Pasadas las 24 horas inocular con 1 ml del precultivo 25 ml de medio BS líquido sin antibiótico. Incubar a 30°C/200 rpm/36horas.
3. Cuando el cultivo de *A. vinelandii* tenga 12 horas poner precultivo de *E. coli*, a partir de una placa fresca (donadora y helper) en 5 ml de LB líquido con antibiótico. Incubar a 37°C/200rpm/12horas.
4. Inocular 500 µl de precultivo de *E.coli* en 450 µl de LB sin antibiótico (dilución 1:10) e incubar a 37°C.
5. Cuando el cultivo de *A. vinelandii* tenga 36 horas, centrifugar los 25 ml de medio, bajar células y lavar con MgSO₄ 10 mM hasta eliminar el alginato totalmente.
6. Resuspender en 1 ml de MgSO₄ 10 mM.
7. Centrifugar y lavar el cultivo de *E.coli* y resuspender en 1 ml de LB.
8. Dividir las placas BS/LB en cuatro puntos equidistantes (marcar preferentemente con plumón en la placa los cuatro puntos para localizar con facilidad el lugar donde se va poniendo el cultivo) y colocar sobre cada uno de los puntos 10 µl del cultivo de *A. vinelandii* (cepa receptora) dejar secar.
9. Adicionar 10 µl del cultivo de la cepa donadora o de la helper (puede ser cualquiera de las dos) en el mismo lugar donde previamente se fijó la cepa receptora y dejar secar.
10. Finalmente se instala el cultivo faltante (cepa donadora o helper) en el mismo punto donde se pusieron las dos cepas anteriores y dejar secar.
*Se pueden sustituir los puntos 8,9 y 10 mezclando en un tubo eppendorf 100 µl de la cepa donadora, la receptora y la helper. Se toman 100 µl de la mezcla de células y se cosechan en un placa BS/LB. (Utilizando esta técnica es necesario hacer mayor cantidad de diluciones).
11. Incubar las placas BS/LB durante 24 horas a 30°C.
12. Recoger el tapete celular y lavar con MgSO₄.
*Resuspender completamente las células para propiciar disociación celular.
13. Resuspender en un ml de MgSO₄.
14. Plaquear 200 µl de mezcla celular aproximadamente (depende de la cantidad de células, si es necesario hacer diluciones) en una placa BS con antibióticos de selección.
15. Incubar a 30°C durante 48 horas.
16. Seleccionar posibles candidatas.
*Si hay crecimiento masivo realizar diluciones.

CONJUGACIÓN INVERSA

1. A partir de una placa fresca con las transconjugantes *A.vinelandii* (plásmido captado por conjugación) inocular en 25 ml de BS con antibiótico correspondiente. Incubar a 30°C por 24 horas (cepa donadora).
2. Del precultivo tomar 1 ml e inocular 25 ml de medio BS sin antibiótico. Incubar a 30°C durante 36 horas.
3. Cumplidas 12 horas del cultivo de las transconjugantes *A.vinelandii*, poner un precultivo de *E. coli* a partir de una placa fresca (receptora y helper), en 5 ml de LB con antibiótico.
4. Inocular 500 µl de precultivo de cepa receptora y la helper en 450 µl de LB líquido sin antibiótico (dilución 1:10) e incubar a 37°C.
5. Cuando el cultivo *A. vinelandii* completo 36 horas, se centrifugaron los 25 ml de medio y se lavaron con MgSO₄ hasta eliminar el alginato por completo. Resuspender en 1 ml de MgSO₄ 10 mM.
6. De igual manera, centrifugar y lavar cultivos de *E. coli* (receptora y helper) y resuspender en 1 ml de LB.
7. Dividir las placas BS/LB en cuatro puntos equidistantes (marcar con plumón en la placa los cuatro puntos para localizar el lugar donde se va instalando el cultivo) y colocar sobre cada uno de los puntos 10 µl del cultivo de *E. coli* (cepa receptora) dejar secar.
8. Adicionar 10 µl del cultivo de la cepa donadora (cepa de *A. vinelandii*) o de la helper en el mismo lugar donde previamente se fijó la cepa receptora y dejar secar.
9. Finalmente se agrega el cultivo faltante (cepa donadora o helper) en el mismo punto donde se pusieron las dos cepas anteriores.
10. Dejar secar completamente e incubar a 37°C durante 12 horas.
11. Recoger el tapete celular y lavar con 1 ml de LB. Resuspender muy bien para propiciar la disociación de las células.
12. Hacer diluciones y plaquear en una placa LB con el antibiótico de selección.
13. Incubar 12 horas a 37°C.
14. Seleccionar colonias.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Obtención de Muestra para Cuantificación de Proteína y β–glucuronidasa

1. A partir de un precultivo de la cepa de interés de *A. vinelandii* en 25 ml de BS, con antibiótico. 18horas/30°C/200rpm.
2. Bajar 10 ml de preinóculo aproximadamente y lavar con MgSO₄, estandarizar el tamaño de todas las muestras para que la cantidad de inóculo sea uniforme.

3. Inocular 25 ml de BS sin antibiótico. Incubar a 30°C/48horas/200 rpm
4. Bajar un ml de cultivo (depende del tamaño de pastilla). Estandarizar tamaño del pellet celular.
5. Lavar con MgSO₄ 10 mM. Es importante que se elimine todo el alginato en las muestras para evitar errores de medición
6. Congelar el paquete celular.
7. Al momento de la prueba resuspender en 1 ml de MgSO₄ el paquete celular.

CUANTIFICACIÓN PROTEÍNA

Método Lowry

1. A partir de las células resuspendidas tomar aproximadamente 10 µl de células (depende del tamaño de muestra inicial).
2. En un tupo endorff completar el volumen de muestra problema (10 µl tomados) a un volumen final de 200 µl con MgSO₄ 10 mM.
3. Preparar un blanco con 200 µl de MgSO₄
*Preparar curva patrón albumina. Mezclando a un volumen final de 200 µl.

Albumina (2 mg/ml)	MgSO₄
2 µl	198 µl
4 µl	196 µl
8 µl	192 µl
16 µl	184 µl
32 µl	168 µl

4. A cada uno de los tubos se adicionó 1 ml de Solución Reactiva y se vortexeo
Solución Reactiva:
Sol. A 98% de Na₂CO₃ al 2%
Sol. B 1% de Tartrato de Sodio
Sol. C 1% de CuSO₄ 1%
5. Reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos.
6. Se adicionaron 100 µl de solución Reactivo de Folin (Solución es una relación 1:2 del reactivo Folin con Agua). Reposo durante 30' a temperatura ambiente.
7. Leer absorbancia a 625 nm.

CUANTIFICACIÓN β -GLUCURONIDASA

1. A partir de la muestra problema resuspendida en 1 ml de $MgSO_4$, se tomaron 10 μ l aproximadamente (depende de cantidad de células en la muestra) y se adicionaron 720 μ l de Buffer Z.
*Preparar un blanco con 730 μ l de buffer Z (procesar junto con las muestras).
2. Adicionar 10 μ l de lisozima (10 mg/ml) e incubar durante 5' a 37°C.
3. Agregar 10 μ l de tritón 10% y pasar baño 30°C. Inmediatamente después adicionar 100 μ l de PNPg. Cronometrar inicio de la reacción. La reacción es colorimétrica y se espera que vire a un color amarillo pálido, en cuanto se presente la coloración adicionar 150 μ l de Na_2CO_3 y detener el tiempo de reacción (t_{rx} es el tiempo exacto en que se genero la reacción colorimétrica).
4. Leer absorbancia a 405 nm contra el blanco.

OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA PCR'S

Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm
Fw tnasa	ACC GTT GTT CAA GCG TGT TAT	50°C
Rv tnasa	CGG TAG TCG ATG TGC GTG TC	50°C
FgusA	TGTAACGCGCTTTCCCACCAAC	60°C
Rv Tc	GCTAGCAGCACGCCATAGTGA	60°C
Fw pks	ACGGCCCACGGTTGAGGTTTTTC	62.4°C
Rv pks	GTCCCGACGCCGTTCTTGATGC	62.9°C
RRalgD SacI	GACTGAGCTCGCGTGATG	52°C
Fw Sm	TTTTGTCAGCAAGATAGCCAGA	54.4°C
Rv Sm	GATCGAAATCCAGATCCTTGAC	53.1°C

VII RESULTADOS

Estrategia Experimental

Para alcanzar los objetivos planteados, nos propusimos seguir una estrategia de ganancia función, determinando el efecto de la sobre-expresión de *rsmA* sobre la expresión del gen *algD*.

Construcción de Vectores Integrativos

En *A. vinelandii* es complicado trabajar con vectores extra-cromosomales debido a la inestabilidad que presentan los plásmidos en la bacteria. Por lo anterior, nuestro grupo ha optado por generar y trabajar con vectores integrativos que se recombinan en el cromosoma. En el laboratorio se han diseñado y generado una serie de vectores que nos permiten recombinar en el cromosoma en un *locus* neutro fusiones génicas, genes con su promotor nativo o bajo el gobierno del promotor inducible *tac*.

Esta serie de plásmidos se les llamó pUMA. El cuerpo del plásmido viene del vector pUC19, en el se clonó el gen *mela* como *locus* neutro de recombinación. El gen *mela* codifica para una α -galactosidasa solo necesaria para la bacteria cuando se crece en melibiosa. De igual manera, los vectores tienen un casete de resistencia útil para seleccionar los procesos de recombinación.

Se cuenta con dos vectores de la serie pUMA, que permiten realizar fusiones cromosomales. Estos vectores cuentan con el gen reportero *gusA* y poseen un casete de resistencia a Tetraciclina. El vector pUMA-Tc-*gusAT* nos permite realizar fusiones transcripcionales, y el vector pUMA-Tc-*gusAPT* realizar fusiones traduccionales (Fig. 22).

La diferencia entre estos dos vectores estriba en que el gen reportero; en la traduccional el gen reportero está desprovisto del sitio de unión a ribosoma y de ATG.

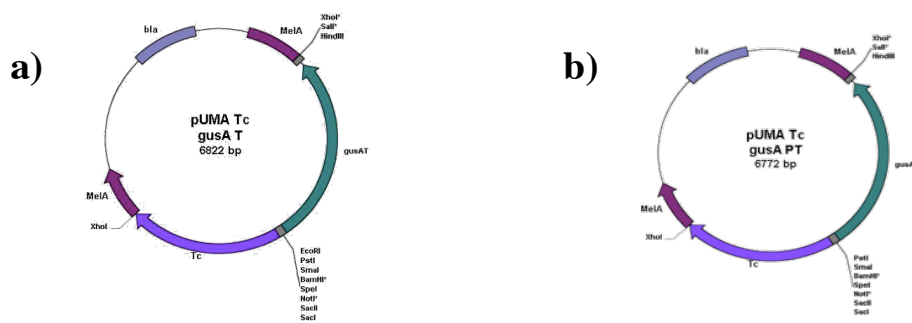


Fig 22 Vectores de la serie pUMA para realizar fusiones cromosomales a) Vector pUMA-Tc-*gusAT* (Fusiones Transcripcionales) y b) Vector pUMA-Tc-*gusAPT* (fusiones traduccionales)

También se cuenta con el vector pUMAKm-Tac. Este plásmido, al igual que los anteriores es capaz de insertarse mediante recombinación homóloga en el *locus* del gen *melA*. El vector cuenta con el promotor inducible Tac, su represor LaqI y confiere resistencia a Kanamicina (Fig. 23).

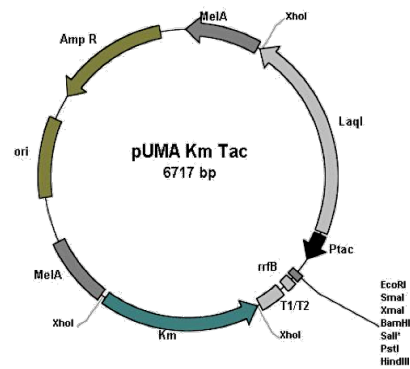


Fig 23 Vector pUMA-Km-tac. Plásmido integrativo con la secuencia del promotor tac, el represor LaqI y un gen resistencia a Km.

7.1 Generación de las fusiones

RRalgD-gusA recombinadas en el *locus* *algD*

Nos propusimos generar fusiones cromosomales, transcripcional y traduccional, que tuvieran como *locus* de recombinación el propio gen *algD*. De esta manera podríamos evaluar la actividad del promotor del gen *algD* (*RRalgD*) en su sitio nativo. Al mismo tiempo que se lograría una mutación por inserción, del gen reportero junto con un casete de resistencia al término de la *RRalgD*.

Al término de la región reguladora del gen *algD* se encuentra un sitio *SacI* (Fig. 24), mismo sitio que se utilizó para realizar las manipulaciones necesarias para generar las fusiones cromosomales.

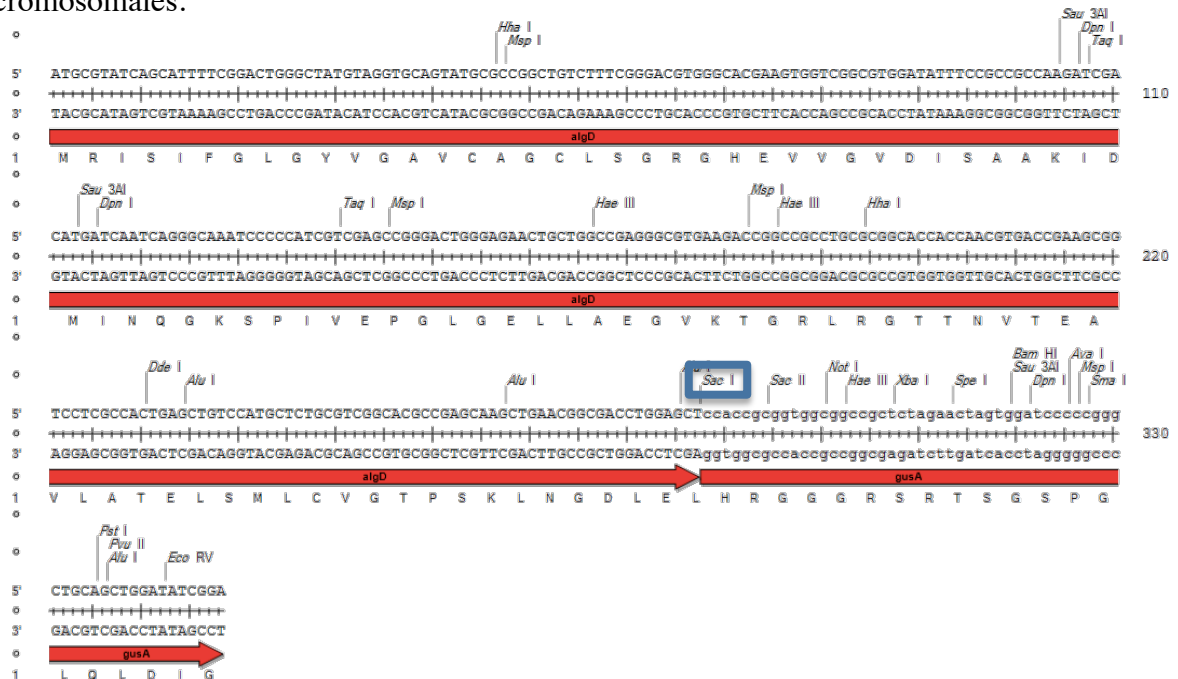


Fig 24 Esquema de la Secuencia de la región promotora del gen *algD* (*RRalgD*). Al término de la secuencia se localiza un sitio *SacI*, mismo sitio en que se insertó el gen reportero *gusA* como se muestra en el diagrama.

7.1.1 Construcción de las fusiones *algD-gusA(T/PT)-Gm*

Originalmente planteamos generar las fusiones *algD-gusA* utilizando los vectores pUMATc*gusA*, tanto traduccional como transcripcional y recombinarlas en el *locus melA*. Sin embargo durante el inicio de este trabajo de tesis en otro proyecto del grupo de trabajo se encontró que la mutación del gen *algD* hacia viable la obtención de mutantes *rsmA*, por esta razón decidimos realizar las fusiones directamente en el gen *algD* generando a su vez la mutación en el gen que eventualmente en trabajos posteriores posibilitaría la mutación de *rsmA* para realizar ensayos de pérdida de función. Al no contar con los interposones para realizar las fusiones *algD* descritas nos dedicamos en primera instancia a la construcción de dichos casetes.

7.1.1.1 Interposones *gusAT -Gm* y *gusAPT-Gm*

Partiendo de los vectores pUMATc*gusAT* y pUMATc*gusAPT* que poseen el gen reportero *gusA* y de un casete de resistencia a Gm se construyeron los interposones *gusAT-Gm* y *gusAPT-Gm*. Para tal fin se escindió el casete Gm y los vectores pUMA con la enzima *HindIII*. El sitio *HindIII* en los vectores pUMA se encuentra justo río arriba del extremo 5' de gen *gusA*. Los casetes se ligaron a los vectores pUMATc*gusAT* y pUMATc*gusAPT* y se transformaron en *E. coli* DH5 α . Las clonas se probaron cortando con las enzimas *HindIII* y *SacI*. En el caso de *HindIII* se liberaría un fragmento correspondiente al peso del casete Gm, y *SacI* nos ayudaría a establecer la orientación correcta, si se liberaba un fragmento de 2691 pb en el caso de la fusión transcripcional y de 2650 pb en el caso de la traduccional, se evidenciaría un arreglo en el que el casete Gm proseguiría al gen *gusA* con el mismo sentido de la transcripción. Los plásmidos que portan los interposones fueron llamados pUMATc*gusAT-Gm* (Fig. 25) y pUMATc*gusAPT-Gm* (Fig. 26).

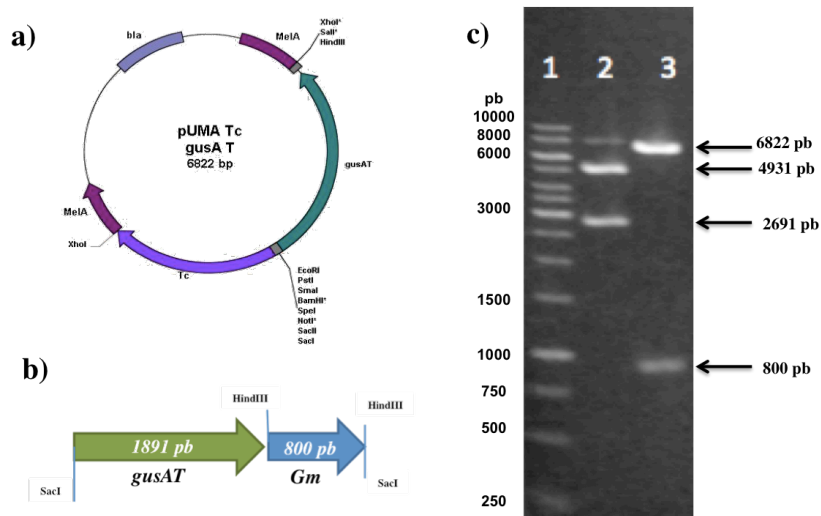


Fig 25 Diagrama descriptivo del Interposón transcripcional contenido en pUMATc*gusAT-Gm*. a) Plásmido pUMA Tc *gusAT*, en el sitio *SacI*, al término del gen reportero *gusAT* se insertó el casete de resistencia a Gm, generando el plásmido pUMATc*gusAT-Gm* b) Esquema del interposón *gusAT-Gm* (2691 pb) el gen reportero y el casete de resistencia c) Mapeo de restricción que comprueba la presencia del casete de Gm y la orientación en fase del interposón. Se digirió con *HindIII* y *SacI*

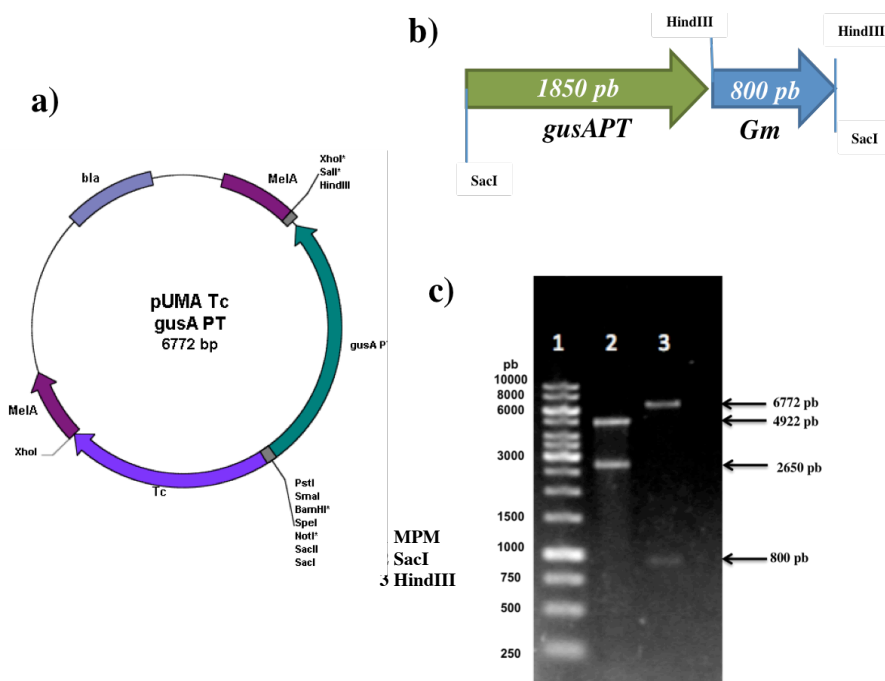


Fig 26 Diagrama descriptivo del Interposón traduccional contenido en pUMATcgusAPT-Gm. a) Plásmido pUMA Tc *gusA PT*, en el sitio *SacI*, al término del gen reportero *gusA PT* se insertó el casete de resistencia a Gm, generando el plásmido pUMATC*gusA PT*-Gm b) Esquema del interposón *gusA PT*-Gm (2650 pb) el gen reportero y el casete de resistencia c) Mapeo de restricción que comprueba la presencia del casete de Gm y la orientación en fase del interposón. Se digirió con *HindIII* y *SacI*.

7.1.1.2 Plásmidos pGEMalgD *gusA(T/PT)*-Gm

Una vez que ya se tenían los interposones, se utilizó un plásmido previamente construido en el laboratorio, para generar las fusiones *algD-gusA*. Este plásmido es un derivado del pGEM T-Easy, que tiene clonado el gen *algD* junto con su región reguladora, así como una parte del gen aledaño *alg8* (llamado pGEMalgD con un inserto de 2.4 kb) (Morales, 2013).

Para generar las fusiones se cortó de manera parcial el plásmido pGEMalgD con *SacI*, ya que cuenta con dos sitios *SacI*, siendo de nuestro interés el que se encuentra después de la *RRalgD* (464pb). Por otra parte se cortó con *SacI* el plásmido pUMATcgusAT-Gm y pUMATcgusAPT-Gm para escindir los interposones *gusAT*-Gm y *gusAPT*-Gm. Una vez que se tenía el vector pGemalgD cortado y los interposones escindidos, se procedió a ligar y transformar.

Fusión Transcripcional pGem-*algD-gusAT*-Gm

En la Fig. 27 se muestra el diagrama de la fusión obtenida a partir del vector pGEMalgD. El interposón del gen reportero *gusA* transcripcional junto con el casete de resistencia a Gm, se insertaron en un sitio *SacI* propio, localizado 278 pb después del término de la *RRalgD*. Con la finalidad de comprobar esta construcción se realizó mapeo de restricción con las enzimas *SacI* y *EcoRV*.

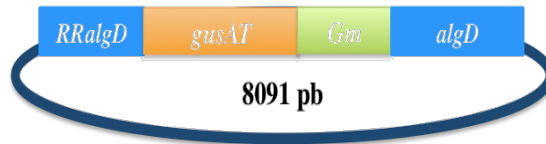


Fig 27 Diagrama pGem-*algD-gusAT-Gm*. Fusión transcripcional con un tamaño total de 8091 pb.

En la Fig. 28 se muestra el patrón de restricción obtenido al cortar con la enzima *SacI*, con la que se esperaba obtener tres fragmentos, uno de estos correspondiente al interposón *gusAT-Gm*, con un peso de 2691 pb.

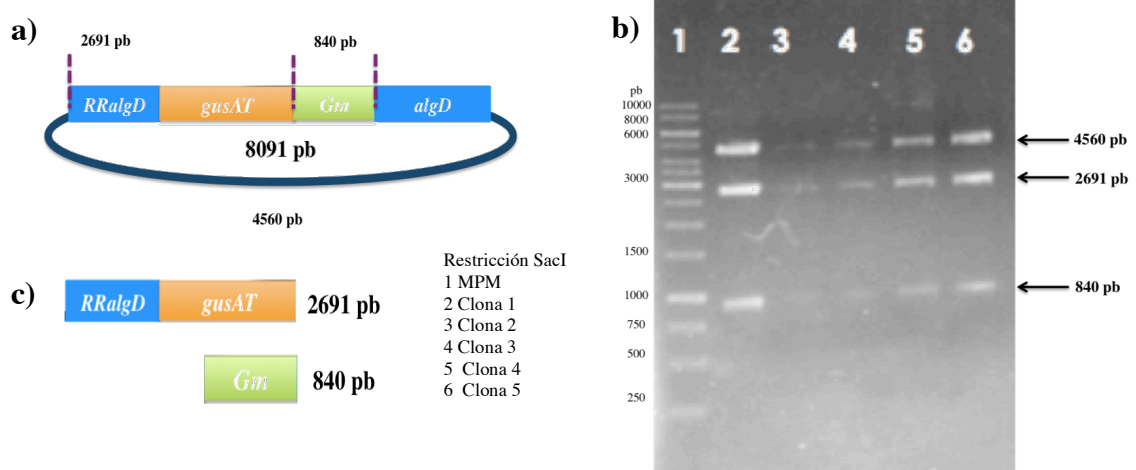


Fig 28 Patrón de Restricción correspondiente al plásmido pGem-*algD-gusAT-Gm* al cortar con la enzima *SacI*. a) Diagrama que corresponde a la construcción con un peso total de 8 091 pb, se indican los sitios donde corta la enzima *SacI*, esperando obtener tres fragmentos c) el del interposón de 2691 pb, un fragmento de 840 pb y el resto del plásmido de 4560 pb. b) En un gel de electroforesis se muestran los fragmentos con los tamaños esperados al comprobar 5 posibles candidatas.

La fusión transcripcional también se cortó con la enzima *EcoRV* y el patrón de restricción obtenido se muestra en la Fig. 29. Al cortar con esta enzima, se esperaba obtener cuatro fragmentos, mostrados esquemáticamente en la Fig. 29a. El tamaño correspondiente a cada fragmento se muestra en Fig. 29b: el del vector pGem y parte del gen *algD* con un peso de 4501 pb, un fragmento de 1901 pb que comprende parte del gen *algD* y parte de *gusA*, un fragmento 1458 pb, que incluye el casete de *Gm* y parte del gen *algD* y un último fragmento de 231 pb parte del gen *gusA*. De las clonas obtenidas (Fig. 29c), se digirieron con la enzima cinco posibles candidatas, solo una de las clonas coincidió con los pesos esperados (carril 4 del gel mostrado en la Fig. 29c).

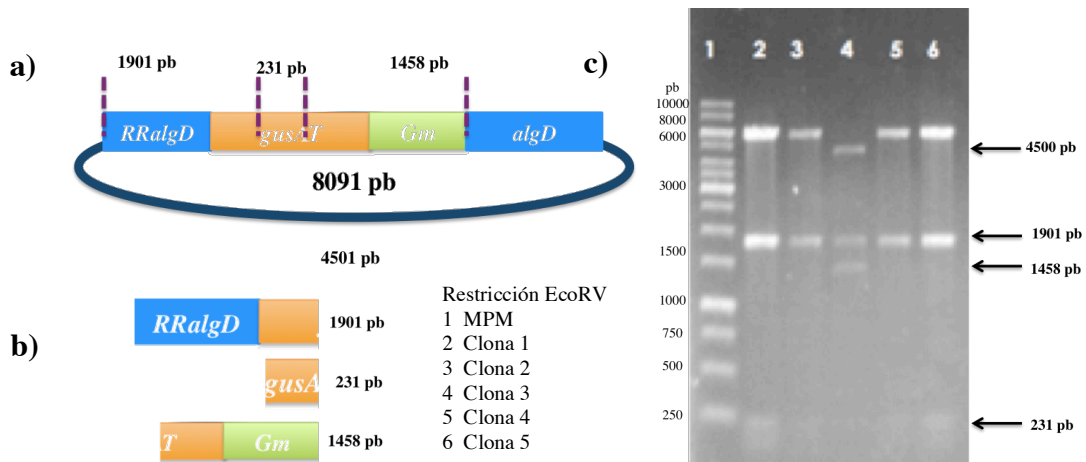


Fig 29 Patrón de Restricción correspondiente al plásmido pGem-ald-gusAT-Gm al cortar con la enzima *EcoRV*. a) En el diagrama se muestra esquemáticamente el plásmido, indicando los sitios donde se esperaba que cortara la enzima. b) Los cuatro fragmentos esperados que se esquematizan en el diagrama corresponden a los siguientes pesos: 231 pb, 1458 pb, 1901 pb y 4501 pb. c) Al comprobar las cinco posibles candidatas, la clona 3 presentó el patrón de restricción que se esperaba.

Fusión Traduccional pGem-ald-gusAPT-Gm

La fusión traduccional se generó de la misma manera que la transcripcional. Se insertó el interposón *gusAPT-Gm* en el sitio *SacI* localizado al término de la región promotora del gen *algD*, generando así la construcción pGem-ald-gusAPT-Gm que se muestra en la Fig. 30.

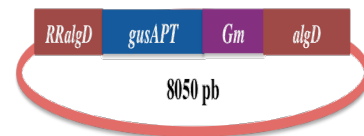


Fig 30 Diagrama pGem-ald-gusAPT-Gm. Fusión Postranscripcional (8050 pb).

Para verificar la construcción se escindió con las enzimas *SacI* y *EcoRV*. Al realizar la restricción con la enzima *SacI* (Fig. 31), se esperaba que se liberara el interposón *gusAPT-Gm* con un peso de 2650 pb.

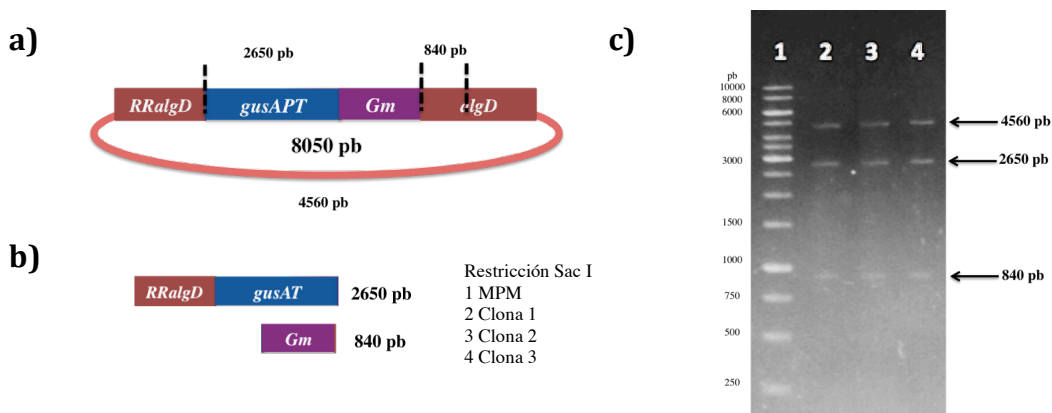


Fig 31 Patrón de Restricción al cortar con *SacI* el plásmido pGem-ald-gusAPT-Gm. a) Diagrama del plásmido con un peso total de 8 050 pb. Indicando los sitios donde debe cortar la enzima *SacI*. Los cortes obtenidos son b) el interposón junto con el casete de resistencia con un peso de 2650 pb, un fragmento de 840 pb y el resto del plásmido con un tamaño de 4 560 pb. c) Se cortaron con la enzima tres candidatas y se corrió un gel de electroforesis. Los tamaños que se esperaban fueron los obtenidos.

También se cortó el plásmido con *EcoRV*. Se digirieron tres clonas con la enzima, esperando obtener cinco fragmentos y solo la clona 3 presentó el patrón de restricción esperado, como se muestra en la Fig. 32.

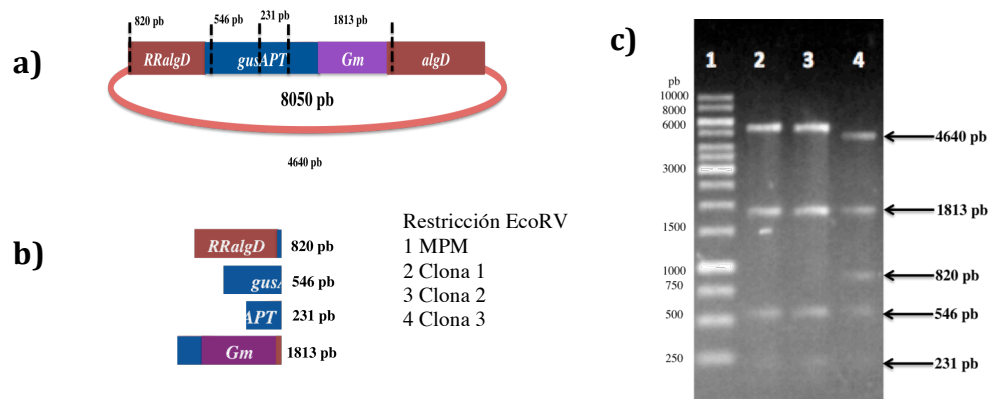


Fig 32 Patrón de Restricción obtenido con la Enzima *EcoRV* al cortar el plásmido pGEM-aldDgusAPT-Gm.
a) Esquema del plásmido, donde se señalan los sitios donde corta la enzima. Se obtienen cinco fragmentos, **b)** se muestra el fragmento y el peso correspondiente, faltando el resto del vector, fragmento de 4640 pb. **c)** Se presenta el gel de electroforesis correspondiente al corte de tres candidatas con la enzima *EcoRV*, siendo la clona 3 (carril 4) la que presenta el patrón de restricción esperado.

Comprobación mediante PCR de las fusiones cromosomales

Además de los patrones de restricción, para verificar las fusiones cromosomales, transcripcional pGemaldD-gusAT-Gm y la traduccional pGemaldD-gusAPT-Gm se realizó una PCR, la cual nos permitiría comprobar que los interposones (*gusAT/PT-Gm*) se habían clonado en el plásmido pGemaldD de tal manera que se encontraran en fase con la región promotora del gen *aldD*. Para dicha comprobación se amplificó con los oligos RRalgDSacI (inició del gen *aldD*) y el oligo FgusA que amplifica a partir de la parte interna de *gusA*. El fragmento amplificado obtenido de la PCR se muestra en la Fig. 33.

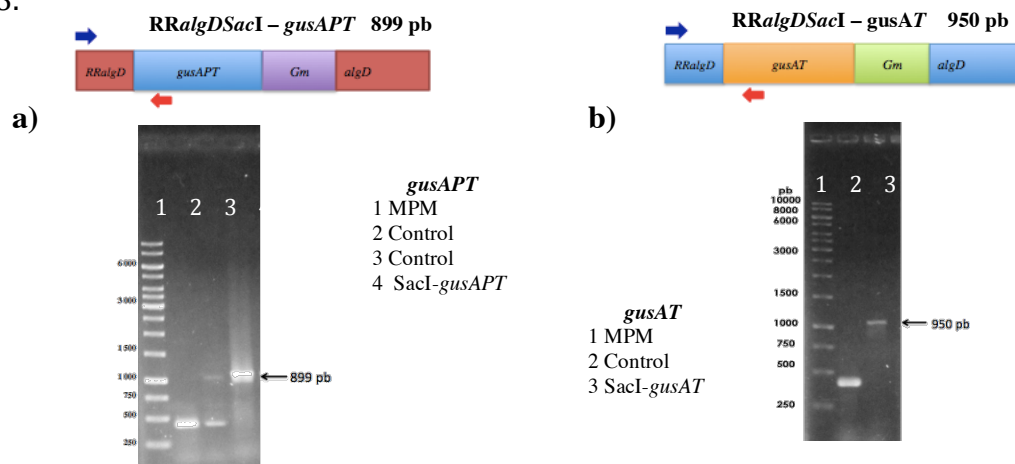


Fig 33 Esquema de los amplicones y oligonucleótidos utilizados para comprobar fusiones cromosomales.
a) Se amplificó a partir del plásmido pGemaldD-gusAPT-Gm una región de 899 pb con los oligonucleótidos RRalgDSacI y *gusA* (742 pb RRalgD+157 pb de *gusA*) mientras que, **b)** el amplificado obtenido a partir de la fusión transcripcional pGemaldD-gusAT fue de 950 pb (742 pb RRalgD+208 pb de *gusA*).

Una vez que se checkaron las construcciones por patrón de restricción y por PCR, se estriaron en un placa de LB, que tenía como sustrato Xgluc, reactivo para detectar la presencia de actividad enzimática del gen reportero (Fig. 34). Únicamente la construcción transcripcional presentó actividad evidenciada por la coloración azul. Mientras que la fusión traduccional no presentó actividad enzimática.

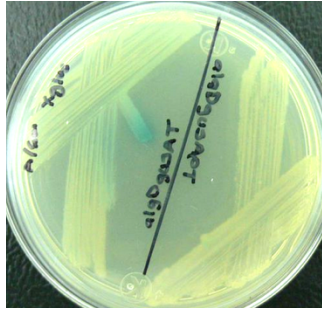


Fig 34 Construcciones *algD::gusA* (T/PT)-Gm en una placa de LB con sustrato Xgluc. La actividad enzimática se observa mediante un precipitado color azul, únicamente se presentó actividad en la fusión transcripcional (*algDgusAT*)

7.1.2 Fusiones *algD::gusA*(T/PT)-Gm en *A. vinelandii*

Una vez que las construcciones fueron corroboradas, se procedió a transformarlas en la cepa AEIV de *A. vinelandii*. En la Fig. 35 podemos observar que las cepas que poseen las fusiones cromosomales han perdido la mucoidía debido a la mutación en el gen *algD* que se generó.

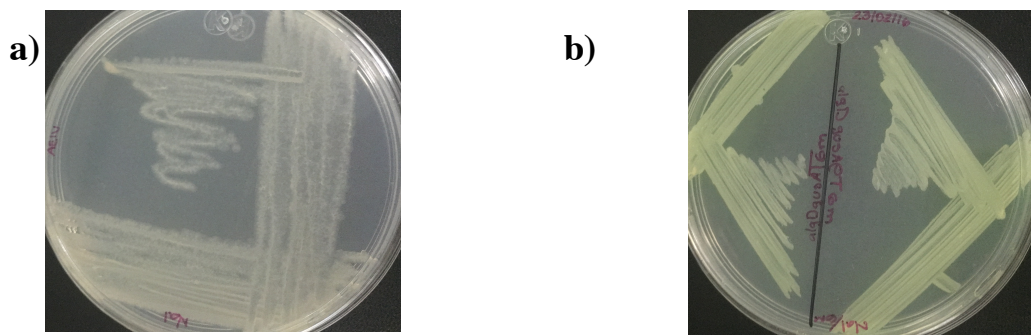


Fig 35 Recombinantes de las fusiones cromosomales transcripcional y traduccional. Al comparar a) la cepa silvestre AEIV con b) las fusiones cromosomales *algDgusATGm* y *algDgusAPTGm*, se observa una notable diferencia en el fenotipo mucoso. b) Las fusiones cromosomales perdieron mucoidía debido a la mutación por inserción (*gusA-Gm*) en el gen *algD*.

De las candidatas recombinantes obtenidas, se seleccionaron algunas y se realizó extracción de ADN cromosomal. Utilizando el ADN, se realizó la misma PCR que se había efectuado a los plásmidos pGEMalgD-gusAT-Gm y pGEMalgD-gusAPT-Gm que portaban las fusiones cromosomales que se recombinaron (Fig. 36).

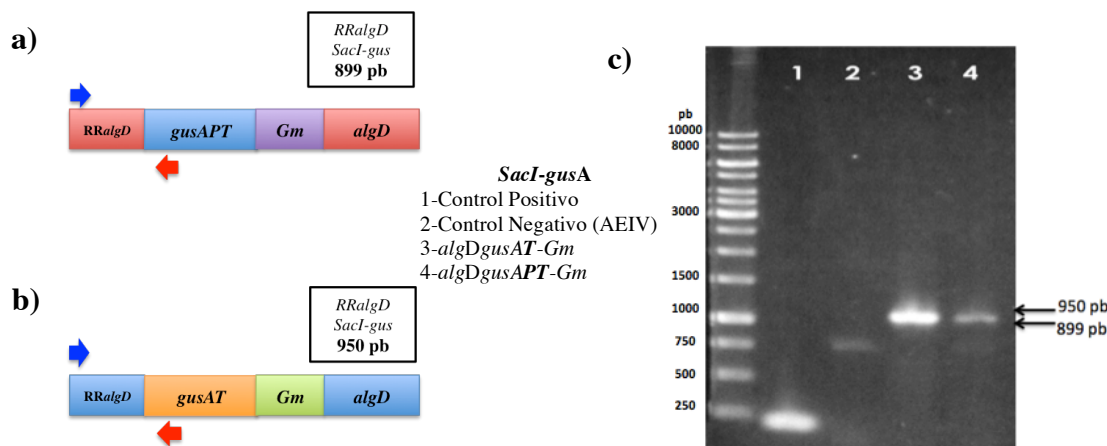


Fig 36 Producto de PCR para comprobar las fusiones cromosomales en *A. vinelandii*. a) Diagrama que muestra la fusión cromosomal (traduccional) *algD::gusAPT-Gm*, el amplificado tiene un peso de 899 pb. b) Esquema de la fusión cromosomal (transcripcional) *algD::gusAT-Gm*, el peso de amplificado es de 950 pb. Los oligonucleótidos utilizados son RRDD *SacI* y *gusA*. c) En el gel se muestra en el carril 2 como control negativo el ADN cromosomal de la cepa silvestre AEIV, en el carril 3 el producto de PCR del ADN cromosomal de la fusión transcripcional y en el carril 4 se muestra el amplificado de la fusión traduccional.

Como se muestra en la Fig. 37, en *A. vinelandii*, tanto la fusión transcripcional como traduccional presentaron actividad enzimática cuando se estriaron en una placa que contenía como sustrato Xgluc.

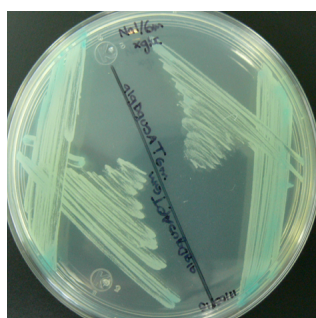


Fig 37 Actividad enzimática en fusiones cromosomales *algD::gusAT-Gm* y *algD::gusAPT-Gm*. Placa con medio BS y Xgluc como sustrato. Ambas fusiones mostraron un precipitado color azul traducido como actividad enzimática propia del gen reportero.

7.2 Sobreexpresión de RsmA

7.2.1 Sobreexpresión de *rsmA* bajo el promotor inducible *tac*

El siguiente paso fue sobre-expresar *rsmA* en las cepas que albergaban las fusiones del gen *algD*, tanto transcripcional como traduccional.

Originalmente, para sobre-expresar a *rsmA* se planteó clonar al gen bajo el promotor *tac* del vector pUMAKmTac (Fig. 38). En este vector sería posible inducir controladamente la expresión del gen al desreprimir al promotor con isopropil- β -D-tiogalactosido (IPTG).

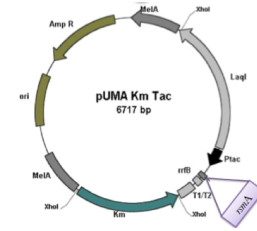


Fig 38 pUMA Km *tac-rsmA*. Región estructural de *rsmA* clonada bajo el promotor *tac*, para una sobre-expresión inducible.

A la par que se realizaba esta parte del proyecto, en el laboratorio se estaba trabajando con la expresión controlada de los pequeños RNAs de la familia Rsm a través del promotor *tac*. Cuando se sobre-expresaron los pequeños RNAs no se observó efecto, y esto llevó a que se verificara el funcionamiento del sistema de expresión. Para esto se puso bajo el promotor *tac* al gen reportero *gusA* y estas fusiones se recombinaron en el cromosoma de *A. vinelandii*. De esta manera, sería posible probar el funcionamiento del sistema de expresión mediante la actividad enzimática al ser inducida por IPTG (Isidro Coxca, 2015).

En el experimento se midió la actividad de la β -glucuronidasa de las fusiones *tac-gusA* sin y con inducción de IPTG 500 μ M y se realizó una comparación con la cepa silvestre AEIV, se observó que al inducir con IPTG el nivel más alto de sobreexpresión alcanzado fue de 2 unidades de β -glucuronidasa (Isidro Coxca, 2015). De esta manera se probó que el sistema funciona y permite expresar de manera controlada al gen reportero, sin embargo los niveles de expresión que se observan son muy bajos (2 unidades específicas de β -glucuronidasa como máximo) para los fines del estudio. Al analizar estos datos, se encontró que en *A. vinelandii*, a pesar de no metabolizar la lactosa, se encuentran ocho proteínas pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales LacI, lo que nos hace suponer que esto podría influir en el bajo desempeño que presenta el promotor *tac* (Isidro Coxca, 2015).

De forma independiente, en un estudio desarrollado por el grupo de la Dra. Cinthia Núñez (Ibt-UNAM) encontraron resultados similares a los nuestros. En este trabajo se utilizó el promotor inducible *lac* teniendo como control de expresión al gen *gusA*. Al realizar las cuantificaciones (0.2 a 1.4 unidades de β -glucuronidasas) se observó que el sistema de expresión funciona (Quiroz, 2012).

Sin embargo, coincidiendo con los resultados de Isidro Coxca (2015), los niveles de inducciones son bajos, encontrándose por debajo de 2 unidades sugiriendo una fuerte actividad represora de LacI o sus homólogos funcionales en *A. vinelandii*.

7.2.2 Sobre-expresión constitutiva de *rsmA*

Ante este panorama, se optó por cambiar la estrategia para realizar la sobre-expresión de *rsmA*. En lugar de sobre-expresar de manera controlada, la sobreexpresión sería constitutiva usando el plásmido pMCY2, construido previamente en el laboratorio y que además ya ha sido probado en ensayos de sobre-expresión (Cocotl, 2007).

7.2.2.1 Plásmido pMCY2

El plásmido pMCY2 tiene a *rsmA* bajo el promotor constitutivo del gen que confiere resistencia a Kanamicina (Cocotl, 2007).

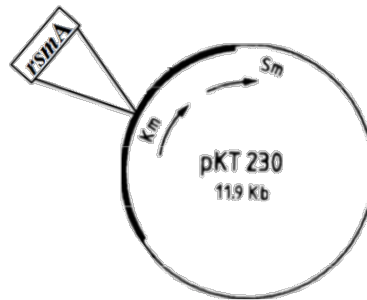


Fig 39 Plásmido pKT 0.3 *rsmA*. Derivado del plásmido pKT 230, en que la región estructural de *rsmA* se encuentra bajo la región promotora de Km. Tomado y modificado de (Cocotl, 2007)

7.2.2.2 Conjugación del pMCY2 en las fusiones *gusA (T/PT)-RRalgD* en *A. vinelandii*

Para lograr generar la sobre-expresión de *rsmA*, el plásmido pMCY2 se transfirió por conjugación a las cepas que portan las fusiones cromosomales *algD::gusAT-Gm* y *algD::gusAPT-Gm*. Se seleccionaron las posibles transconjugantes utilizando como marcador de resistencia la estreptomina. A la par del plásmido pMCY2 se conjugó como control el plásmido vacío pKT230 con resistencia a estreptomina y Kanamicina.

Las transconjugantes recuperadas de los plásmidos pKT230 y pMCY2 (Fig. 40) se crecieron en medio BS con el antibiótico estreptomycin. De igual manera, se estriaron las cepas en una placa de BS adicionada con los antibióticos estreptomycin y kanamicina, donde como se esperaba solo presentaron crecimiento las cepas con el plásmido pKT230 (control).

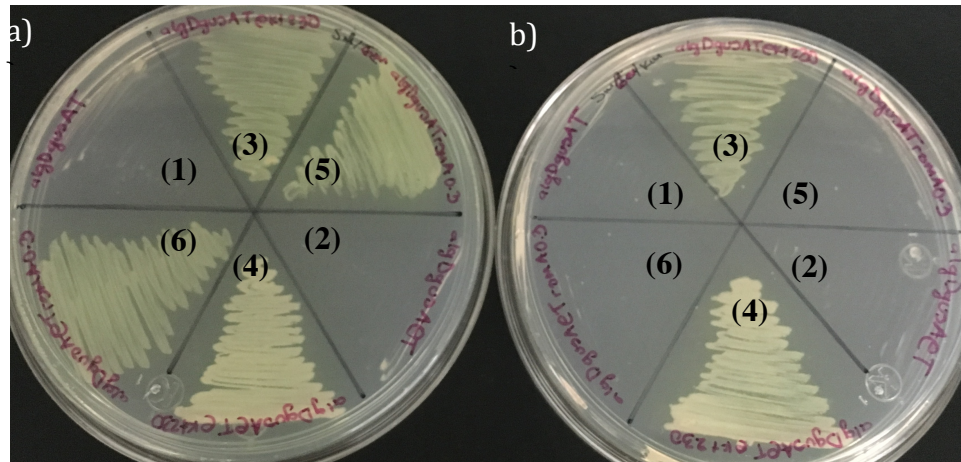


Fig 40 Transconjugantes pMCY2 *algD::gusA (T/PT)-Gm*. **a)** En medio BS con estreptomycin y gentamicina se estriaron como control negativo las fusiones *algD::gusAT* (1) y *algD::gusAPT* (2) sensibles a estreptomycin, las transconjugantes control transcripcional (3) y traduccional (4), que portan el plásmido pKT230 resistentes a gentamicina, estreptomycin y kanamicina y las transconjugantes transcripcional (5) y traduccional (6) pMCY2 resistentes a gentamicina y estreptomycin. Solo presentan crecimiento las cuatro transconjugantes. **b)** Las mismas cepas se estriaron en una placa BS con estreptomycin, gentamicina y kanamicina, únicamente crecieron las transconjugantes control pKT 230.

Para comprobar la presencia del plásmido pMCY2 en la fusión cromosomal transcripcional y traduccional de *A. vinelandii*, así como los controles pKT230 transcripcional y traduccional, se llevó a cabo una conjugación inversa transfiriendo los plásmidos de las cepas transconjugantes en *Azotobacter* ahora a la cepa XL1Blue (Tetraciclina resistente) de *E. coli*. A estos plásmidos se les denominó *algD* pKT230 transcripcional, *algDp*KT230 traduccional, *algDp*MCY2 transcripcional y *algDp*MCY2 traduccional; esto para reconocer su procedencia. En la Fig. 41 se muestran las cepas de *E. coli* XL Blue que albergan los plásmidos pKT230 y pMCY2 seleccionadas en LB adicionada con estreptomycin.

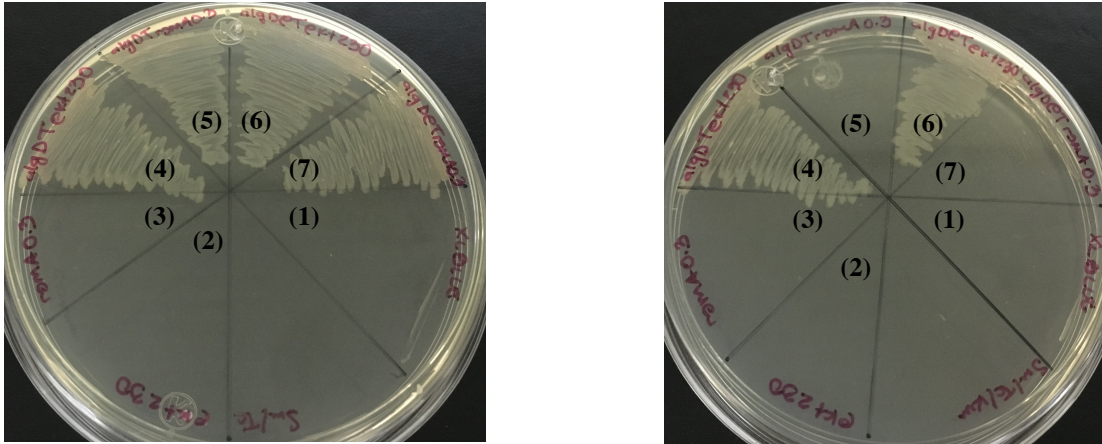


Fig 41 Conjugación Inversa de los plásmidos *algD* pKT 230 y pKT 0.3 *rsmA* transcripcionales y traduccionales. **a)** En medio LB con estreptomicina y tetraciclina se estriaron las cepas receptoras de los plásmidos previamente conjugados en *A. vinelandii*, como controles negativos la cepa receptora (1) XLBlue (resistencia a Tc), las cepas originalmente donadoras que portan el plásmido (2)pKT230 (resistente a Km y Sm) y (3) pMCY2 (resistente a Sm), así como las transconjugantes XL Blue-*algD*-pKT230 transcripcional(4) y traduccional(6) , XL Blue-*algD-rsmA 0.3* transcripcional(5) y traduccional(7). **b)** De igual manera las mismas cepas se estriaron en una placa con antibióticos a estreptomicina, kanaicina y tetraciclina donde solo presentaron crecimiento las transconjugantes control *algD*pKT230 transcripcional(4) y traduccional(6).

Una vez que se seleccionaron con los antibióticos correspondientes las posibles portadoras de los plásmidos *pKT 230* y *pMCY2*, se realizó una PCR utilizando un par de oligos que amplifican el gen de resistencia a Estreptomicina. En caso de que las cuatro candidatas XL-Blue *pKT230* T, XL-Blue-*pKT230* pT, XL-Blue-*pMCY2* T y XL-Blue-*pMCY2* pT, tuvieran el plásmido, deberían amplificar un fragmento de 1043 pb, como se muestra en la Fig. 42.

- 1 MPM
- 2 plásmido *rsmA 0.3* (control)
- 3 XL-Blue-*pMCY2* T
- 4 XL-Blue-*pMCY2* pT
- 5 XL-Blue-*pKT230* T
- 6 XL-Blue-*pKT230* pT

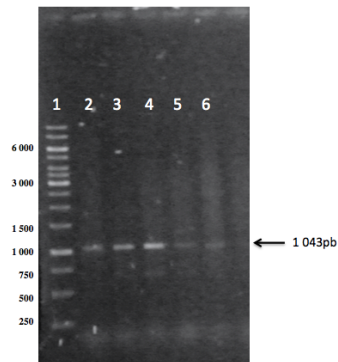


Fig 42 Comprobación por PCR de la Conjugación Inversa (Oligos Sm) . El amplificado corresponde a 1 043 pb perteneciente al gen de resistencia a Estreptomicina.

7.3 Medición de expresión de fusiones *RRalgD-gusA* bajo la sobreexpresión de *rsmA*

Una vez que se tuvieron las transconjugantes se procedió a realizar el experimento de medición de la actividad del reportero en presencia y en ausencia de la sobre-expresión del gen *rsmA*.

Para medir la actividad enzimática, se utilizaron :

- Cepas derivadas de la cepa AEIV que portan las fusiones cromosomales *algD::gusAT-Gm* y *algD::gusAPT-Gm*
- Transconjugantes de las cepas *algD::gusAT-Gm* y *algD::gusAPT-Gm* que albergan los plásmidos pKT230 y pMCY2.

Las mediciones se realizaron por triplicado. Como se observa en el gráfica (Fig. 43) la sobre-expresión de *rsmA* en la fusión traduccional *algD::gusAPT-Gm* disminuye en un 70% la actividad del reportero en comparación con la cepa que no posee plásmidos y de la que alberga al vector vacío. Sin embargo, el efecto de la sobre-expresión de *rsmA* sobre la fusión transcripcional *algD::gusAT-Gm* presenta una disminución del 56% de la actividad del reportero respecto a la cepa que posee el plásmido vacío y del 65% respecto a la cepa que no posee plásmido.

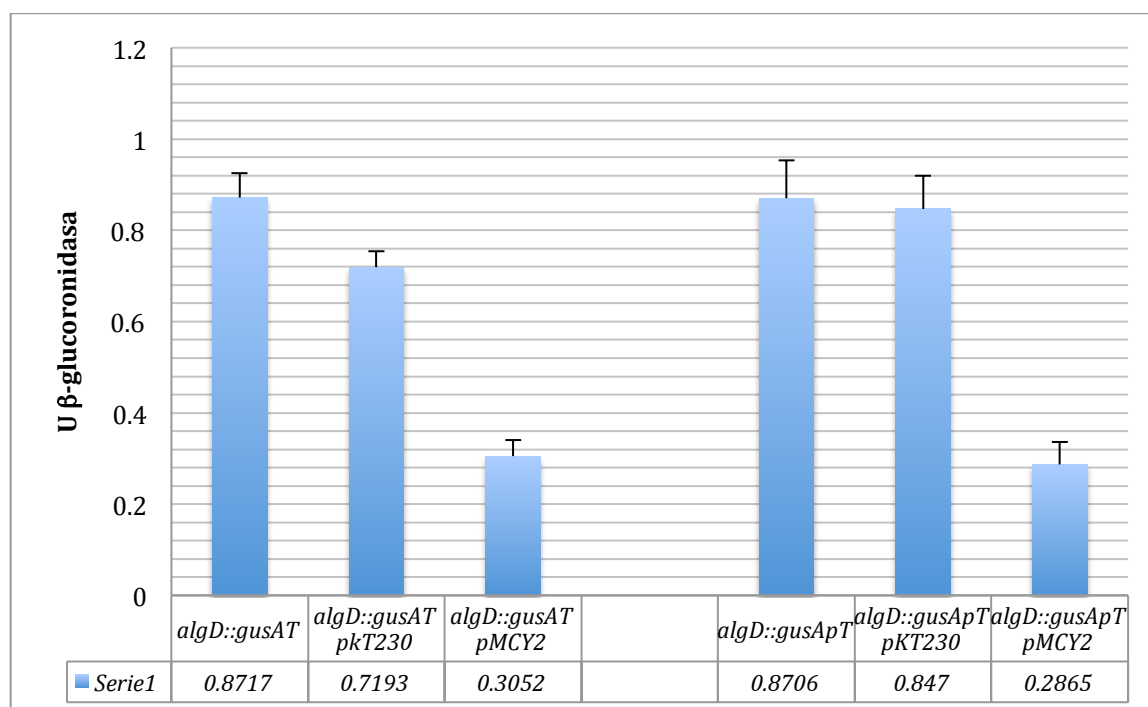


Fig 43 Medición de la Expresión de Actividad Enzimática de las fusiones cromosomales *algD::gusA* (T/PT)-Gm bajo la sobreexpresión de *rsmA*. Se muestra una comparación de la actividad enzimática de las fusiones transcripcionales y de las traducionales. En ambos casos se presenta tanto la fusión cromosomal, la fusión cromosomal que alberga el plásmido vacío y la fusión cromosomal con la sobreexpresión de *rsmA*.

VIII DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos planteamos evaluar el efecto de RsmA sobre la expresión del gen *algD* mediante la ganancia de función, es decir, la sobreexpresión de *rsmA*; de tal manera que el grado de expresión de *algD* se pudiera determinar a través de una fusión de la región reguladora de *algD* con el gen reportero *gusA*. Debido a la dificultad e inestabilidad para mantener plásmidos en *A. vinelandii*, se optó por generar recombinaciones en el cromosoma, de acuerdo a lo reportado por Cocotl en 2007, acerca de la dificultad de obtener mutantes nulas en el gen *rsmA* en un fondo productor de alginato y la posibilidad de obtener mutantes nulas en un fondo que no produce este polímero (Morales, 2013), optamos por realizar una fusión cromosomal utilizando como *locus* de recombinación el mismo gen *algD*. De esta manera evaluaríamos la actividad de la región promotora en su región nativa, al mismo tiempo se generaría una cepa mutante no productora del alginato, con la posibilidad de estudiar posteriormente también el efecto de RsmA sobre *algD*, a través de la pérdida de función.

En este punto, es importante mencionar el trabajo realizado con anterioridad por Morales en el 2013, donde la obtención de mutantes nulas en *rsmA* solo se logró exitosamente en una cepa no productora de alginato. En un primer intento la mutación en *rsmA* se realizó en una cepa no productora de alginato llamada JGDE que tenía una mutación por inserción de un casete de Kanamicina entre el subdominio catalítico y el subdominio de pegado a sustrato del gen *algD*; cuando se logró generar la mutación de *rsmA*, el fenotipo de la cepa se revirtió, produciendo de nuevo alginato. Esto se atribuyó de manera hipotética a que la inserción del casete de Kanamicina podría dejar una proteína parcialmente funcional, que en condiciones basales de expresión su actividad sería insuficiente para producir alginato. Sin embargo al mutar a *rsmA* (regulador negativo de la expresión del gen *algD*) se propiciaría una sobreexpresión de la proteína compensando su función defectiva y por lo tanto posibilitando la producción de alginato. Posteriormente en el trabajo de Morales se optó por generar una segunda mutante en *algD* (JGDEP), en la que se removió completamente el centro catalítico. En esta cepa, se logró la mutación nula de *rsmA* y el fenotipo no mucoide no mostró alteración lo cual apoyaba la validación de la hipótesis anterior.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso generar una fusión cromosomal utilizando como *locus* de recombinación el gen *algD* propiciando al mismo tiempo su mutación. Con el antecedente de Morales (2013) cabría la posibilidad de que la proteína generada fuera parcialmente funcional y que el fenotipo no mucoide se revierta al mutar a *rsmA*, tal como sucedió en la cepa JGDE. Sin embargo, el tamaño del interposón (*gusA*-Gm) (2650 pb) insertado en el gen *algD* disminuye notablemente la posibilidad de que la proteína generada sea funcional.

Se generaron fusiones del gen reportero *gusA*, río abajo de la región reguladora del gen *algD*. Para fines de manipulación, estas construcciones se clonaron en una cepa de *E. coli*, *gusA*⁻. En esta parte es importante destacar que el control de la actividad de genes se manifiesta a diferentes niveles. El uso de fusiones específicas delimita la contribución del control transcripcional o bien, postranscripcional. Se optó por generar dos versiones de la fusión del gen reportero con la región reguladora del gen *algD*, una transcripcional (Fig. 44) y una traduccional (Fig. 45). La diferencia entre estas dos radica en el gen reportero. En la transcripcional el gen *gusA* conserva su propio sitio de unión al ribosoma y del ATG, mientras que la fusión traduccional carece de ambos elementos.

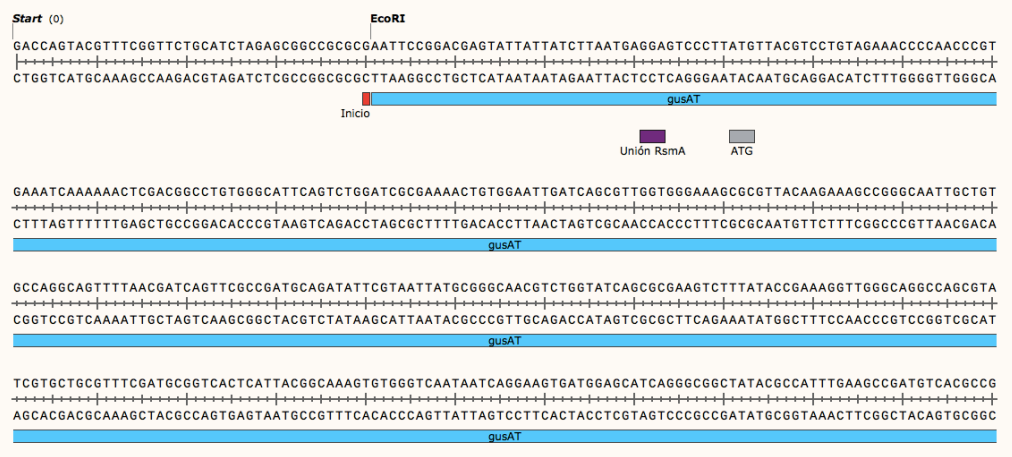


Fig 44 Diagrama del gen *gusA* transcripcional. La secuencia del gen mantiene su propio sitio de unión al ribosoma y su ATG. Esta secuencia del gen reportero se utilizó para realizar la fusión transcripcional.



Fig 45 Diagrama del gen reportero *gusA* en su forma traduccional. En este caso la secuencia que se utilizó para generar las fusiones no conserva su ATG ni su sitio de unión a ribosoma

Las fusiones transcripcional y traduccional, mantenidas en la cepa de *E. coli*, se crecieron en presencia del sustrato Xgluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-ácido b-D-glucurónico) evidenciando la expresión del gen mediante la actividad enzimática de la b-glucuronidasa por un precipitado de coloración azul índigo.

Sin embargo, únicamente la fusión transcripcional mostró actividad enzimática, mientras que la traduccional no presentó la coloración azul que indica la presencia de actividad enzimática. Esto lo atribuimos a la presencia del gen nativo *csrA* de *E. coli*.

Los sistemas de regulación global Csr y su homólogo Rsm, se encuentran presentes en varias especies bacterianas, controlando numerosos genes a nivel postranscripcional. (Romero, 1998). El sistema Csr de *E. coli* está involucrado en la represión de varios procesos en fase estacionaria y la activaciones de algunas funciones en fase exponencial (Romero, 1998). Los tres componentes en el sistema Csr de *E. coli* incluyen la proteína de unión a RNA CsrA y dos RNAs no codificantes, CsrB y CsrC (Romero,1993; Yang,1996; Wang, 2005).

Siendo CsrA el homólogo a RsmA en *E. coli*., la proteína CsrA reconocería los motivos de unión a RsmA presentes en la región promotora del gen *algD*, impidiendo la unión del ribosoma y por consiguiente su traducción. El hecho de que sólo la fusión transcripcional y no la traduccional mostrara actividad enzimática nos da idea de que la regulación por parte de CsrA/RsmA sobre el gen *algD* es a nivel postranscripcional.

Las fusiones cromosomales, transcripcional y traduccional transformadas en *A. vinelandii* cepa E, presentan un fenotipo no mucosido debido a la mutación generada en el gen *algD* (Fig. 35), siendo este gen clave en la síntesis del alginato.

Se evaluó la actividad enzimática en presencia del sustrato Xgluc (Fig. 37). En ambos casos, se observó la presencia de actividad enzimática, visible por el precipitado color azul. Esto lo atribuimos al hecho de que, por una parte el gen *algD* es nativo de *A. vinelandii* por lo que su reconocimiento y regulación por el sistema de regulación Rsm en este fondo genético es esperado, a diferencia de su presencia en un fondo genético diferente, el caso de *E. coli*. Aunado a esto, en *A. vinelandii*, se ha determinado la presencia de 9 RNA'S pequeños pertenecientes al sistema Rsm, contrarrestando la actividad de RsmA, (Manzo, 2011), contrario a *E. coli* que cuenta con dos RNA's que antagonizan la actividad de CsrA.

Una vez obtenidas las fusiones cromosomales *algD::gusAT-Gm* y *algD::gusAPT-Gm* generadas en *A. vinelandii* se prosiguió a conjugar el plásmido pMCY2, que nos permitió sobre-expresar RsmA. Al actuar la proteína RsmA como un regulador negativo, bloquea el sitio de unión a ribosoma de genes blancos, y por consiguiente la expresión de estos se ve disminuida. El gen *algD* es clave en la síntesis de alginato y su expresión se encuentra regulada. Si el sistema Rsm forma parte de esta regulación, y RsmA regula de manera negativa al gen en cuestión como indicaban las evidencias previas a este trabajo, era de

esperar que una sobreexpresión de RsmA propiciaría una disminución en la expresión de *algD*.

Para determinar que el efecto de RsmA sobre la producción del polímero se atribuye a la regulación que se ejerce por la proteína sobre el gen *algD*, se determinó la actividad enzimática de la b-glucoronidasa. Para tal fin se comparó la expresión del gen *algD* en las fusiones cromosomales contra las transconjugantes, a través de la actividad enzimática del gen reportero *gusA* en presencia del sustrato PNPG (p-Nitrofenil-β-D-glucurónido). De este ensayo, se esperaba que la sobreexpresión de RsmA propiciara una disminución de la expresión del gen *algD*. La disminución en la expresión del gen se reflejaría en una disminución en la actividad enzimática. El comportamiento obtenido en el experimento coincidió con las evidencias. En las fusiones traduccionales la actividad enzimática se vio disminuida cuando se sobre-expresa *rsmA* en un 70% respecto a la fusión cromosomal sin el plásmido conjugado, así como a la fusión cromosomal traduccional que porta el plásmido vacío. Esto nos indica que RsmA tiene efecto sobre la expresión del gen *algD* y que este efecto es negativo. En el caso de las fusiones transcripcionales, se esperaba que no hubiera efecto por parte de RsmA sobre la expresión del gen *algD*, es decir que la actividad enzimática no mostraría alteración. Esto debido a que las fusiones transcripcionales conservan el sitio de unión a ribosoma y el ATG propios del gen reportero, permitiendo la expresión del gen sin ningún problema. Sin embargo, también poseen el ATG y el sitio de unión a ribosoma presentes en la región reguladora del gen *algD*. Así pues, cabía la probabilidad de que RsmA reconociera los motivos de unión propios de *algD* y que por lo tanto la expresión del gen no se presentara. Al comparar los resultados de las mediciones de actividad en las fusiones transcripcionales y las transconjugantes de estas fusiones, observamos que la actividad enzimática se veía afectada, disminuyendo en un 56% respecto a la fusión con el plásmido vacío. Estos resultados los atribuimos a una situación de probabilidad en la que cabe la posibilidad de que RsmA reconozca los motivos de unión del gen *algD*, propiciando la degradación del gen.

IX CONCLUSIÓN

RsmA ejerce un efecto regulador sobre la expresión del gen *algD* a nivel postranscripcional y este efecto es negativo.

X PERSPECTIVAS

- Generar la mutación de *rsmA* en las fusiones cromosomales, para evaluar el efecto de pérdida de función de *rsmA* sobre la expresión del gen *algD*.
- Evaluar el efecto de la expresión de *rsmA* sobre la expresión del gen *algD* de manera controlada, es decir, utilizar un promotor inducible que nos permita regular el grado de expresión de *rsmA*.

XI BIBLIOGRAFÍA

Aarons, S., Abbas, A., Claire, A., Fenton, A., & O'gara, F. (2000). A Regulatory RNA (PrrB RNA) Modulates Expression of Secondary Metabolite Genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, 182 (14), 3913–3919.

Babitzke, Paul, Romeo Tony (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 10,(2), 156-163.

Baker Carol S., Morozov Igor, Suzuki Kazushi, Romeo Tony, Babtcke Paul (2002). CsrA regulates glycogen byosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* , 44, 1599-1610.

Bekker, M. Teixeira de Mattos, M.J., Hellingwerf K.J. (2006). The role of two component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci Prog* , 89, 213-242.

Blumer Caroline, Heeb Stephan, Pessi Gabriella, Haas Dieter (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific robosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Science* , 96(24), 14073-14078.

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. *Molecular Microbiology* , 73 (3), 434–445.

Campos M., Martínez-Salazar J., LLoret L., Moreno Soledad, Núñez Cinthia, Espín Guadalupe (1996). Characterization of the Gene Coding for GDP-Mannose Dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* , 178 (7), 1793–1799.

Castañeda Miguel, Guzmán Josefina, Moreno Soledad, Espín Guadalupe (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* , 182(9), 2624-2628.

Castañeda Miguel, Sánchez Judith, Moreno Soledad, Núñez Cinthia, Espín Guadalupe (2001). The global regulators GacA and sigma (σ) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* , 183(23), 6787-6793.

Chang, Woo-Suk, van de Mortel Martijn, Nielsen Lindsey, de Guzmán Gabriela Nino, Li Xiaohong, Halverson Larry J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* , 189(22), 8290-8299.

Clementi , Franceses (1997). Algnate Production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology* , 17 (4), 327-361.

Cocotl, Y. M. (2007). Caracterización del gen *rsmA* involucrado en la síntesis de alginato y PHB en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Dubey Ashok K., Baker Carol S., Suzuki Kazushi, Jones A. Daniel, Pandit Pallavi, Romeo Tony, Babitzke Paul ((2003). CsrA Regulates Translation of the *Escherichia coli* Carbon Starvation Gene, *cstA*, by Blocking Ribosome Access to the *cstA* Transcript. *Journal of Bacteriology*, 185(15), 4450-4460.

Ertesvag Helga, Hoidal Hilde Kristin, Hals Ingrid Kathrin, Rian Anne, Doseth Berit, Valla Svein (1995). A family of modular type mannuronan C-5 epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol*, 16, 719-731.

Funami, T. F. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1746-1756.

Galindo Enrique, Peña Carlos, Núñez Cinthia, Segura Daniel, Espín Guadalupe (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6 (7).

Gao R, Mack TR, Stock AM (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci*, 32, 225-234.

Gottesman, S. (1984). Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annual Review of Genetics*, 18, 415-441.

Halverson, L. (2009). Role of alginate in bacterial biofilms. *In Alginates: Biology and Applications*, 135-151.

Hay L., Wang Y., Moradali M., Rehman Z., & Rehm B. (2014). Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology*.

Hay, I. D. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*.

Heeb, S., Blumer, C., & Haas, D. (2001). Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gramnegative Bacteria. *The American Phytopathological Society*, 14 (12), 1351-1363.

Hernández, E. L. (2005). Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente. *Revista Cubana de Química*, 17 (3), 239-240.

Hitchins, V. M. (1970). Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 104, 492-498.

Isidro Coxca, M. I. (Junio de 2015). Estudio del efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura en Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Kay Elisabeth, Dubuis Christohe, Haas Dieter (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102, 17136-17141.

- Kulkarni Prajna R., Cui Xiaohui, Williams Joshua W., Stevens Ann M., Kulkarni Rahul V. (2006). Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Research* , 34, 3361-3369.
- Lapouge, K., Schubert, M., Hallain, F., & Hass, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ - proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology* , 67(2), 241–253.
- Learn D B, Brestel EP, Seetharama S. (1987). Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect Immun* , 55, 1813-1818.
- Lenz, D. M. (2005). CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* , 58, 1186-1202.
- Liu Mu Ya, Gul Gojun, Wei Bangdong, Preston James F. Oakford Lawrence, Yuksel Umit, Gledroc David P., Romeo Tony (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* , 272, 17502-17510.
- Liu Mu Ya, Yang Honghui, Romeo Tony (1995). The product of pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulate glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *Journal of Bacteriology* , 177, 2663-2672.
- Lloret, L., Barreto, R., León , R., Moreno, S., Martínez-Salazar, J., Espín , G., et al. (1996). Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters . *Molecular Microbiology* , 449-457.
- López-Munguía, A. B. (1993). *Biopolímeros* (Vol. 13). Limusa.
- Maldonado, R. J. (1994). Changes of Ploidy during the *Azotobacter vinelandii* Growth cycle. *Journal of Bacteriology* , 176 (13), 3911-3919.
- Mancini, Marco, Moresi Mauro. (1999). Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. *Journal of Food Engineering* , 39 (4), 369-378.
- Manzo, J. C.-Y. (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* , 21, 147-159.
- May, T. S. (1994). Identification of amino-acid residues involved in the activity of phosphomannose isomerase-guanosine-5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase-a bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic-pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* , 269, 4872-4877.
- Mejía-Ruíz, H., Guzmán, J., Moreno, S., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (1997). The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter . *Gene* , 271-277.
- Morales, I. Paulina. (Septiembre de 2013). Generación y caracterización de mutantes *rsmA* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Morales Ruiz, Estefania (2013). Estudio de pequeños RNA's reguladores involucrados en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura en Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Murillo-Álvarez, J. Hernández-C. (2007). Composition and Sequence of Sodium Alginate Extracted at Pilot Plant Scales from three Commercially Important Seaweed from México. *Journal of Applied Phycology*, 19 (5), 545-548.
- Navarro da Silva Adriana, García- Cruz Crispin Humberto (2010). Biopolymers by *Azotobacter vinelandii*. (M. Elnashar, Ed.) *INTECH*.
- Neidhardt, F. S. (1996). *Regulation beyond the operon* (Vol. 2). (F. C. Neidhardt, Ed.) Washington, EUA: American Society for Microbiology Press.
- Nivens DE, Ohmam DE, Williams J, Franklin MJ. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomona aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol*, 183, 1047-1057.
- Nixon, B. R. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 566-569.
- Page, W. J. (1975). Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 122, 145-151.
- Parkinson, J. K. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet*, 26, 71-112.
- Peña Malacara, C. F. (2013). La Belleza de una bacteria, el caso de *Azotobacter vinelandii*. *Hypatia-Revista de Divulgación Científico-Tecnológica del Estado de Morelos* (42), 27.
- Perraud, A. L. (2000). Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim Biophys*, 1478, 341-354.
- Quiroz R., E. Y. (Diciembre de 2012). Estudio de la posible función del sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Cuernavaca, Morelos, México.
- Reddy-K, R. y.-P. (2010). Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*, 2 (4), 2198-2203.
- Rediers, H. V. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a Pseudomonas in disguise? *Microbiology*, 150, 1117-1119.
- Rehm, B. V. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. (B. V. Rehm, Ed.) *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, 281-288.
- Remminghorst Uwe, Rehm Bernd H.A. (2006). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomona aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 298-305.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology*, 29, 1321-1330.

- Romeo, T. G. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, 175, 5740-5741.
- Roychoudhury, S. M. (1989). Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase-a key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 264, 9380-9385.
- Sadoff, H. (1975). Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39 (4), 516-539.
- Setubal Joao C., dos Santo Patricia, Goldman Barry S., Ertesvag Helga, Espin Guadaupe, Rubio Luis M., Valla Svein, Almeida Nalvo F., Balasubramanian Divya, Cromes Lindsey, Curatti Leonardo, Du Zijin, Godsy Eric, Goodner Brad, Hellner-Burris Kaitlyn, Hernández José A., Houmiel Katherine, Imperial Juan, Kennedy Christina, Larson Timothy J. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191, 4534-4545.
- Shinabarger, D. B. (1991A). Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho- D- mannose pyrophosphorylase- a bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic-pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 266, 2080-2088.
- Skjak-Brake, G. G. (1996). Chemistry and physical properties of alginates. *Carbohydr Eur*, 14, 6-13.
- Smidrod, O. D. (1996). Chemistry and Properties of Alginates. *Carbohydrate in Europe*, 14, 6-14.
- Reddy K Ravindra, Reddy P Sabitha. (2010). Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*, 2 (4), 2198-2203.
- Rediers, H. V. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, 150, 1117-1119.
- Rehm, B. V. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. (B. V. Rehm, Ed.) *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, 281-288.
- Remminghorst, U. R. (2006). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 298-305.
- Roychoudhury, S. M. (1989). Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase-a key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 264, 9380-9385.
- Romeo T., Gong M. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, 175, 5740-5741.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology*, 29, 1321-1330.
- Tavares, I. L.-C. (1999). Pattern of changes in the activity of enzymes of GDP-D-mannuronic acid synthesis and in the level of transcription of *algA*, *algC* y *algD* genes accompanying the loss and emergence of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*, 150, 105-116.

Tatnell, P. R. (1994). GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. *Microbiology* , 140 (7), 1745-1754.

Timmermans, J. V. (2009). Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , 191 (5), 1722-1724.

Wei Bangdong L., Brun-Zinkernagel Brun, Smecka Jerry W., PruB Birgit M., Babitzke Paul, Romeo Tony (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* , 40, 245-256.

Winogradsky, S. (1938). Sur la morphologie et l'oecologie des *Azotobacter*. . *Ann. Inst. Pasteur* , 60, 351-400.

Zielinski, N. C. (1991). Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encoding phosphomannomutase. *J Biol Chem* , 266, 9754-9763.