



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

---

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**Estudio de la cinasa histidínica RpfC2 de *Azotobacter*  
*vinelandii***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

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

**PRESENTA:**

Q.F.B. Ana Laura Rodríguez Antonio

**ASESOR DE TESIS:**

D.C. Miguel Castañeda Lucio

Puebla, Pue.

Febrero 2015

# Índice

## Resumen

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
I.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	1
I.2 Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i> .	2
I.3 Alginato.	3
I.3.1 Composición, aplicación y función biológica.	3
I.3.2 Biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .	4
I.3.3 Genética de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .	5
I.4 Sistemas de transducción de señales de doble componente.	6
I.4.1 El sistema de doble componente GacS/GacA.	8
I.4.2 El sistema GacS/GacA en <i>A. vinelandii</i> .	9
I.5 El sistema de regulación post-transcripcional CsrA/B (RsmA/X/Y/Z)	10
<b>II. Antecedentes</b>	<b>12</b>
II.1 El sistema Rpf de <i>Xanthomonas campestris</i> .	16
<b>III. Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>IV. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>V. Resultados</b>	<b>22</b>
<b>VI. Discusión</b>	<b>34</b>
<b>VII. Conclusión</b>	<b>41</b>
<b>VIII. Perspectivas</b>	<b>42</b>
<b>IX. Bibliografía</b>	<b>43</b>
<b>X. Material y Métodos</b>	<b>48</b>
X.1 Material biológico.	48
X.2 Oligonucleótidos.	49

X.3 Medios de cultivo.	49
X.4 Antibióticos.	51
X.5 Manipulación de ácidos nucleicos.	51
X.6 PCR	52
X.7 Precipitación de DNA con glucógeno.	52
X.8 Ligación de DNA.	53
X.9 Electroporación de <i>E. coli</i> .	53
X.10 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .	53
X.11 Cuantificación de alginato (Método de Carbazol).	54
X.12 Cuantificación de proteína (Método de Bradford).	55
X.13 Cuantificación de biopelículas.	55
X.14 Ensayo de movilidad.	56

## Resumen

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria de vida libre, aerobia, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno, y produce un polímero de uso industrial, los alginatos.

Al igual que otras bacterias, *A. vinelandii* contiene contra los cambios ambientales a través de sistemas de transducción de señales de doble componente; uno de ellos es el sistema GacS/A, que a su vez regula a otros sistemas como el sistema de control post-transcripcional Rsm. *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria filogenéticamente ligada a nuestro modelo de estudio, cuenta con un sistema de transducción de señales homólogo a GacS/A, además de otras cinasas histidínicas llamadas LadS y RetS involucradas en esta cascada de señalización, que participa en el control de la transcripción del pequeño RNA regulador RsmZ, un antagonista del represor traduccional RsmA. Se realizó una búsqueda de homólogos de las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS de *P. aeruginosa* en el genoma de *A. vinelandii*, arrojando la búsqueda 6 proteínas, entre las que se encontraba LadS2. LadS2 además de presentar homología con GacS presenta homología RpfC de *Xanthomonas campestris*, Analizando el contexto genómico de *ladS2* se encontró río abajo un *orf* que codifica para un regulador de respuesta putativamente homólogo Rpf. Lo cual, apoya la idea que *ladS2* es una cinasa homóloga a RpfC, por lo anterior se le cambió el nombre a la cinasa nombrándola RpfC2.

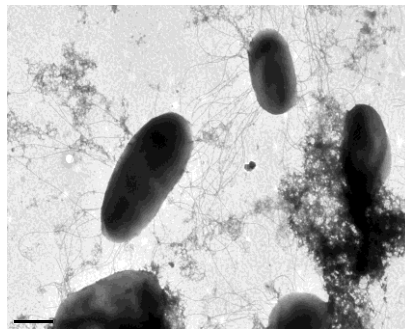
Se obtuvieron mutantes polar y no polar de RpfC2, al igual que de su regulador de respuesta llamado RpfL y se caracterizaron en relación a su producción de alginato, formación de biopelículas, movilidad y enquistamiento. Los resultados obtenidos colocan al sistema RpfC2/RpfL en la regulación de la síntesis de alginato y formación de biopelículas en *A. vinelandii*, muy probablemente controlando los niveles del segundo mensajero di-GMPc.



# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

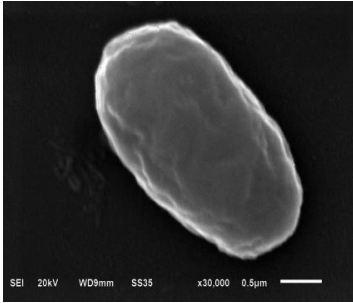
*Azotobacter vinelandii* es una  $\gamma$ -proteobacteria de vida libre perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, posee flagelos peritricos que le confieren movilidad, es gramnegativa y pleomórfica: va desde 1.5 a 2 $\mu$ m de diámetro; es aerobia pero capaz de crecer en concentraciones bajas de oxígeno (Fig. 1). Además de ser una bacteria quimiorganotrófica, ya que utiliza azúcares, alcoholes y sales orgánicas para crecer, *A. vinelandii* es poliploide. Puede tener hasta 80 copias de su cromosoma; su genoma tiene un tamaño de 5.36 Mb con un contenido de Guaninas-Citocinas de 65.68%. No posee plásmidos endógenos, pero puede recibir DNA exógeno mediante conjugación o transformación (Bergey *et al.* 2001).



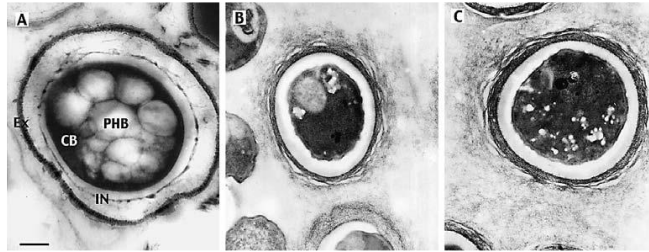
**Fig. 1.** *Azotobacter vinelandii* (microscopía electrónica de transmisión).

Entre las características que posee esta bacteria destacan, su capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno; la diferenciación morfológica que sufre en condiciones adversas formando quistes; y la producción de dos polímeros de uso industrial, el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y el polisacárido extracelular alginato (Fig. 2) (Galindo *et al.* 2007).

A)



B)



**Fig. 2.** A) Cubierta de alginato de *A. vinelandii* en fase vegetativa (microscopía electrónica de barrido). B) Quistes con gránulos de PHB en *A. vinelandii* (microscopía electrónica de transmisión).

## I.2 Ciclo de vida de *A. vinelandii*

*A. vinelandii* presenta dos fases en su ciclo de vida, una fase vegetativa y una fase de latencia (Fig. 3).

Cuando inicia el proceso de diferenciación, las células pierden sus flagelos y se inicia una última división celular donde se generan dos células esféricas. Hay un engrosamiento en sus paredes, dejando un quiste resistente, cuyo cuerpo central (formado principalmente por gránulos de PHB) está rodeado por una capa interna (intina), y otra externa (exina), ambas compuestas de alginato (13% y 32% respectivamente) y de lipoproteínas (Sadoff, 1975).

Cuando el quiste germina, el cuerpo central aumenta de tamaño, ocupando el volumen de la intina, y provocando la fractura de la exina; posteriormente, sufre un proceso de división generando dos células hijas, que no presentan movilidad, pero que la recuperan terminada la germinación.

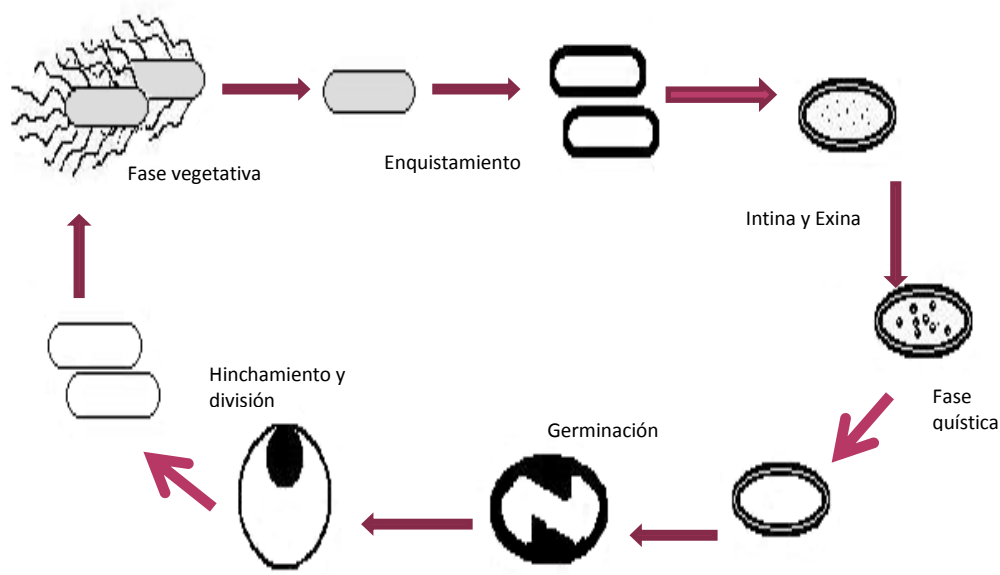


Fig. 3. Ciclo de vida de *A. vinelandii* (Modificado de Sadoff, 1975).

### I.3 Alginato.

#### I.3.1 Composición, aplicación y función biológica.

Los alginatos son copolímeros lineares compuestos por monómeros de ácido manurónico y ácido gulurónico unidos por enlaces  $\beta(1-4)$ ; dichos monómeros se distribuyen en bloques de residuos de manuronato (bloques M), guluronato (bloques G), o residuos alternos (bloques M-G). (Rehm *et al.* 1997).

En presencia de  $Ca^{++}$  u otros cationes divalentes, los alginatos tienen la capacidad de formar geles termoirreversibles (Clementi, 1997). La variabilidad en la distribución y contenido de gulurónico y manurónico, da como resultado alginatos con diferente capacidad de gelificación.

Los alginatos son ampliamente utilizados en la industria, principalmente como estabilizantes, viscosificantes, emulsificantes y gelificantes (Clementi, 1997). Los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* han sido caracterizados como productores de alginato (Rehm, 1996). En *P. aeruginosa*, los alginatos parecen ser un factor de

virulencia importante al estar involucrado en la formación de biopelículas. Esto tiene relevancia médica al ser un patógeno oportunista (Muhammadi *et al.* 2007).

En *A. vinelandii*, los alginatos actúan como una barrera protectora contra metales pesados y otras condiciones ambientales, participan en el intercambio de iones y como barrera de difusión de oxígeno en la formación del quiste y en fase vegetativa ayudan en la adherencia de la bacteria a superficies mediante formación de biopelículas (Sabra *et al.* 2001).

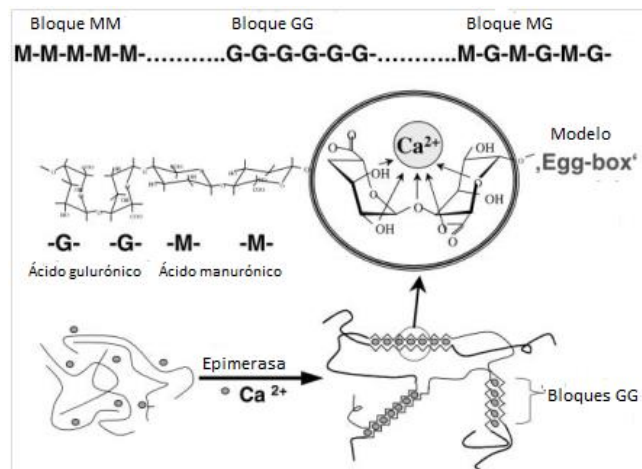
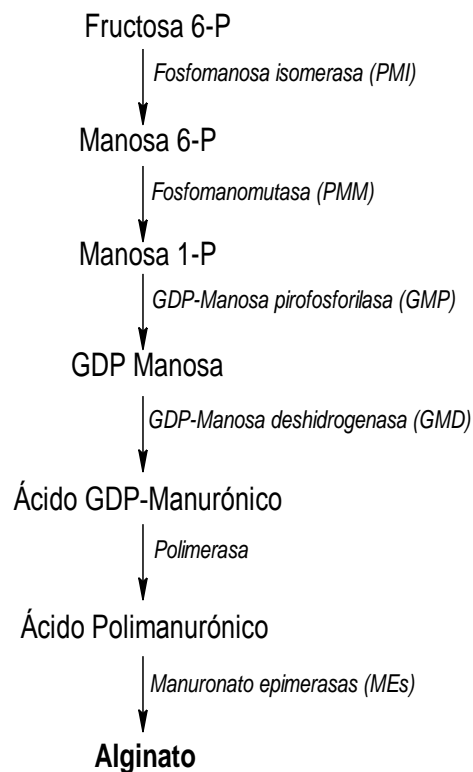


Fig. 4. Composición del alginato (Tomado de Sabra *et al.* 2001)

### I.3.2 Biosíntesis de alginatos en *A. vinelandii*.

La biosíntesis de alginatos en *A. vinelandii* utiliza como sustrato inicial a la fructosa-6-P, de manera directa u obtenida por reciclaje de triosas provenientes de la vía Entner Doudoroff. La fructosa-6-P es convertida a ác. GDP-manurónico, teniendo como intermediarios manosa 6-P, manosa 1-P y GDP-manosa (Fig. 5) (Campos *et al.*, 1996). La síntesis de ácido GDP-manurónico es un punto de control muy importante en la producción alginatos, ya que el ácido GDP-manurónico, además de ser el precursor directo del polímero, es también un precursor importante en la síntesis de lipopolisacáridos (Gaona *et al.* 2004). El

ácido GDP-manurónico es polimerizado a nivel de membrana interna, formando ácido polimanurónico. Algunos residuos son acetilados por una aciltransferasa y es exportado de la célula. Una vez fuera, algunos residuos no acetilados son epimerizados a ácido gulurónico por la enzima C-5 epimerasa produciéndose así los alginatos (Sabra *et al.* 2001).



**Fig. 5.** Biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* (Clementi, 1997).

### I.3.3 Genética de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

En *A. vinelandii*, los genes que codifican las enzimas involucrados en la síntesis de alginato han sido caracterizados en su totalidad. Los genes biosintéticos se encuentran agrupados en cuatro unidades transcripcionales. El gen *algD*, que codifica la GDP-manosa deshidrogenasa es transcrito a partir de tres posibles promotores, uno de ellos (P1) es  $\sigma^E$  dependiente, mientras que el segundo

promotor (P2) presenta secuencia consenso típica de promotores  $\sigma^{70}$  (Campos *et al.* 1996).

Los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* se encuentran agrupados en un operón localizado inmediatamente debajo de *algD*. Sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato. Inmediatamente después se encuentra el operón *algGXLVIFA*, *alg G* codifica para una epimerasa; *algL* para una alginasa; los productos de *algX*, *algV* *algI* y *algF* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos; *algA* codifica para la enzima que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a manosa 6-fosfato y para la conversión de manosa 1-fosfato a GDP-manosa (Fig. 6).

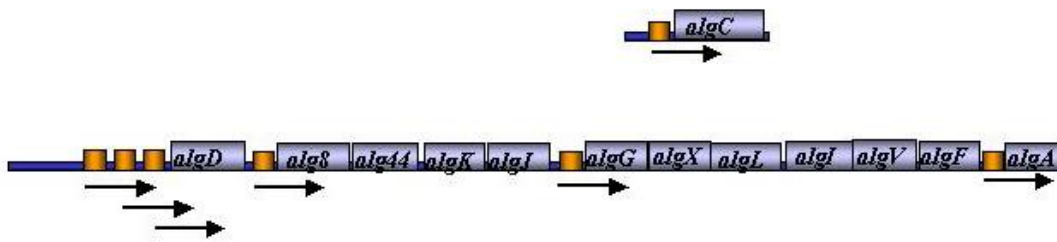


Fig. 6. Genes involucrados en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

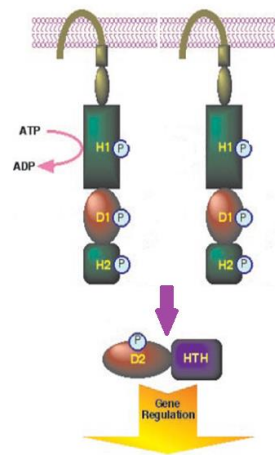
#### I.4 Sistemas de transducción de señales de doble componente

Para que las bacterias sobrevivan en el entorno en que se encuentren, deben continuamente contender contra cambios y condiciones que incluso las pueden llevar a un estado de estrés, tal como un aumento o disminución de pH, cambios en la osmolaridad, temperatura, entre otros. Es por ello que han desarrollado mecanismos que les ayudan a detectar los cambios y actuar contra estas variaciones ambientales.

Tal es el caso de los sistemas de transducción de señales de doble componente, en los que dos proteínas se ven involucradas, una tiene actividad cinasa y

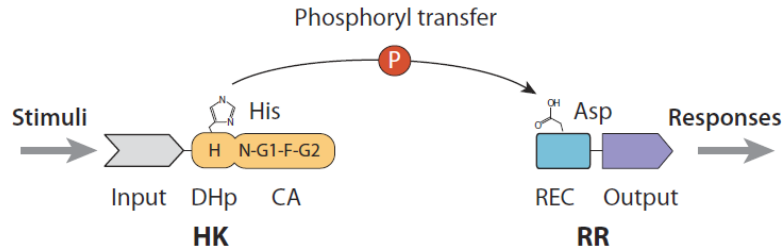
generalmente tiene un residuo de histidina, por lo que es denominada cinasa histidínica (HK) y la otra proteína es un regulador transcripcional que se conoce como regulador de respuesta (RR).

Las HK pueden responder a diferentes estímulos y expresar esta respuesta en fenotipos variables, pero la manera en que activan su mecanismo de regulación es similar, poseen un dominio de entrada y un dominio transmisor, que a su vez cuenta con dos subdominios, uno de dimerización y el otro catalítico. El dominio de entrada es el encargado de detectar la señal o estímulo del medio en el que se encuentre, lo que promueve un cambio conformacional y una fosforilación dependiente de ATP. Esta fosforilación ocurre en el residuo de histidina presente en el dominio transmisor, y es una fosforilación cruzada, por lo que se realiza formando homodímeros (Fig. 7) (Parkinson *et al.* 1992).



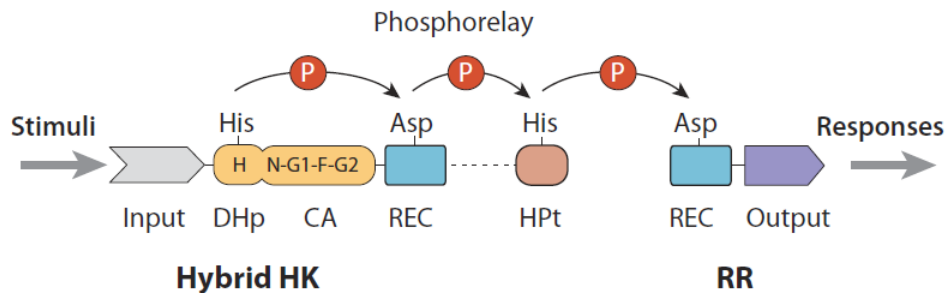
**Fig. 7.** Formación de homodímero en un sistema de doble componente.

Por su parte, los RR interactúan con la HK a través de su dominio receptor, que cuenta con un residuo de ácido aspártico y que es capaz de tomar el grupo fosfato proveniente de la HK, modulando así la actividad de respuesta (Fig. 8). La mayoría de los RR poseen motivos de unión a DNA (Parkinson *et al.* 1992).



**Fig. 8.** Dominios de las HK y los RR de los sistemas de doble componente (Tomado de Gao *et al.* 2009).

Actualmente, se sabe que existen HK que además de los dominios convencionales, poseen un dominio receptor similar al de los RR, y un dominio transmisor o Hpt que tiene un residuo de histidina. A estas cinasas se les conoce como HK multidominios, híbridas o no ortodoxas. El hecho de poseer tantos dominios, permite un mejor control en la regulación de la cascada de señalización (Fig. 9).



**Fig. 9.** Dominios de las HK híbridas o no ortodoxas de los sistemas de doble componente (Tomado de Gao *et al.* 2009).

#### I.4.1 El sistema de doble componente GacS/GacA

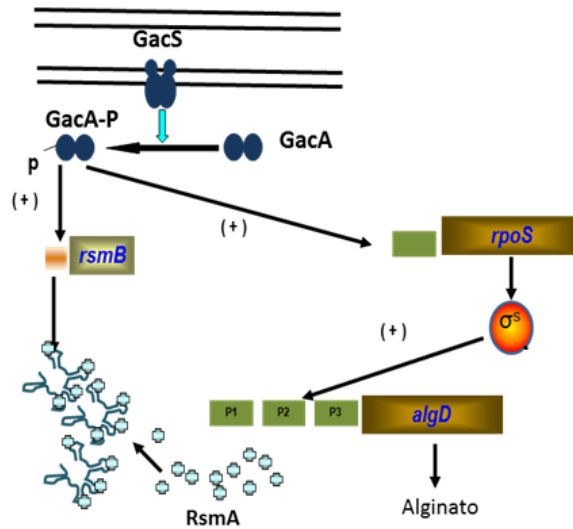
Uno de los sistemas de transducción de señales empleado por bacterias gramnegativas, es el sistema de doble componente GacS/GacA. La importancia de este sistema radica en que a su vez ejerce control sobre otros, hasta ahora descritos el sistema de *Quórum Sensing* (QS), RpoS y el sistema de regulación

post-transcripcional RsmA/X/Y/Z, regulando la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares involucradas en la patogenicidad de plantas y animales, tolerancia al estrés, entre otros. (Heeb *et al.* 2001).

GacS se ha descrito como una HK híbrida, con un dominio de entrada en el extremo N-terminal, que contiene dos motivos transmembranales separados por un asa periplásmica, un dominio transmisor, un dominio receptor y un dominio HPT. GacA, por su parte, tiene dos dominios, un dominio receptor y un dominio de salida que contiene un motivo de unión a DNA de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH). Se sabe que la HK GacS responde a ácidos grasos de cadena corta y que junto con su RR GacA, regulan la producción de exopolisacáridos (EPS), biopelículas, etc.

#### **1.4.2 El sistema GacS/GacA en *A. vinelandii***

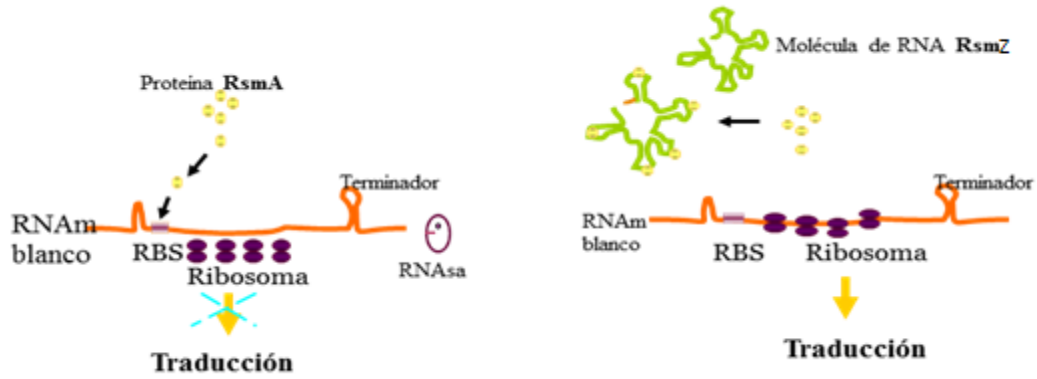
El sistema de doble componente GacS/GacA en *A. vinelandii* es un regulador positivo de la síntesis de alginato, lo hace controlando la transcripción del gen *algD* (codifica para GDP-manosa deshidrogenasa, enzima clave en la biosíntesis de alginato). La regulación se ejerce a dos niveles, controlando transcripcionalmente la expresión del gen *rpoS* que codifica para el factor sigma S. Este factor sigma controla la transcripción del gen *algD* a partir de uno de sus tres promotores (Castañeda *et al.*, 2001). El otro nivel de regulación que controla el sistema GacS/A es el postranscripcional, GacS/A controlan la expresión de una familia de pequeños RNAs reguladores (de la familia Rsm) que contrarrestan la unión de la proteína RsmA al sitio de unión a ribosoma del mensajero del gen *algD*. RsmA es una proteína represora que al unirse a sus RNAm blanco impide su unión al ribosoma, imposibilitando su traducción (Fig. 10) (Manzo *et al.* 2012).



**Fig. 10.** Regulación de la síntesis de alginato a través de la cascada de señalización GacS/GacA (Manzo *et al.* 2011; Castañeda *et al.* 2001).

### I.5 El sistema de regulación postranscripcional CsrA/B (RsmA/X/Y/Z)

El sistema Rsm está constituido por la proteína RsmA y los pequeños RNAs reguladores, que en el género *Pseudomonas* se denominan RsmX/Y/Z (Kay *et al.* 2005). El mecanismo de acción de RsmA se centra en su unión a una región cercana al sitio de unión al ribosoma (RBS) de sus blancos de regulación (Lapouge *et al.* 2008). Esta unión de la proteína RsmA al mRNA blanco, impide la traducción y promueve la degradación del RNA. Los pequeños RNA reguladores, con estructura característica de tallo y asa, antagonizan la función de la proteína RsmA. Esto sucede porque las aspas de los pequeños RNA reguladores poseen una secuencia consenso que son reconocidas por la proteína RsmA, propiciando su unión y dejando libre al RNA mensajero, lo que posibilita su traducción (Fig. 11) (Baker *et al.* 2007; Romeo, 1998).



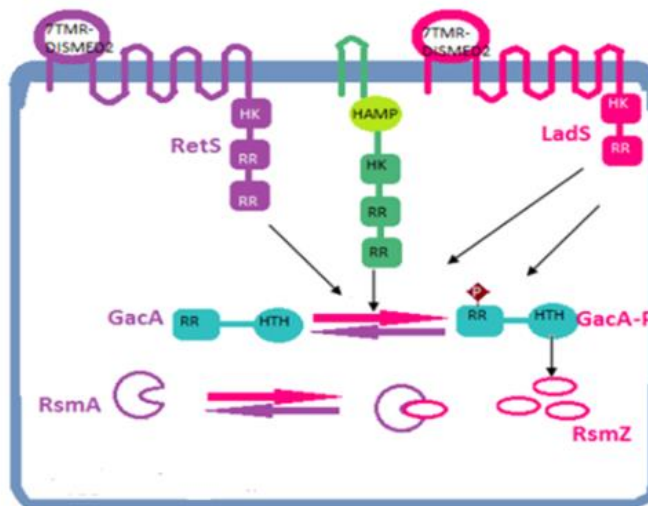
**Fig. 11.** Modelo de regulación post-transcripcional del sistema CsrA/B (RsmA/RsmX/Y/Z)  
(Modificado de Romeo, 1998).

Como se mencionó anteriormente, en *A. vinelandii* el sistema GacS/A regula positivamente la expresión de los genes que codifican para los sRNAs de la familia Rsm. Hechos similares han sido descritos en otras especies de la familia *Pseudomonadacea* y en enterobacterias.

## II. ANTECEDENTES.

En *P. aeruginosa* dos cinasas histidínicas, RetS y LadS, controlan la expresión de genes del sistema de secreción tipo III y la formación de biopelículas. Estas HK forman parte también de la cascada de señalización GacS/GacA y en conjunto con el sistema RsmA/RsmX/Y/Z, regulan la virulencia en la bacteria (Fig. 12).

Se ha descrito que RetS forma heterodímeros con GacS, GacS-RetS, bloqueando la fosforilación de GacS, ya que se interrumpe la formación del homodímero GacS-GacS, lo que provoca la inactivación del RR GacA e impide que actúe sobre RsmZ, su blanco de regulación. Por el contrario, en presencia de LadS, GacA se fosforila y activa la transcripción del pequeño RNA regulador RsmZ, lo que resulta en un cambio de un estado de infección aguda a un estado de infección crónica en *P. aeruginosa* (Goodman *et al.* 2009).



**Fig. 12.** Esquema de interacción entre el sistema GacS/GacA, las HK RetS y LadS y el pequeño RNA regulador RsmZ (Modificado de Ventre *et al.* 2006).

Dada la cercanía filogenética existente entre *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*, se realizó la búsqueda de homólogos a RetS y LadS en *A. vinelandii*. En el algoritmo BLASTX se utilizó el dominio transmisor de las proteínas RetS, LadS y GacS de *P. aeruginosa* como patrón de comparación, esto debido a que se buscaban HK capaces de formar heterodímeros con GacS en *A. vinelandii* (la formación del heterodímero ocurre en el subdominio de dimerización que se encuentra en el dominio transmisor).

La búsqueda arrojó un homólogo a RetS, dos homólogos a GacS, nombrados GacS2 y GacS3; y tres homólogos a LadS, llamados originalmente LadS1, LadS2 y LadS3 (Fig. 13). En *P. aeruginosa*, las HK RetS y LadS poseen siete segmentos transmembranales (7TMR-DISM\_7TM) y un subdominio de unión 7TMR-DISMED2, seguido de un dominio transmisor y un dominio receptor para el caso de LadS, mientras que RetS posee dos dominios receptores. Ambas proteínas carecen del dominio Hpt. Por el contrario, las HK encontradas en *A. vinelandii*, no presentan en el dominio de entrada los siete segmentos transmembranales (7TMR-DISM\_7TM) ni el subdominio 7TMR-DISMED2. En su lugar poseen un dominio transmembranal típico flanqueando un asa periplásmica, pero de igual modo, los dominios transmisores se parecen a los de las HK RetS y LadS de *P. aeruginosa* y también carecen del dominio Hpt.

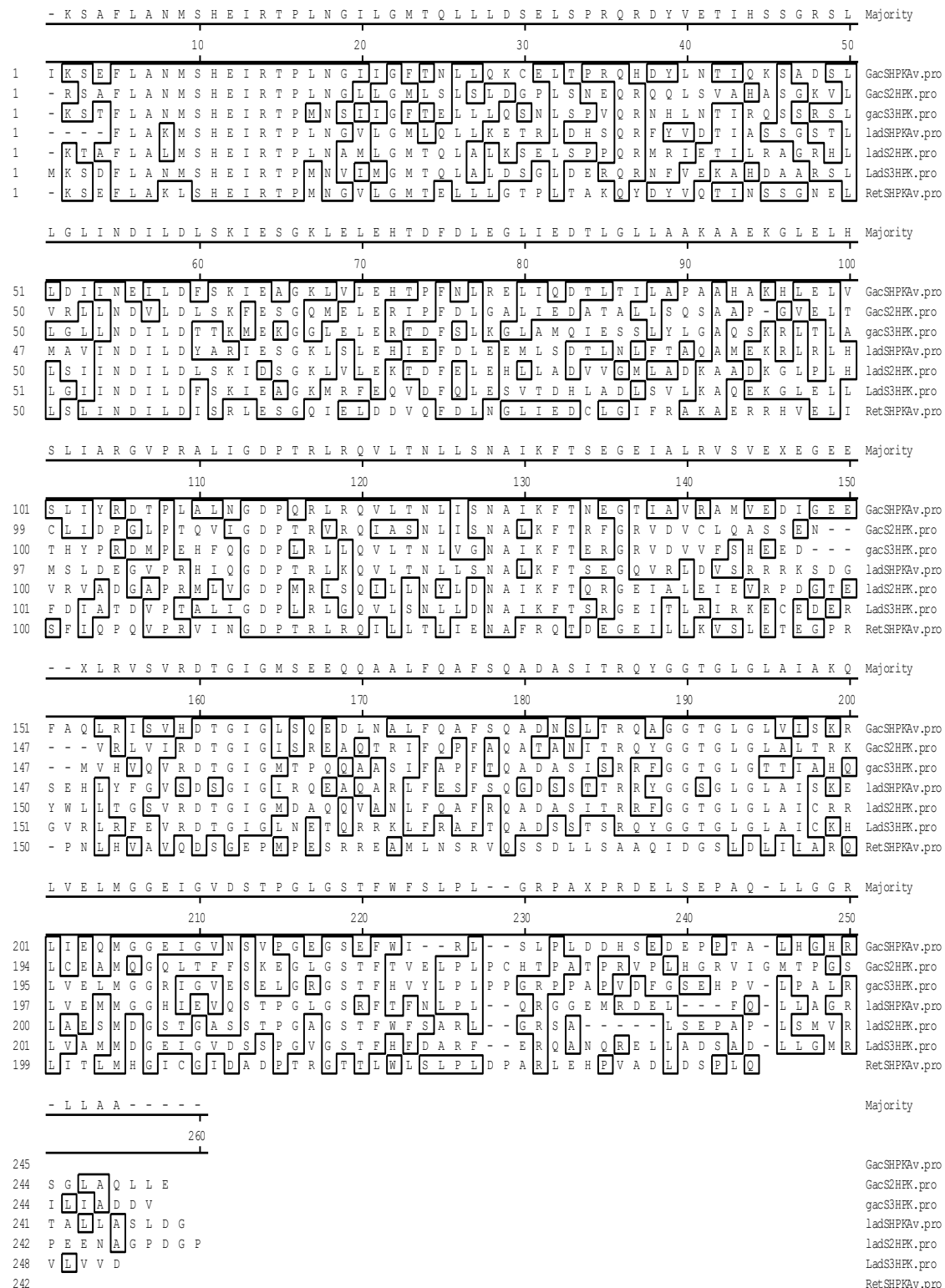
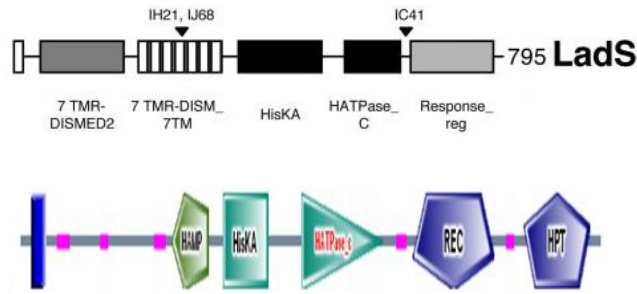


Fig. 13. Alineamiento de los dominios transmisores de las cinasas histidínicas GacS, RetS y LadS en *A. vinelandii* (Gallegos, 2010).

Una búsqueda más detallada de dominios utilizando el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) reveló que algunas de las HK encontradas, sí contaban con un dominio de fosfotransferencia (Hpt). Tal es el caso de LadS2, que posee los dominios característicos de su homólogo putativo en *P. aeruginosa*, más un dominio Hpt (Fig. 14).



**Fig. 14.** A) Dominios de la HK LadS en *P. aeruginosa*. B) Dominios de la HK LadS2 en *A. vinelandii*.

Este hallazgo nos hizo cuestionar si la HK LadS2 se trataba realmente de un homólogo a LadS de *P. aeruginosa* e incentivó a una nueva búsqueda bioinformática. Se empleó el algoritmo BLASTP, teniendo como patrón de comparación a la secuencia completa de la proteína LadS2, con esta estrategia se obtuvo un *score* significativo con la HK GacS y la HK RpfC de *Xanthomonas campestris* (Fig. 15).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Links
<a href="#">P59342.1</a>	RecName: Full=Signal transduction histidine-protein kinase BarA	230	309	58%	3e-65	
<a href="#">P04EC7.1</a>	RecName: Full=Signal transduction histidine-protein kinase BarA_xsp/P04E	230	309	57%	4e-65	
<a href="#">P48027.1</a>	RecName: Full=Sensor protein gacS	233	311	70%	9e-64	
<a href="#">O80526.1</a>	RecName: Full=Autoinducer 2 sensor kinase/phosphatase luxQ	232	232	49%	2e-63	
<a href="#">O7MD16.1</a>	RecName: Full=Autoinducer 2 sensor kinase/phosphatase luxQ	232	232	49%	2e-63	<a href="#">G</a>
<a href="#">P0C0F5.2</a>	RecName: Full=Sensor/regulatory protein RpfC	224	224	60%	2e-61	
<a href="#">P0C0F7.2</a>	RecName: Full=Sensor/regulatory protein RpfC	223	223	60%	3e-61	
<a href="#">O8K127.1</a>	RecName: Full=Autoinducer 2 sensor kinase/phosphatase luxQ	224	224	48%	5e-61	

**Fig. 15.** Análisis BLASTP utilizando la secuencia completa de LadS2.

Este descubrimiento motivó el análisis del contexto genómico de *ladS2* en el cromosoma de *A. vinelandii*, para esclarecer si se trataba de un homólogo a RpfC de *X. campestris*, y no de LadS de *P. aeruginosa* como se había planteado en un inicio (Fig. 16).

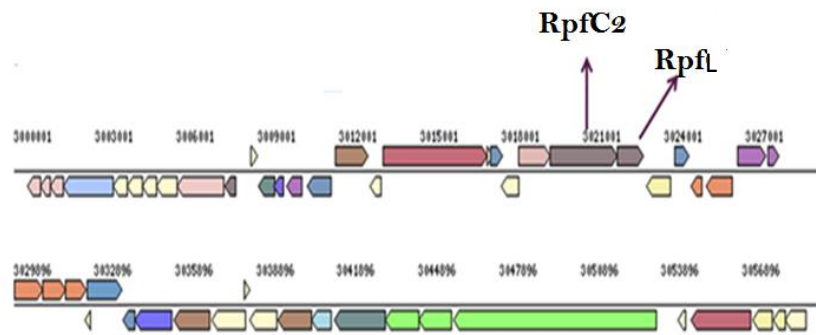


Fig. 16. Contexto genómico de *rpfC2*.

Río abajo del gen que codifica para la HK en cuestión, se encontró un marco de lectura abierto que codifica para un regulador de respuesta similar a los RR de la familia Rpf, el cual se designó como RpfL. Estos resultados en conjunto, sugieren que la HK que inicialmente se creía era LadS2, era en realidad homóloga a RpfC, por lo que se renombró: RpfC2.

## II.1 El sistema Rpf de *Xhantomonas campestris*

En *X. campestris* el sistema RpfC/G/F forma parte del sistema de *Quorum Sensing* (QS) que controla la virulencia, la producción del exopolisacárido (EPS) goma xantana, y la formación de biopelículas (Dow *et al.* 2006).

Lo destacable de este sistema de transducción de señales radica en los reguladores de respuesta de RpfC: RpfF y RpfG. RpfF es un RR con actividad sintasa (modifica ácidos grasos que fungen como molécula señal en el sistema),

mientras que RpfG es un RR que cuenta con el dominio receptor típico, pero también posee un dominio HD-GYP (dominio involucrado en la hidrólisis del di-GMP cíclico).

RpfC posee un dominio transmembranal (5TM), un dominio transmisor, un dominio receptor y un dominio Hpt. En condiciones basales, forma un complejo con RpfF, cuando aumenta la densidad poblacional, también aumenta la cantidad de moléculas señal que son liberadas al medio extracelular. RpfC detecta la señal del medio (el ácido graso conocido como factor de señal difusible, FSD), se fosforila, con lo que cambia su conformación, se libera la sintasa RpfF (que sigue produciendo el FSD) y se fosforila a RpfG. Este último, una vez activo, rompe las moléculas de diGMPc acumulado en el interior celular. Este segundo mensajero es un efector del factor transcripcional Clp, el cual a su vez activa otros factores transcripcionales que están involucrados en la virulencia de la bacteria y en la producción del EPS xantana (Fig. 17) (He *et al.* 2008).

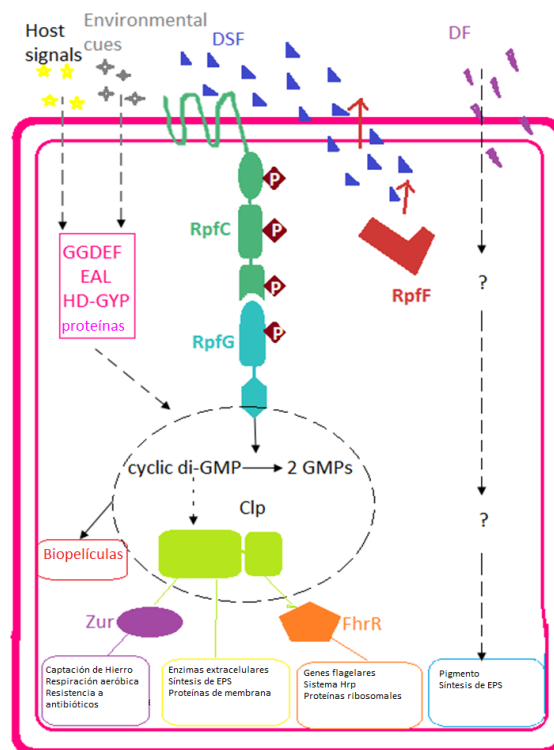


Fig. 17. Representación esquemática del sistema RpfC/G/F en *Xcc* (Modificado de He *et al.* 2008).

Cuando se habla de *X. campestris*, se asocia principalmente a su capacidad para producir xantana, debido a las aplicaciones industriales que posee. De igual modo, en bacterias como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. mendocina* y *A. vinelandii*, la biosíntesis de EPS es crucial, tanto para las aplicaciones que se derivan de éste, como para la misma colonización y sobrevivencia de las bacterias.

En *P. aeruginosa* se ha descrito que el di-GMPc estabiliza la interacción de las proteínas Alg8 y Alg44, formando un complejo alginato polimerasa/co-polimerasa en la membrana interna. Este proceso inicia con la unión de di-GMPc al dominio PilZ de Alg44, lo que promueve el cambio conformacional de dicha proteína, permitiendo su interacción con Alg8 (Merigui *et al.* 2007).

Se ha planteado que los niveles intracelulares de di-GMPc están controlados por fosfodiesterasas (PDEs con dominios HD-GYP o EAL) y diguanilato ciclasas (DGCs, con dominios GGDEF) que responden a diferentes señales. Esta hipótesis se ha demostrado experimentalmente en *Gluconacetobacter xylinus*, donde se copurificó la DGC DgcA y la PDE PdeA con el di-GMPc unido a la celulosa sintasa, y en *Caulobacter crescentus*, donde los niveles intracelulares de di-GMPc varían en el proceso de diferenciación celular (Hay *et al.* 2009).

En *P. aeruginosa* se encontró a la proteína MucR, la cual posee un dominio GGDEF (DGC) y un dominio EAL (PDE), así como un dominio conservado MHYT, que se ha propuesto detecta oxígeno, CO o NO. Se ha descrito que MucR crea un reservorio localizado de di-GMPc muy cercano a la proteína Alg44, y que su actividad de degradar y sintetizar dicha molécula depende del modo de crecimiento de la bacteria, ya que durante la formación de biopelícula se sintetiza di-GMPc, pero se degrada durante el crecimiento planctónico (Fig. 18) (Hay *et al.* 2009).

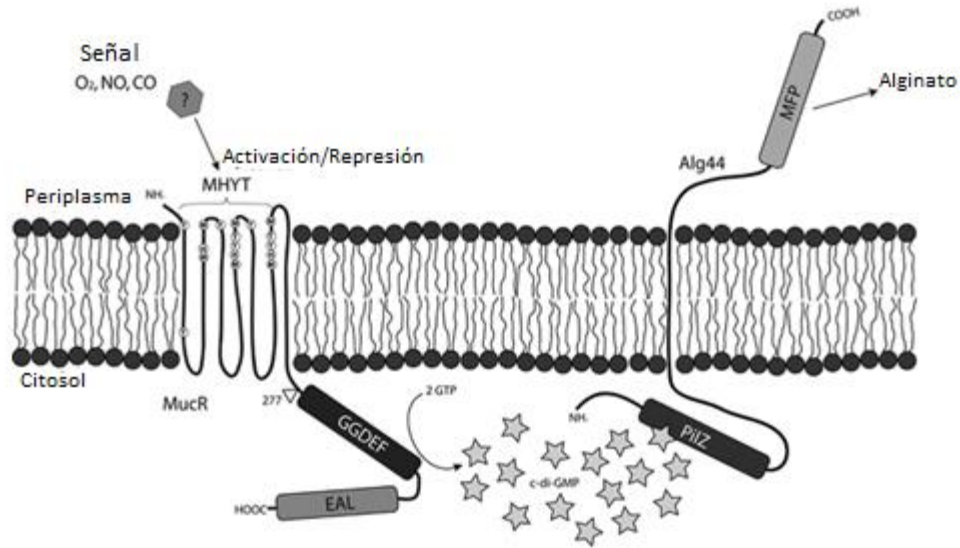


Fig. 18. Representación de los dominios PDE y DGC de la proteína MucR (Modificado de Hay *et al.* 2009).

En *A. vinelandii*, también se encontraron proteínas con motivos PDEs y DGCs, entre ellas RpfL (el RR de la HK RpfC2). Analizando los dominios de este RR, se encontró que además del dominio típico REC, RpfL cuenta con un dominio GGDEF (diguanilato ciclasa) (Fig. 19).

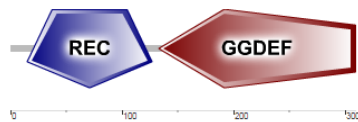


Fig. 19. Dominios del RR RpfL de *A. vinelandii*.

El hecho de encontrar en *A. vinelandii* proteínas con dominios que sintetizan o degradan di-GMPc, sugiere que en la bacteria este segundo mensajero juega un papel importante, como sucede en *P. aeruginosa*, *X. campestris*, y otros microorganismos.

### III. HIPÓTESIS

La cinasa histidínica RpfC2 es parte de un sistema de transducción de señales implicado en la síntesis de alginato y biopelículas regulado por el sistema RpfC/G en *Azotobacter vinelandii*.

#### IV. OBJETIVOS.

##### Objetivo general:

- Estudiar la cinasa histidínica RpfC2 de *Azotobacter vinelandii*.

##### Objetivos particulares:

- Obtener las mutantes del gen *rpfC2* de *A. vinelandii*.
- Caracterizar las mutantes en relación a la generación de biopelículas, enquistamiento, movilidad y alginatos.

## V. RESULTADOS

### Obtención de las mutantes *rpfC2* en *A. vinelandii*

#### Construcción de la mutante polar.

Para generar la mutación polar se diseñaron los oligos RpfC2F:5'-CGA TGC GGC GCT GTT GCT GAG -3' y RpfC2R:5'-CGG GGC GGG GGA AAG GTG-3'. Se amplificó una región de 2.28 Kb, utilizando como molde DNA cromosomal de la cepa E de *A. vinelandii* (Fig. 20).

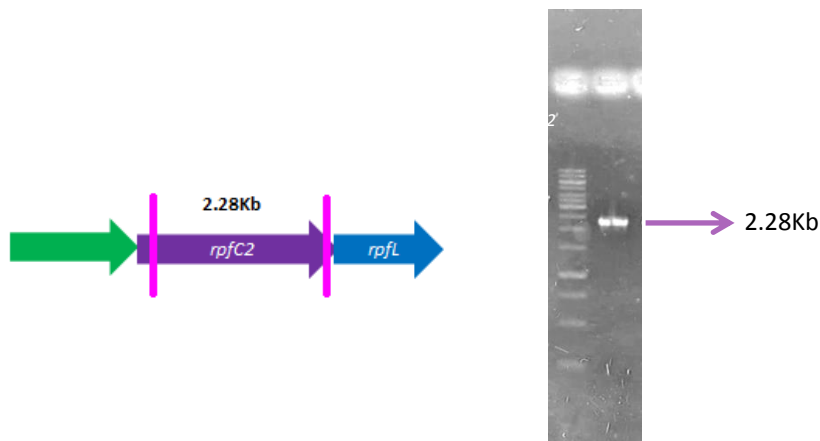
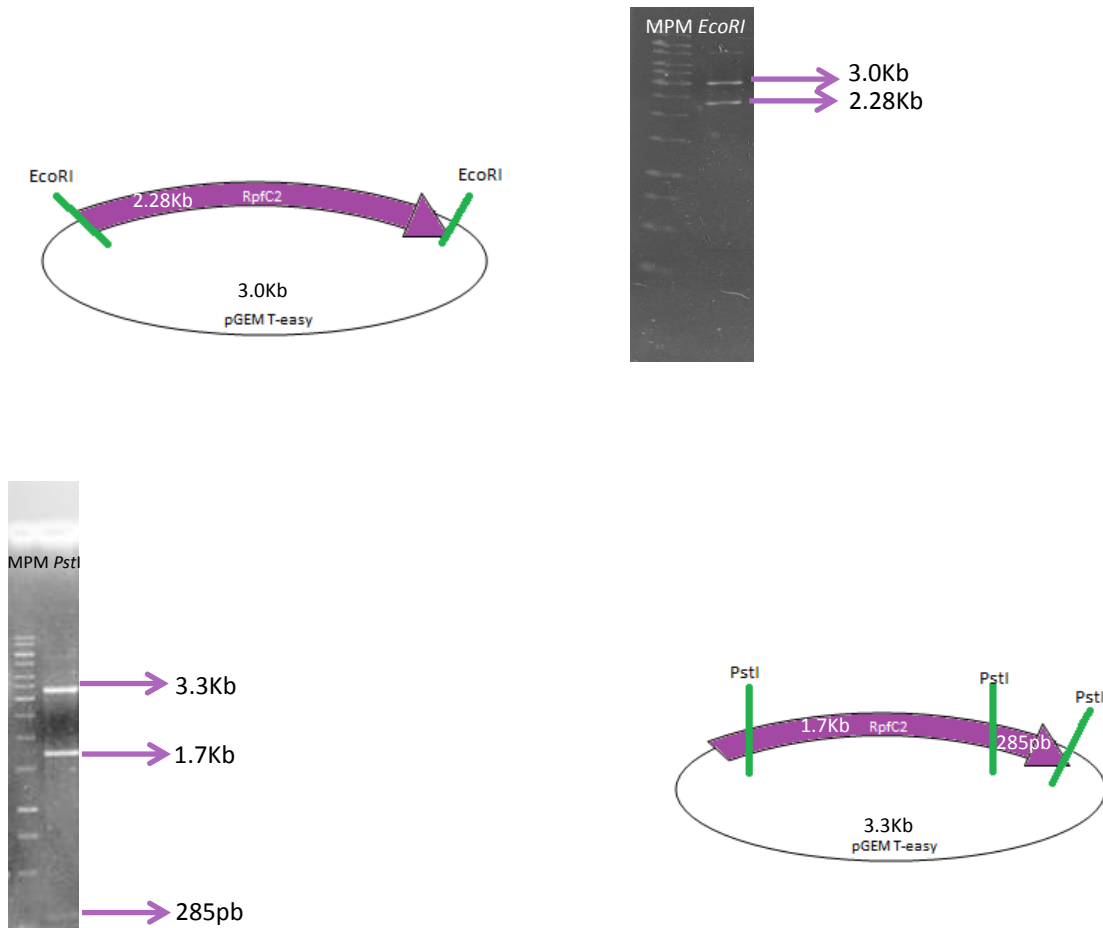


Fig. 20. Producto de PCR del gen *rpfC2* de *A. vinelandii*.

El producto de PCR se ligó al vector de clonación pGEM T-Easy y la clonación se corroboró por patrón de restricción utilizando las enzimas *Eco* RI (libera un fragmento de 3.0 Kb correspondiente al vector, y otro de 2.28 Kb, correspondiente al inserto) y *Pst* I (escinde 3 fragmentos: 3.3 Kb, 1.7 Kb y 285 pb) (Fig. 21).



**Fig. 21.** Patrón de restricción con las enzimas A) *Eco* RI B) *Pst* I de la ligación de *rpfC2* en el vector pGEM T-Easy.

La construcción obtenida se escindió con la enzima *Sa*/I para insertar el gen de resistencia a kanamicina (Km), que también fue cortado con dicha enzima, cuidando la orientación de la inserción a manera que el sentido de la transcripción del gen de resistencia a kanamicina quedara divergente al gen *rpfC2*. La orientación se corroboró por patrón de restricción con la enzima *Eco* RI (Fig.22)

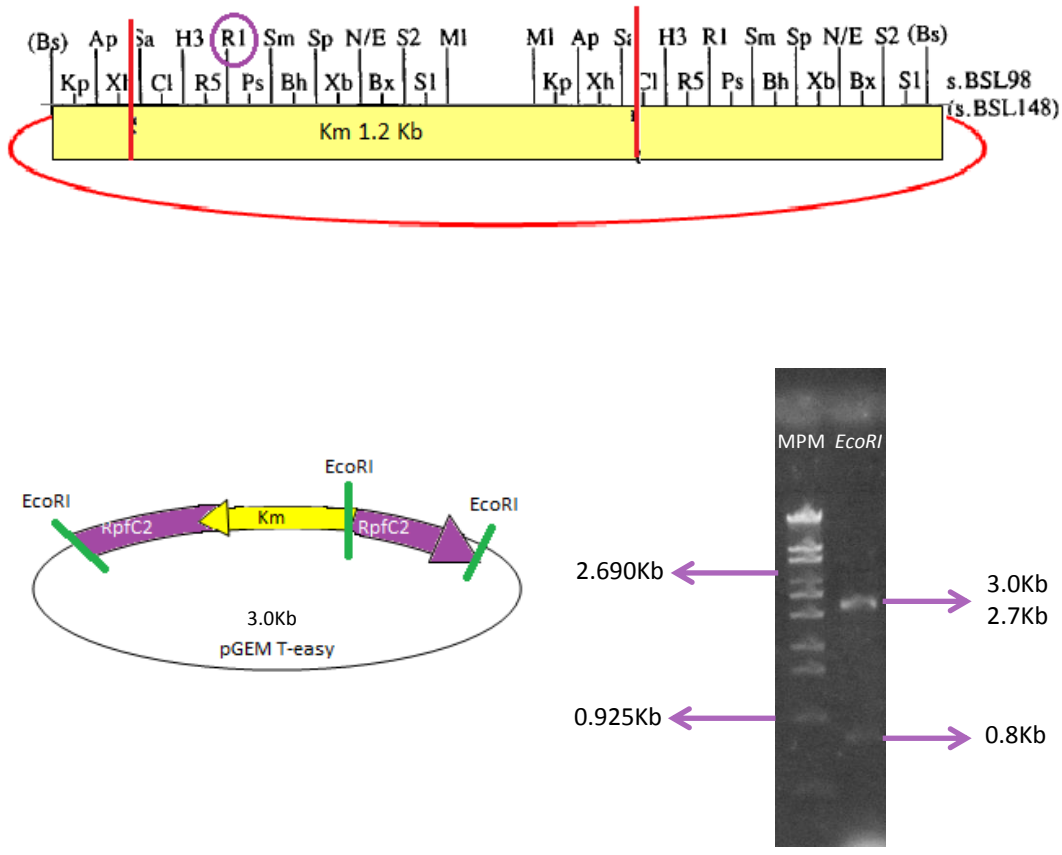
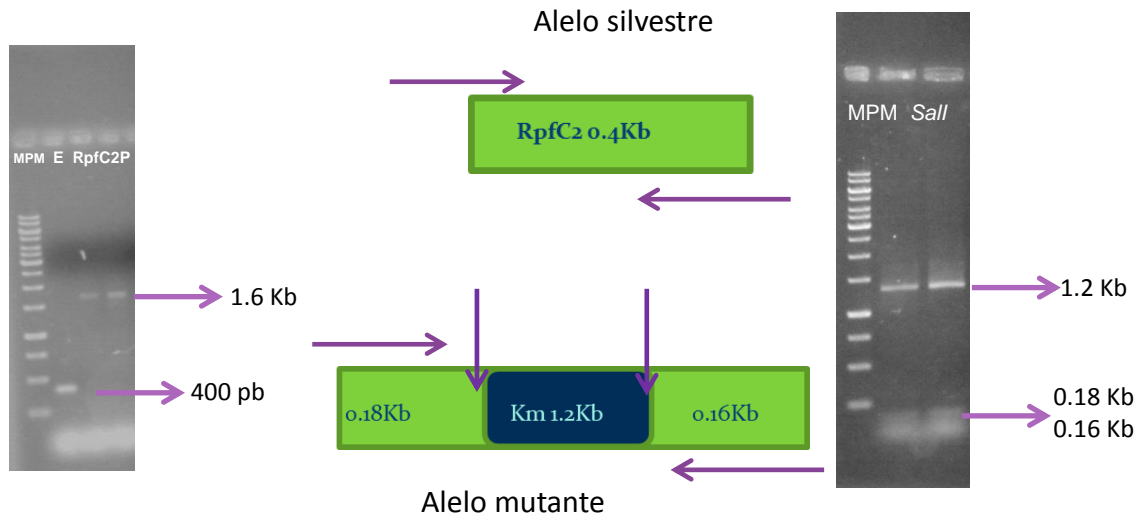


Fig. 22. Mapa de restricción *EcoRI* de la construcción polar *rpfC::Km* clonada el vector pGEM T-Easy

Se utilizó la construcción polar obtenida para realizar ensayos de transformación en células competentes de la cepa E de *A. vinelandii*. A las transformantes aisladas candidatas de tener la mutación en *rpfC2* se les extrajo DNA cromosomal, el cuál se ocupó de molde para amplificar el alelo mutante por PCR, y posteriormente corroborar la mutación cortando con la enzima *Sa/I*. Cabe mencionar que el alelo mutante tiene un tamaño de 3.5 Kb, por lo que se diseñaron oligos que flanquearan al cassette de Km a menor distancia (menos de 200 pb de cada extremo) obteniendo un amplicón más pequeño. El alelo silvestre generaría un

fragmento de 0.4 Kb aproximadamente y el mutante de 1.6 Kb. La naturaleza del amplicón se corroboró mediante patrón de restricción con la enzima *Sa*/I (Fig. 23).

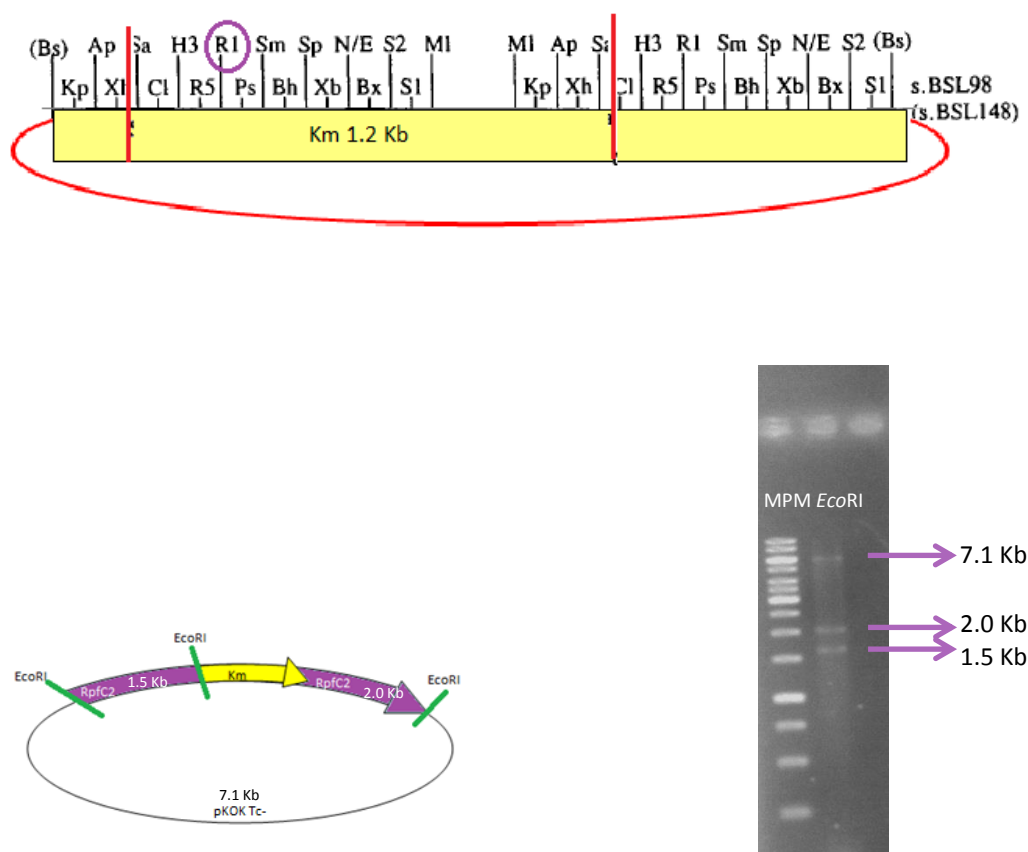


**Fig. 23.** Análisis de PCR y patrón de restricción *Sa*/I de la mutante *rpfC::Km* polar.

### Construcción de mutante no polar.

Originalmente nos planteamos complementar la mutante RpfC2P para corroborar que los fenotipos que se pretendían caracterizar se debieran únicamente a la mutación generada. En nuestro caso, no pudimos obtener la complementación de la mutante polar a pesar de que se realizaron varios intentos. Analizando la secuencia del gen *rpfC2*, nos percatamos que tanto el gen que se encuentra río arriba, como *rpfL* que se encuentra río abajo, se empalman con *rpfC2*, por ello se dedujo que podría tratarse de un operón y que eso podría estar dificultando la complementación en la mutante RpfC2P. Por lo anterior, se prosigió a obtener la mutante no polar de la HK RpfC2 para corroborar el efecto de la mutación en el gen *rpfC2*.

Para obtener la mutación no polar, se utilizaron los oligos diseñados para generar la mutante polar: RpfC2F:5'-CGA TGC GGC GCT GTT GCT GAG -3' y RpfC2R:5'-CGG GGC GGG GGA AAG GTG-3', al igual que toda la metodología previamente mencionada. La diferencia para obtener la mutante no polar radicó en cuidar la orientación del cassette de Km, debido a que ahora se buscó que la inserción de dicho gen de resistencia quedara en el sentido de la transcripción del gen *rpfC2*. La mutación se corroboró con la enzima *Eco*RI (Fig. 24).



**Fig. 24.** Mutación *rpfC2::Km* no polar clonada en el vector pKOK Tc- corroborada con la enzima *Eco*RI.

Se realizaron los ensayos de transformación correspondientes, y después de varios intentos, no se logró recuperar una mutante no polar nula, sino que siempre se obtuvieron mutantes no polares merodiploides (poseen el alelo silvestre y el alelo mutante). La naturaleza del amplicón se corroboró con la enzima *Sa*I (Fig. 25).

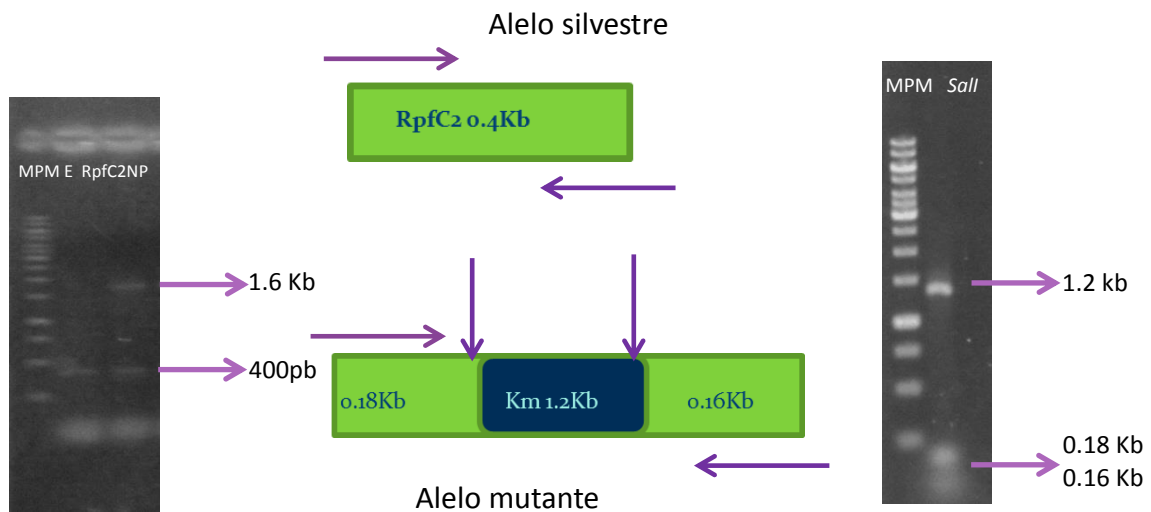


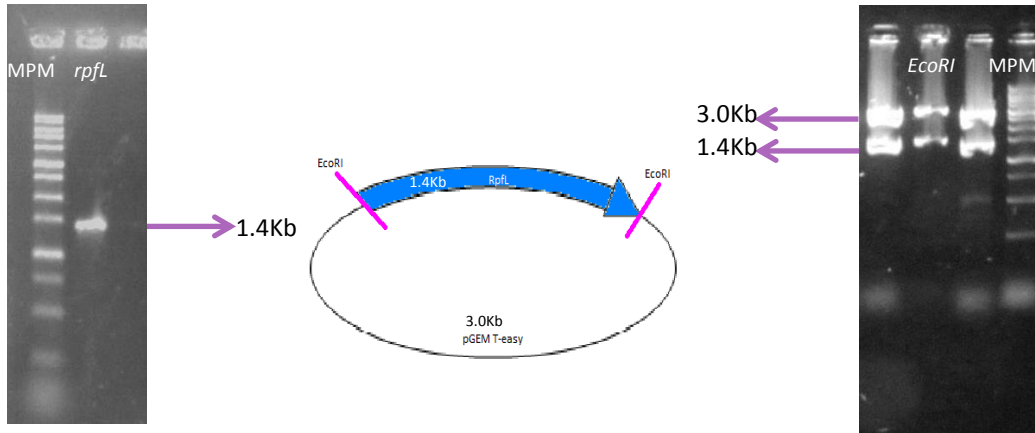
Fig. 25. Amplificación y mapa de restricción de los alelos silvestre y mutante de la mutante *RpfC2* no polar. El mapa de restricción se realizó con la enzima *Sa*I.

### Obtención de la mutante *RpfL* (RR)

Río abajo del gen *rpfC2* se encontró un regulador de respuesta putativo que fue nombrado *rpfL*. De manera adicional al trabajo originalmente propuesto, decidimos mutar este gen esperando obtener fenotipos similares a los observados en la mutante polar.

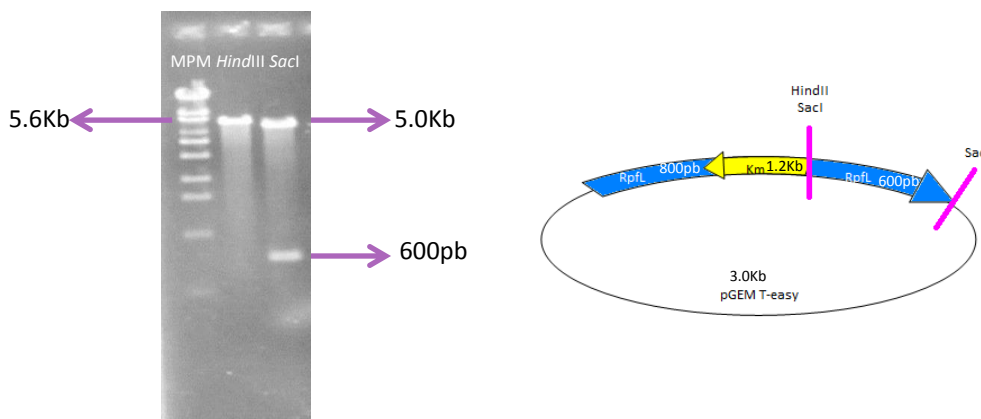
Para generar la mutante *rpfL* se diseñaron los oligos *rpfLF* 5'-TCC TGC TGC ACT GGA TTT C-3' y *rpfLR* 5'-TTA GAG GTG CCC TTC AGG TA-3' y se amplificó por PCR un fragmento de 1.4 Kb que contiene al gen *rpfL*. El producto de PCR se ligó

al vector de clonación pGEM T-Easy y se corroboró la ligación utilizando la enzima *Eco* RI, que libera el inserto del vector (Fig. 26).



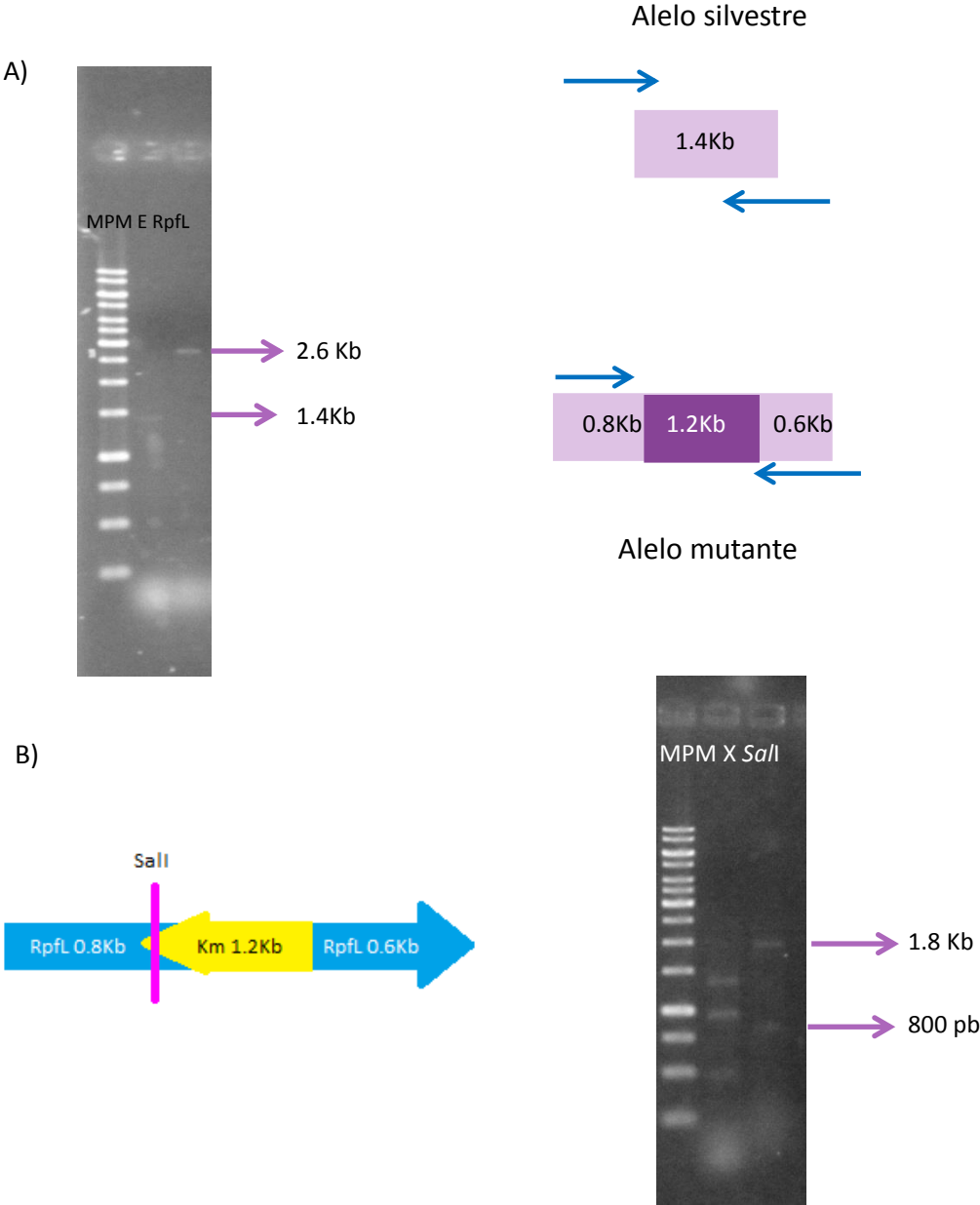
**Fig. 26.** Amplificado del gen *rpfL* y restricción de la clonación del gen en el vector pGEM T-Easy con la enzima *Eco* RI.

Posteriormente, se le insertó el cassette de Km en el sitio único *Cla* I. Se verificó la construcción empleando las enzimas *Hind* III (que lineariza en un fragmento de 5.6 Kb) y *Sac* I (que fragmenta la construcción en dos, 5 Kb y 600 pb) (Fig. 27).



**Fig. 27.** Mapa de restricción de la construcción *rpfL::Km* en el vector pGEM T-Easy utilizando las enzimas *Hind* III y *Sac* I.

A la construcción obtenida le prosiguieron los ensayos de transformación en células competentes de la cepa E de *A. vinelandii*, en los que se obtuvo la mutante RpfL, que fue corroborada mediante PCR y patrón de restricción, utilizando la enzima *SalI* (Fig. 28).



**Fig. 28.** A) Amplificado de la cepa E y la mutante RpfL. B) Restricción del amplificado de la mutante RpfL con la enzima *SalI*.

## Producción de alginato en las mutantes Rpf

Inicialmente se pretendió caracterizar las mutantes de la HK polar: RpfC2P, no polar: RpfC2NP y del RR: RpfL cuantificando la producción de alginato a las 48h, pero se observó que durante las diferentes fases de la curva de crecimiento se producían cantidades de alginato diferentes a la sintetizada por la cepa E. Por ello se optó por realizar las mediciones durante diferentes puntos de la curva de crecimiento. El experimento se realizó por triplicado, observándose a las 24h una sobreproducción de alginato en la mutante RpfC2P. A las 36 h la producción de alginato se incrementó en la mutante RpfC2NP, y a las 48 h ocurrió el incremento de este EPS en la mutante RpfL. No obstante, al transcurrir más de 48 h la producción de alginato cayó drásticamente en las tres mutantes (Fig. 29).

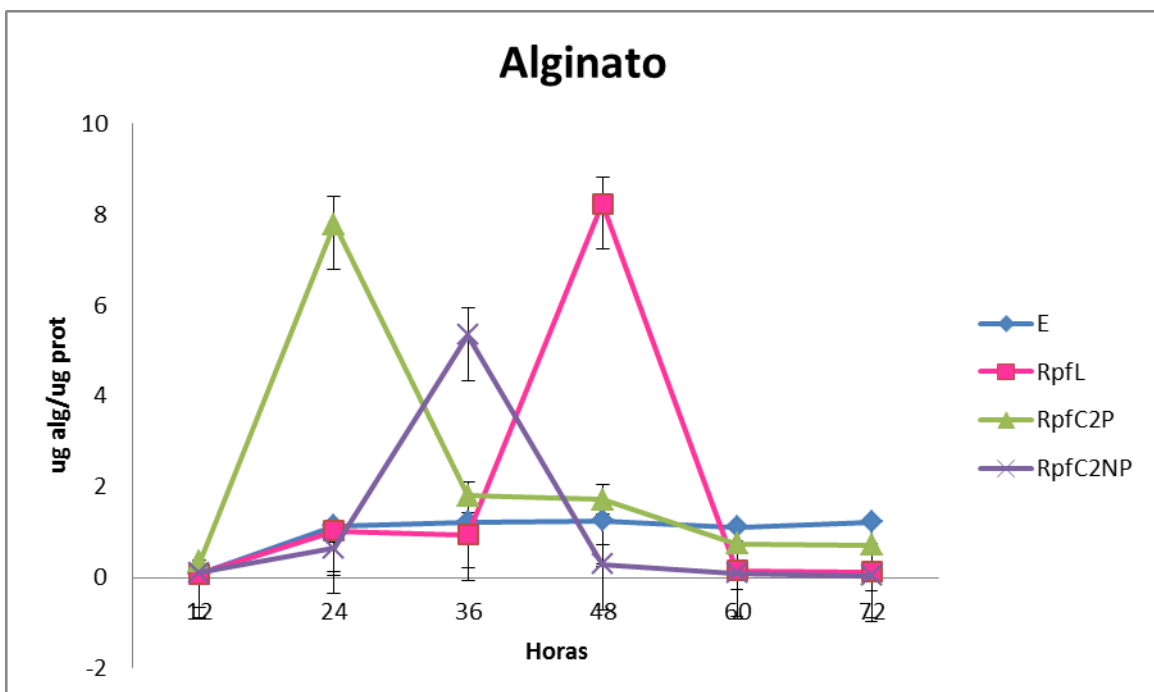
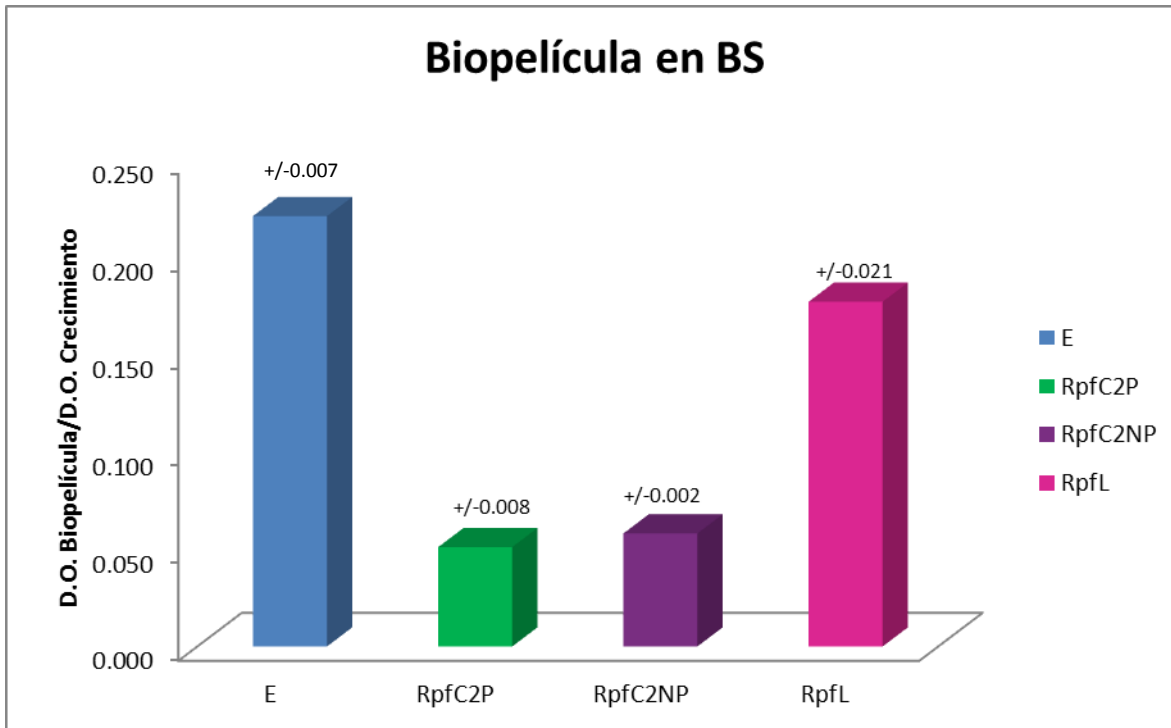


Fig. 29. Curva de producción de alginato en las mutantes RpfC2P, RpfC2NP, RpfL y la cepa E de *A. vinelandii*.

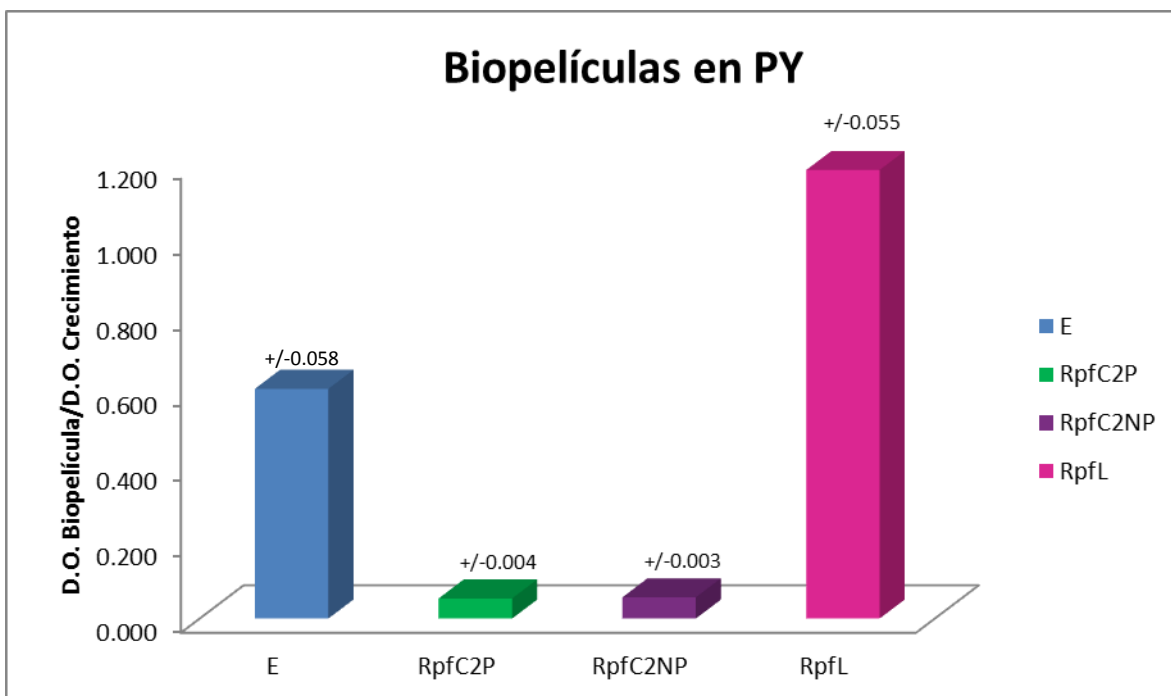
### **Cuantificación de formación de biopelículas en las mutantes *rpf***

Para la determinación de formación de biopelículas, las mutantes y la cepa silvestre se crecieron en medio BS en un pre-inóculo, y después de 24 h se inocularon en placas de poliestireno, por triplicado en los medios BS y PY, el cultivo se dejó estático por 60 h a 30°C. Pasado este lapso, la biopelícula se fijó con metanol, se tiñó con cristal violeta y se cuantificó la biopelícula formada en relación al crecimiento. En el experimento realizado en medio BS, las mutantes RpfC2P y RpfC2NP mostraron una disminución de 4 veces en la formación de biopelículas respecto a la cepa E. Sin embargo, la mutante RpfL, aunque muestra una disminución moderada en la formación de biopelículas respecto a la cepa E, al compararla con las mutantes RpfC2P y RpfC2NP, presentó un incremento de casi el triple. En medio PY, la producción de biopelículas se ve notablemente disminuída en las mutantes RpfC2 polar y no polar, mientras que la mutante RpfL mostró un incremento de la formación de biopelículas, incluso superando aproximadamente el doble los valores que se muestran en la cepa E (Fig. 30).

A)



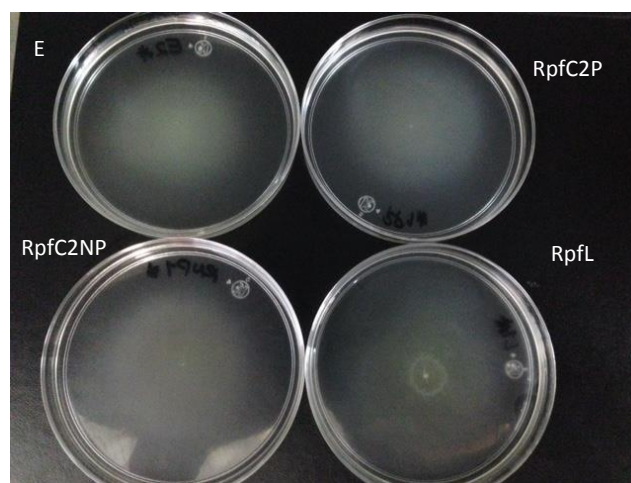
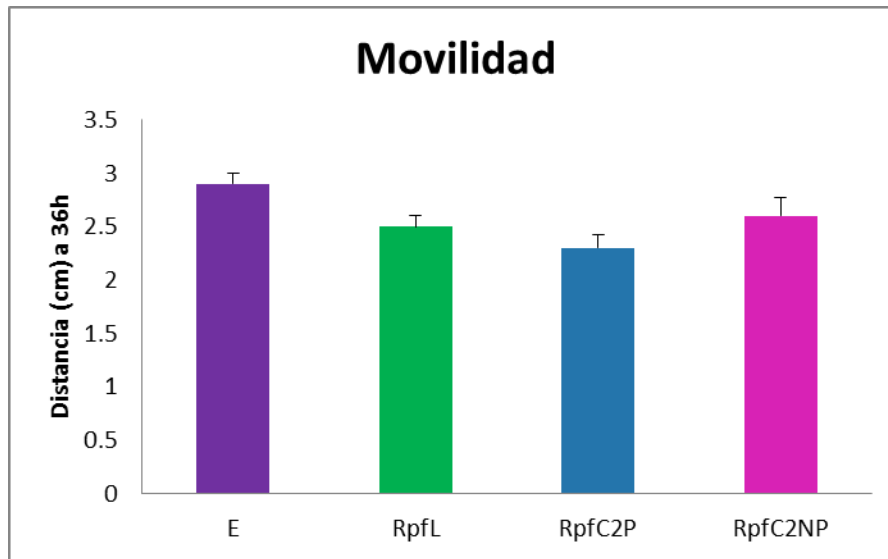
B)



**Fig. 30.** Cuantificación de la formación de biopelículas en las mutantes RpfC2P, RpfC2NP, RpfL y la cepa E de *A. vinelandii* a 60 h en los medios A) BS y B) PY.

## Ensayos de movilidad

Para observar la movilidad en las mutantes RpfC2P, RpfC2NP, RpfL, y la cepa E, se estandarizaron condiciones del ensayo (inóculo, concentración de agar, fuente de carbono), y se dejó incubar a 30°C por 36 h para después medir la distancia recorrida por cada cepa. No se encontraron diferencias significativas en las mutantes RpfC2P, RpfC2N y RpfL respecto a la cepa E (Fig. 31).



**Fig. 31.** Ensayo de movilidad de las mutantes RpfC2P, RpfC2NP, RpfL y la cepa E de *A. vinelandii* en medio BS.

## VI. DISCUSIÓN

El di-GMPc es un segundo mensajero involucrado en la regulación de funciones biológicas como la formación de biopelículas, producción de EPS, movilidad, entre otras. Se ha descrito que su función depende de la unión a diversos receptores, como las proteínas con dominio PilZ, *Riboswitches* y factores de transcripción (Mills *et al*, 2011).

En *P. aeruginosa*, se identificaron ocho proteínas que contenían un dominio PilZ (dominio que presenta afinidad por di-GMPc, demostrado por interacciones PilZ-diGMPc en *E. coli* y *G. xylinus*), a las cuales se les probó su afinidad por este segundo mensajero. Entre las proteínas probadas destaca Alg44, cuyo dominio PilZ se localiza en el extremo N-terminal, y que es requerida para la producción de alginato en *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que PilZ de Alg44 se une específicamente a di-GMPc, y que esta unión parece ser esencial para la producción de alginato en esta bacteria, lo que representa un nuevo mecanismo de regulación post-traducciona (Merigui *et al*, 2007).

En *A. vinelandii*, los genes involucrados en la síntesis de alginato han sido caracterizados en su totalidad. Se sabe que el producto de *alg44* forma parte del complejo de polimerización y secreción de dicho EPS. Esto ocurre una vez obtenido el ácido GDP-manurónico en la vía de síntesis de alginato, que es polimerizado y exportado a través de la membrana interna por Alg8.

Al igual que *P. aeruginosa*, en *A. vinelandii* Alg44 forma parte del complejo de polimerización del EPS alginato. Por análisis bioinformáticos se sugiere que Alg44 posee un dominio PilZ, que probablemente pudiera estar regulando post-traduccionalmente la síntesis de este polímero a través de la unión al di-GMPc.

La síntesis y degradación de di-GMPc está dada por proteínas con dominios enzimáticos definidos. El di-GMPc es sintetizado a partir de GMP por diguanilato ciclasas (DGCs) que poseen un dominio conservado con residuos GGDEF, y es degradado por fosfodiesterasas (PDEs), que contienen motivos EAL o HD-GYP (Fig. 32) (Mills *et al.* 2011).

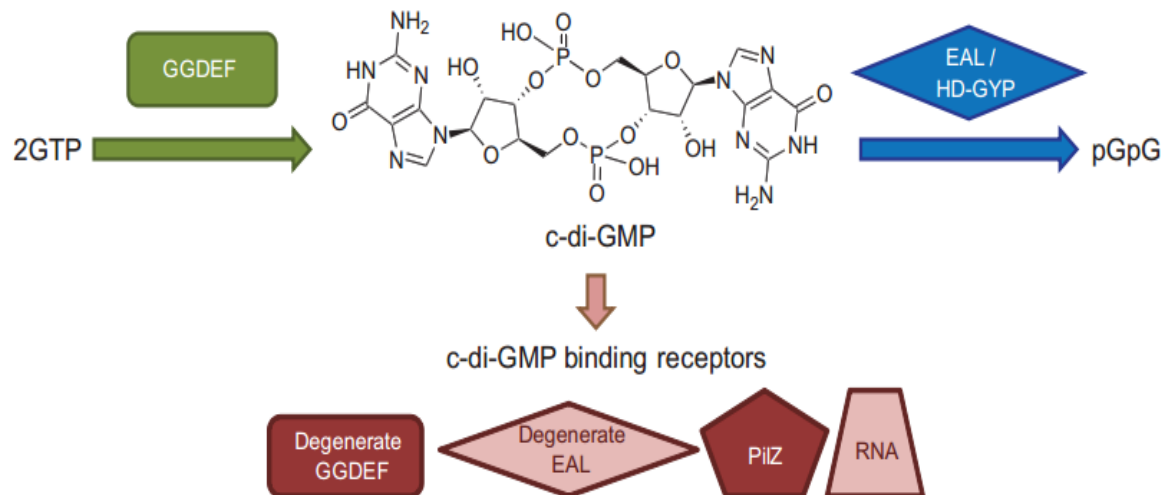


Fig. 32. Modelo de síntesis y degradación de di-GMPc (Tomado de Mills *et al.* 2011).

En *A. vinelandii* se encontraron ocho proteínas no relacionadas con sistemas de transducción de señales de doble componente que contienen dominios PDEs y DGCs relacionadas a la degradación y síntesis de di-GMPc respectivamente (Tabla 1).

Proteína	# gen Avin_	Dominio	Motivo	
cyclic di-GMP signal transduction protein	7761433	PAS	GGDEF	EAL
cyclic di-GMP signal transduction protein	7761642	PAS	GGDEF	EAL
cyclic di-GMP signal transduction protein	7761769		GGDEF	EAL
transmembrane sensor cyclic di-GMP signal transduction protein	7763318	CHASE	GGDEF	

cyclic di-GMP signal transduction protein	7763683	PAS	GGDEF	
cyclic di-GMP signal transduction protein	7763764	PAS	GGDEF	EAL
EAL/GGDEF domain-containing protein	7764005	EAL	CBS	GGDEF
EAL domain-containing protein, diguanylate phosphodiesterase	7762388	EAL		

**Tabla 1.** Proteínas hipotéticas probablemente involucradas en la síntesis y degradación de di-GMPc en *A. vinelandii*.

Con respecto a los sistemas de doble componente relacionados con la generación de di-GMPc, se encontraron tres posibles homólogos al sistema RpfC de *X. campestris* y tres reguladores de respuesta, dos de ellos con dominios de salida con actividad de fosfodiesterasa y una con dominio GGDEF. Una de ellas es RpfC2 (Avin 29290) (Tabla 2).

# gen Avin* (HPK)	Dominios	Regulador de respuesta vecino	# gen Avin* (RR)	Dominios
25170	Transmisor, receptor, Hpt	RpfG, REC, HDc	25160	REC, HD-GYP
29290	TM, TM, HAMP, Transmisor, Receptor, Hpt	RpfL, REC, GGDEF	29300	REC, GGDEF
50630	TM, TM, PAS, PAC, Transmisor, Receptor, Receptor, Hpt	RpfG, REC, HDc	50640	REC, HD-GYP

\* [https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?section=TaxonDetail&taxon\\_oid=643692004](https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?section=TaxonDetail&taxon_oid=643692004)

**Tabla 2.** Proteínas hipotéticas de sistemas de dos componentes probablemente involucradas en la síntesis y degradación de di-GMPc en *A. vinelandii*.

En el sistema RpfC2/RpfL el RR posee un dominio de salida GGDEF. Por la curva de producción de alginato (Fig. 29), se sugiere que las fluctuaciones de la producción del EPS entre las cepas mutantes RpfC2P, RpfC2N, RpfL y la cepa E se podrían deber a una alteración en los niveles de di-GMPc. Los niveles intracelulares bajos de este segundo mensajero propiciarían el aumento del EPS en cuestión, como se ha reportado en modelos bacterianos como *P. aeruginosa* y *X. campestris*. Adicionalmente, en estos resultados, es notoria la caída de producción del polímero que sufre cada cepa mutante unas horas después de alcanzar su pico máximo de producción.

La cepa mutante RpfC2P tiene su pico máximo de producción de alginato a las 24 h y es aproximadamente seis veces mayor respecto a la cepa E a este tiempo. La cepa mutante RpfC2NP es una mutante merodiploide (el alelo mutante y el silvestre están coexistiendo), y presenta su pico máximo de producción de alginato a las 36 h, la que es aproximadamente cuatro veces mayor respecto a la cepa E. Si comparamos los picos máximos entre las mutantes polar (RpfC2P) y no polar (RpfC2NP), la mutante polar produce aproximadamente el doble de alginato que la mutante no polar, aunque lo hacen en tiempos distintos. Esto podría deberse a la merodiploidía de la mutante no polar, lo que probablemente genera un fenotipo menos marcado por conservar el alelo silvestre. La mutante RpfL muestra la máxima producción de alginato a las 48 h y es aproximadamente seis veces mayor que el alginato producido por la cepa E a la misma hora. Cabe mencionar que por la polaridad generada en RpfC2P, se esperaba un comportamiento similar en la mutante RpfL y la mutante polar RpfC2P; sin embargo, en la mutante RpfL, la mayor síntesis de alginato tardó 24 h más que la mutante polar. Esto podría atribuirse a la presencia de otras HK y RR (Tabla 2), que de alguna manera

podrían estar interviniendo en el efecto de las mutaciones generadas. La inserción en la mutante polar muy probablemente además de afectar a la cinasa también alteraría la expresión del regulador de respuesta (*rpfL*). De esa manera estaríamos observando el efecto causado por la ausencia de RpfC2 y RpfL. En la mutante no polar sólo se estarían detectando los efectos de la ausencia de la cinasa y en la mutante *rpfL* estaríamos viendo el efecto de la actividad de la cinasa más no del regulador de respuesta. Probablemente en presencia de los otros alelos *rpfC* (*rpfC1* y *rpfC3*) RpfL podría ser activada por los otros RpfC, así como en ausencia de RpfL, RpfC2 podría encargarse de los otros reguladores de respuesta de la familia. Las variaciones fenotípicas de las mutantes sugieren un sistema de transducción de señales complejo en el que posiblemente interactúen todos los Rpf homólogos.

Por otro lado, los ensayos de formación de biopelículas tanto en medio BS como en medio PY (Fig. 30) muestran una discrepancia en la mutante del RR RpfL respecto a las mutantes de la cinasa (RpfC2P y RpfC2NP). Las mutantes RpfC2P y RpfC2NP en ambos medios muestran una disminución en la formación de biopelículas respecto a la cepa E. Ello concuerda con lo reportado en *X. campestris* y *P. aeruginosa*, en las que una disminución en los niveles intracelulares de di-GMPc coincide con un aumento de EPS y con una disminución de biopelículas. Sin embargo y como se aprecia en la gráfica (Fig. 30), la formación de biopelícula en RpfL se encuentra aumentada aproximadamente tres veces respecto a las mutantes RpfC2P y RpfC2NP en medio BS y en medio PY, además en medio PY hay una mayor formación de biopelícula en RpfL respecto a la cepa E.

Lo anterior también nos hace plantearnos la posibilidad de que al estar mutado el RR, RpfC2 pudiera estar interactuando con las otras HK o con los otros RR encontrados (Tabla 2), lo cual no es un planteamiento tan discordante debido a los antecedentes mostrados en los que se analizan los dominios de dimerización de las cinasas encontradas (Fig. 13) y que muestran gran similitud, sugiriendo que podrían formar heterodímeros entre ellas. Así podrían estar activando o desregulando otros RR, con lo que se pudiera estar compensando el fenotipo que se observa en la mutante RpfL.

Se realizaron ensayos de enquistamiento ya que como se describió con anterioridad, la formación de quistes en *A. vinelandii* le permite contender contra las adversidades del medio en el que se encuentra, además de que para su formación requiere del alginato, que se encuentra afectado por las mutantes RpfC2P, RpfC2NP y RpfL. Sin embargo no encontramos diferencias significativas en su capacidad para enquistarse.

Debido a que el di-GMPc controla la movilidad en algunas enterobacterias por su interacción con los componentes citoplásmicos del complejo flagelar (Mills *et al*, 2011), se optó por probar si en las mutantes RpfC2P, RpfC2NP y RpfL, la movilidad se veía afectada (Fig. 31). De manera similar al ensayo de enquistamiento, RpfC2P, RpfC2NP y RpfL no están involucrados en el control de la movilidad en *A. vinelandii*.

Los datos obtenidos de los fenotipos caracterizados nos permiten hipotetizar que el sistema RpfC2/RpfL está implicado en la biosíntesis de alginato y formación de biopelículas mediante una regulación post-traducciona, en la que los niveles de di-GMPc van variando dependiendo de las condiciones y modo de crecimiento de la bacteria, de manera semejante al comportamiento de la proteína MucR en *P.*

*aeruginosa*. Además, la actividad sintasa de RpfL en conjunto con las proteínas encontradas (que poseen actividad PDE y DGC) o de manera diferencial, de alguna manera podrían estar regulando las concentraciones intracelulares de di-GMPc, y con ello, estar controlando la polimerización de alginato, por la posible interacción de di-GMPc con el dominio PilZ de Alg44.

Los resultados de esta tesis enmarcan la posibilidad de que en *A. vinelandii* se esté llevando a cabo una cascada de regulación dependiente de di-GMPc a través del sistema Rpf.

## VII. CONCLUSIÓN

El sistema RpfC2/RpfL en *A. vinelandii* está involucrado en la síntesis de alginatos y formación de biopelículas, y posiblemente estén modulados por los niveles intracelulares de di-GMPc en una regulación muy compleja, que pudiera estar involucrando a todas las proteínas del sistema Rpf, además de otras proteínas con actividad de PDEs y DGCs.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Obtener la mutante RpfC2NP nula.
- Corroborar el efecto de la polaridad en las mutantes generadas: RpfC2P, RpfC2NP y RpfL mediante RTPCR.
- Cuantificar las moléculas de di-GMPc en las mutantes generadas RpfC2P, RpfC2NP y RpfL.
- Probar si existe interacción entre las HK RpfC1, RpfC2 y RpfC3 mediante ensayos de doble híbrido.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Baker, C. S., Eöry, L.A. Yakhnin, H. Mercante, J. Romeo, T. and Babitzke, P. 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J. Bacteriol.* 189,15:5472–5481.
- ✓ Bergey, D. H., Garrity, G. M. Boone, D. R. Castenholz, R. W. Brenner, D. J. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York. Ed. Springer. Pp 384-402.
- ✓ Campos M. E., Martínez-Salazar, J. M. Lloret, L. Moreno, S. Núñez, C. Espín, G. Soberón-Chávez, G. 1996. Characterization of the Gene Coding for GDP-MannoseDehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* 1793–1799.
- ✓ Castañeda M., Sánchez, J. Moreno, S. Núñez, C. and Espín, G. 2001. The global regulators GacA and GacS form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787–6793.
- ✓ Clementi, F. 1997. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17:327-361.
- ✓ Dow, M. J., Fouhy, Y. Lucey, J. F. and Ryan, R. P. 2006. The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *MPMI Rev.* 19,12:1378–1384.
- ✓ Galindo, E. Peña, C. Núñez, C. Segura, D. and Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Micob. Cell Fact.* 16: 6:7.

- ✓ **Gallegos, R.** 2010. Estudio de la Cinasa Histidínica GacS3 de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura de la Facultad de Ciencias Químicas BUAP.
- ✓ **Gaona, G. Núñez, C. Goldberg, J. B. Linford, R. Castañeda, M. Guzmán, J. Espín, G. and Soberón-Chávez, G.** 2004. Characterization of the *Azotobacter vinelandii algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. FEMS Microbiol Lett. 238:199-206.
- ✓ **Gao, R. and Stock, A. M.** 2009. Biological insights from structures of Two-Component Proteins. Annu. Rev. Microbiol. 63:133-54.
- ✓ **Goodman, A. L., Merigui, M. Hyodo, M. Ventre, I. Filloux, A. and Lory, S.** 2009. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. Genes Dev. 23:249-259.
- ✓ **Hay, I. D. Remminghorst, U. and Rehm, B. H. A.** 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Env. Microbiol. 75(4): 1110-1120.
- ✓ **He, Y. and Zhang, L.** 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. MPMI Rev. 19,12:1378–1384.
- ✓ **Heeb S., and Hass, D.** 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. Mol Plant Microbe Interact. 14:1351-1363. Review.
- ✓ **Kay, E., Dubuis, C. and Haas, D.** 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Biotechnol Lett. 28:1701–1712.

- ✓ **Manzo J., Cocotl-Yañez, M. Tzontecomani, T. Martínez, V. M. Bustillos, R. Velásquez, C. Goiz, Y. Solís, Y. López, L. Fuentes, L. E. Nuñez, C. Segua, D. Espín, G. and Castañeda, M.** 2011. Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol Microbiol Biotechnol.* En prensa.
  
- ✓ **Merigui, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S.** 2007. The second Messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 65(4), 876-895.
  
- ✓ **Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D. Miller, S. I.** 2011. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signaling. *Cel. Microbiol.* 13(8), 112-1129.
  
- ✓ **Muhammadi and Ahmed, N.** 2007. Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Current Genomics.* 8:191-202.
  
- ✓ **Parkinson, J. S. and Kofoed, E. C.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual Rev. Gene.* 26:71-112.
  
- ✓ **Rehm, H. Ertesvåg, H. and Valla, S.** 1996. A New *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase Gene (*algG*) Is Part of an *alg* Gene Cluster Physically Organized in a Manner Similar to That in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178:5884-5889.
  
- ✓ **Rehm, H. and Valla, S.** 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 29:1321-1330.
  
- ✓ **Romeo, T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* 29:1321-30.

- ✓ **Sabra, W., Zeng, A. P. Deckwer, W. D.** 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *J. Bacteriol.* 183:6676–6683.
  
- ✓ **Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacterol. Rev.* 39,4:516-539.
  
- ✓ **Ventre, I., Goodman, A.L. Vallet-Gely, I. Vasseur, P. Soscia, C. Molin, S. Bleves, S. Lazdunski, A. Lory, S. and Filloux, A.** 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *J. Bacteriol.* 188:6026–6033.

## X. MATERIAL Y MÉTODOS

### X.1 Material biológico

Cepa	Característica	Ref. o Fuente
<i>A. vinelandii</i> E	Fondo silvestre; $\text{Nal}^r$ , antes llamada AEIV	Larsen y Haugh, 1971.
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	EndA1 hsdR17 supE44 thi-1 $\lambda$ - recA1 gyrA96 relA $\Delta$ lacU169 $\phi$ 80 ( $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15)	GIBCO BRL
<i>A. vinelandii</i> RpfC2P	Mutante derivada de la cepa E con un gen interrumpido con el cassette de resistencia a Kanamicina (Km) en orientación polar.	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i> RpfC2NP	Mutante derivada de la cepa E con un gen interrumpido con el cassette de resistencia a Kanamicina (Km) en orientación no polar.	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i> RpfL	Mutante derivada de la cepa E con un gen interrumpido con el cassette de resistencia a Kanamicina (Km).	Este trabajo
Plásmido		
pGEM T-Easy Vector	Vector de clonación para productos de PCR; <i>lacZ</i> , Amp $^r$ .	Promega
pGEM <i>rpfC2P::Km</i>	Derivado del pGEM T-Easy Vector; porta un fragmento de aprox. 3.5 Kb que contiene al gen <i>rpfC2</i> interrumpido por la inserción de un cassette de resistencia a Km en orientación polar.	Este trabajo

pGEM <i>rpfC2NP::Km</i>	Derivado del pGEM T-Easy Vector; porta un fragmento de aprox. 3.5 Kb que contiene al gen <i>rpfC2</i> interrumpido por la inserción de un cassette de resistencia a Km en orientación no polar.	Este trabajo
pGEM <i>rpfL::Km</i>	Derivado del pGEM T-Easy Vector; porta un fragmento de aprox. 2.6 Kb que contiene al gen <i>rpfL</i> interrumpido por la inserción de un cassette de resistencia a Km.	Este trabajo

## X.2 Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Tm	Región amplificada
Construcción del plásmido pGEM <i>rpfC2</i>			
RpfC2F	5'-CGATGCGGCGCTGTTGCTGAG-3'	62°C	Locus de 2.28 Kb que contiene al gen <i>rpfC2</i>
RpfC2R	5'-CGGGGCGGGGGAAAGGTG-3'		
Construcción del plásmido pGEM <i>rpfL</i>			
RpfLF	5'-TCCTGCTGCACTGGATTTC-3'	55°C	Locus de 1.4 Kb que contiene al gen <i>rpfL</i>
RpfLR	5'-TTAGAGGTGCCCTTCAGGTA-3'		
Construcción del plásmido pGEM <i>rpfC2.4</i>			
RpfC2.4F	5'-GGCAGTACCTTCTGGTTCAG-3'	60°C	Locus de 400 pb que contiene al gen <i>rpfC2</i>
RpfC2.4R	5'-GCGGTCATGGCGAGAAT-3'		

## X.3 Medios de cultivo

- Medio Burk Sacarosa (BS) y CM

Soluciones stock		Para 1 L de medio (mL de solución stock)	Para 1 L de medio (mL de solución stock)
Reactivo	g/L	BS	CM
CaCl <sub>2</sub>	7.3	10	10
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.3	10	10
MgCl <sub>2</sub>	160	1	1
FeSO <sub>4</sub>	5	1	--
NaMoO <sub>4</sub>	0.2	1	--
Buffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8	100
Fosfatos	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	
Sacarosa	200	100	100
		H <sub>2</sub> O: 800	H <sub>2</sub> O: 800

Para preparar medio sólido se agrega agar bacteriológico (15 g/L). El medio CM no contiene Hierro ni Molibdeno y permite crecer a *A. vinelandii* y llegar a estado de competencia para ensayos de transformación.

- Medio LB (Luria Bertani)

Reactivos	Para 1L de medio	
Agua destilada	1 L	Medio líquido
Peptona de caseína	10 g	
Extracto de Levadura	5 g	
NaCl	10 g	
Agar Bacteriológico	15 g	Medio sólido

#### X.4 Antibióticos

Antibiótico	<i>E. coli</i> (mg/mL)	<i>A. vinelandii</i> (mg/mL)
Ac. Nalidíxico	--	15
Ampicilina	100	--
Kanamicina	20	4

#### X.5 Manipulación de ácidos nucleicos

En la obtención de DNA cromosomal se empleó el protocolo modificado de Li et al. (Plant Methods, 2010), donde se lisan las células con CTAB y se purifica el DNA en una matriz de sílica. Para la purificación de bandas se utilizó el protocolo modificado del kit GENE CLEAN y para la purificación de productos de PCR se emplearon glucógeno e isopropanol.

Para la extracción de DNA plasmídico se empleó el método de perclorato, en el cual se centrifugan 5mL de cultivo, se resuspenden en 175uL de TES y se agregan 25uL de lisozima (10mg/mL), se dejan 20 minutos en hielo y se agregan 400uL de agua tridesilada fría, se incuban a 73°C mediante 15 minutos; se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregan 600uL de isopropanol y 60uL de NaClO<sub>4</sub> 5M, se centrifuga a 12000rpm por 15 minutos y se lava la pastilla dos veces con etanol al 70%, se deja secar la pastilla y se resuspende en 30uL de RNAsa (10mg/mL).

Solución TES

Sacarosa al 15%

TRIS 50mM a pH 8.5

EDTA 50mM a pH 8.0

## X.6 PCR

Para llevar a cabo las reacciones de PCR se utilizó la enzima *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen®). Los oligonucleótidos empleados para cada reacción se especifican en la tabla X.2 Oligonucleótidos.

Para amplificar el gen *rpfC2* las condiciones utilizadas fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 62°C por 1 minuto, extensión a 72°C durante 4 minutos, todo lo anterior por 30 ciclos, con un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos.

Las condiciones empleadas para amplificar al gen *rpfL* fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C durante 2 minutos, todo lo anterior por 30 ciclos, con un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos. Para corroborar la mutante RpfL se emplearon las mismas condiciones, exceptuando el tiempo de extensión que fue de 4 minutos.

Para verificar las mutantes RpfC2P y RpfC2NP se utilizaron los oligonucleótidos de 400pb, y las condiciones fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 60°C por 1 minuto, extensión a 72°C durante 2.5 minutos, todo lo anterior por 30 ciclos, con un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos.

## X.7 Precipitación de DNA con glucógeno.

A un tubo con 50 µL de DNA agregar 1 µL de glucógeno (20 mg/mL) y 500 µL de isopropanol, se mezcla suavemente e incuba a -70° C por 30 min. Se centrifuga a 12 000 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante. Se lava la pastilla con etanol 70% 3 veces, se deja secar perfectamente y se resuspende en el volumen deseado de agua tridestilada.

## X.8 Ligación de DNA.

La T4 DNA ligasa une poli-nucleótidos que tienen extremos 5'-fosfato a extremos 3'-hidroxilo usando ATP. Es usada para:

1. Ligación de fragmentos de DNA con extremos romos o cohesivos.
2. Ligación de un vector con el DNA del inserto.
3. Sellar huecos en un dsDNA.

Se realiza la mezcla de reacción, que contiene el DNA del vector y del inserto, el buffer de la enzima y H<sub>2</sub>O para aforar al volumen adecuado. Es muy importante tomar en cuenta que debe mantenerse el orden de relación molar inserto – vector en una proporción 5:1 y se incuba en función de los extremos generados (romos o cohesivos), preferentemente a 16°C durante toda la noche.

## X.9 Electroporación de *E. coli*.

1. Mezclar en un tubo Eppendorf 50 µL de células electrocompetentes de *E. coli*. con la cantidad a transformar de DNA (5 µL normalmente).
2. Transferir la mezcla a celdas de electroporación estériles y mediante un electroporador darles un shock de 2.5 KV. por 5 mseg.
3. Agregar a la celda 1 mL de medio SOC y mezclar.
4. Transferir la mezcla a tubos Falcon e incubar a 37° C por 1 hora.

## X. 10 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

Para inducir el estado de competencia en *A. vinelandii* se realizaron dos cultivos consecutivos en medio CM sólido, incubando 48 horas a 30°C cada cultivo; posteriormente, se recolectaron todas las células para inocular 50 mL de medio CM líquido y se incubaron por 48 horas a 30°C y 250 rpm. Se recuperaron las células por centrifugación (6000 rpm/10'), se lavaron con sulfato de magnesio 10 mM y se resuspendieron en 1 ml de medio CM 16 mM de MgSO<sub>4</sub>.

## X.11 Cuantificación de alginato (Método Carbazol)

Para cuantificar la curva de producción de alginato se empleó un pre-inóculo en medio BS de cada cepa a caracterizar por 24h, se centrifugó y se separó el paquete celular lavando las células con  $\text{MgSO}_4$  10 mM, una vez eliminado el alginato, las células se resuspendieron en  $\text{MgSO}_4$  10mM y fueron igualados por densidad óptica, se inoculó el equivalente de 1 mL del cultivo original en 50mL de medio BS. Se tomaron alícuotas de 2mL a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72h y se lavó (EDTA 0.01M), se separó el paquete celular (con el que posteriormente se cuantificó proteína por el método de Bradford), el sobrenadante recuperado (contiene el alginato) se mezcló con 3 volúmenes de isopropanol para precipitar el polímero y separarlo posteriormente por centrifugación. Una vez obtenido el alginato (precipitado blanco), se dejó secar por 48 horas y se resuspendió en un volumen adecuado de agua tridestilada. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra (dependiendo de la mucoidía de cada cepa) y se aforó a 350  $\mu\text{L}$ , ésta se colocó en 3mL de una solución de ácido sulfúrico-boratos previamente enfriada en baño de hielo, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de carbazol y se dejó reposar en un baño de agua a 55°C por 30 minutos. La cuantificación espectrofotométrica a 530 nm se basa en la reacción del carbazol con los ácidos urónicos producidos por la hidrólisis del polímero con ácido sulfúrico, la cual desarrolla un color rosa-violeta.

Simultáneamente se realizó la curva de calibración con concentraciones de alginato de 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Las soluciones utilizadas fueron:

- 1) Solución de boratos: 10.09 g de KOH y 24.7 g de  $\text{HBO}_3$  en 100 mL de agua.
- 2) 25 mL de solución de boratos - 975 mL de ácido sulfúrico.
- 3) Carbazol al 0.1% en etanol.

La reproducibilidad del procedimiento fue determinada realizando los experimentos por triplicado de cada cepa en cada una de las condiciones de cultivo.

## X.12 Cuantificación de proteína (método de Bradford).

Para la cuantificación de proteína se utilizó el método Bradford. Se crecieron las cepas E, RpfC2P, RpfC2NP y RpfL, el paquete celular de *A. vinelandii* obtenido en cada toma se lavó con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se resuspendió en 1mL de dicha solución; posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 500 µL con agua tridestilada y se adicionaron 500 µL de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich®). Se determinó la absorbancia a 595 nm. Simultáneamente se realizó una curva de calibración utilizando albúmina a concentraciones de 2, 4, 8, 16 y 32 µg/mL.

La reproductibilidad del procedimiento fue determinada realizando los experimentos por triplicado de cada cepa en cada una de las condiciones de cultivo.

## X.13 Cuantificación de Biopelículas

Para cuantificar biopelículas en las cepas E, RpfC2P, RpfC2NP y RpfL, se tomaron preinóculos en 25 mL de medio BS que se incubaron en agitación por 18-20h. Pasado este lapso, se centrifugaron los cultivos y se estandarizó la cantidad de células para cada cepa mediante densidad óptica, esto se realizó tomando el paquete celular previamente centrifugado, se resuspendieron en 5mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM y de esa suspensión se tomó 1mL que se midió por densidad óptica, se realizó este método en todas las cepas, y la cepa que tuvo la menor densidad óptica fue la que se tomó de referencia para igualar las concentraciones de células en una dilución final, para lo cual se utilizó la fórmula  $V_1C_1=V_2C_2$ , cuyo volumen final fue de 2mL para cada cepa. Una vez estandarizados, se realizó una dilución 1:100 del pre-inóculo en medio fresco y se colocaron 2mL en cada pozo de la placa de poliestireno de 24 pozos, en este caso, se realizaron inóculos en los medios BS y PY para cada cepa, se hacen dos series por cada muestra (sextuplicado) y se deja incubar a 30°C estático. Se determinó el crecimiento total

del cultivo de una serie (triplicado) leyendo la densidad óptica a 625 nm. De la otra serie se vació la placa por inversión y se lavó tres veces con PBS 1X, se dejó secar y se agregaron 2 mL de metanol a cada pozo para fijar por 10 min. Se vació el metanol por inversión de la placa y se dejó secar para posteriormente teñir con cristal violeta durante 15 minutos. Se enjuagó tres veces la placa con agua tridestilada sumergiendo la placa en el agua. El colorante se solubiliza con una solución de ácido acético 33% 2 mL en cada pozo y se agita 10 min a 60 rpm, se lee la densidad óptica a 565 nm, la formación de biopelícula se calcula dividiendo las lecturas de D.O. de biopelículas entre D.O. de crecimiento.

#### **X.14 Ensayo de movilidad.**

Para este experimento se incubaron a 30°C en agitación 25mL de pre-cultivo en medio BS líquido de las cepas E, RpfC2P, RpfC2NP y RpfL por un lapso de 18-20h. Posteriormente se tomó 1mL de cada pre-cultivo y se inoculó en un cultivo de 25mL de medio BS por 18-20h a 30°C. Pasado este tiempo, se estandarizó el paquete celular obtenido de la centrifugación de este segundo cultivo, se resuspendió en 2mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM y de esa suspensión se tomó 1mL que se midió por densidad óptica, se realizó este método en todas las cepas, y la cepa que tuvo la menor densidad óptica fue la que se tomó de referencia para igualar las concentraciones de células en una dilución final, para lo cual se utilizó la fórmula  $V_1C_1=V_2C_2$ , cuyo volumen final fue de 500uL para cada cepa. De este volumen final ya estandarizado, se tomaron 10uL de cada cepa para ser inoculados en el centro de cajas Petri que contenían medio BS con una concentración de agar de 0.15% y Sacarosa al 5%. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa y se dejó incubar 36h a 30°C en condiciones estáticas. La movilidad se determinó midiendo la distancia en centímetros del centro (donde se depositó el inóculo) al perímetro del halo formado en cada cepa.