



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



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

**ESTUDIO DEL PAPEL DEL GEN AVIN_15460
(*gacS2*) INVOLUCRADO EN LA SÍNTESIS DE
ALGINATOS EN *A. VINELANDII*.**

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

PRESENTA

Q.F.B. Lennis Hernández Campos

DIRECTOR DE TESIS

D.C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO

ASESORES DE TESIS

D.C. ALBERTO RAMÍREZ MATA

D.C. BEATRIZ EUGENIA BACA

D.C. LILIANA LÓPEZ PLIEGO

D.C. LUIS ERNESTO FUENTES RAMÍREZ



BUAP

Puebla, Pue. a 19 de noviembre 2019

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

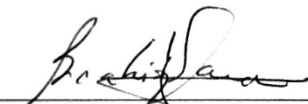
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Lennis Hernández Campos**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio del papel del gen Avin15460 (gacs2) involucrado en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*”

A nuestro juicio, la alumna **Lennis Hernández Campos** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

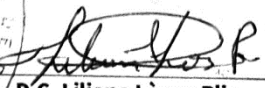
Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Beatriz Eugenia Baca




D.C. Alberto Ramírez Mata


D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramirez


D.C. Liliana López Pliego

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a todos los que de alguna manera ayudaron a este proyecto:

A mis padres: Rafael Hernández Villegas y Ma. Isabel Campos Reyes

A mis Hermanas: Argelia Hernández Campos y Melina Hernández Campos

Al laboratorio de Genética Molecular Microbiana y a mis compañeros Brenda Zárate Morales y Mauricio A. Basulto Almeida.

Al D.C. Miguel Castañeda Lucio

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



ÍNDICE

1. INTRODUCCION	7
1.1. Aspectos generales de <i>Azotobacter vinelandii</i>	7
1.2. Composición y genética molecular en la biosíntesis de alginato.	9
1.3. Sistemas de doble componente.	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Cascada de regulación GacS-Rsm en <i>Azotobacter vinelandii</i>	13
2.2. Sistemas de dos componentes multidominios y su relación con la producción de metabolitos secundarios	15
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1. Material biológico	20
6.2. Medios de cultivo	22
6.2.1. Medio Luria Bertani (LB)	22
6.2.2. Medio mínimo Burk-Sacarosa (BS)	22
6.2.3. Medio de competencia (CM)	20
6.3. METODOLOGÍAS	23
6.3.1. Extracción de plásmido por lisis alcalina	23
6.3.2. Extracción de ADN plasmídico MAXIPREP	24
6.3.3. Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	24
6.3.4. Transformación de <i>A. vinelandii</i>	25
6.3.5. Obtención de ADN total de <i>A. vinelandii</i> .	25
6.3.6. Mutación del gen <i>Avin15460 (gacs2)</i> en cepas con fusiones transcripcionales de los genes <i>rsmY</i> , <i>rsmZ1</i> y <i>algD</i> .	26
6.3.7. Cuantificación de alginato por el método de carbazol	27
6.3.8. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	27
6.3.9. Cuantificación de la expresión de los sRNAs <i>rsmZ1</i> y <i>rsmY</i> , y del gen <i>algD</i> (Medición de la actividad de β -glucoronidasa).	28
6.3.10. Condiciones de amplificación por PCR	28

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
7.1. Búsqueda del gen homólogo a PA1611 de <i>P. aeruginosa</i> en <i>A. vinelandii</i> .	29
7.2. Verificación de la construcción del plásmido pGEMgacS2:: <i>gm</i>	31
7.3. Comprobación de la mutación de GacS2 en cepa silvestre.	31
7.4. Construcción del plásmido integrativo pUMATcgacS2 para la complementación de la cepa mutante.	34
7.5. Comprobación de la cepa complementada.	35
7.6. El gen <i>Avin_15460</i> (GacS2) está implicado en la regulación de la síntesis de alginato.	37
7.7. Generación de la mutación en las cepas con fusiones transcripcionales de los genes <i>rsmY-gusA</i> , <i>rsmZ1-gusA</i> y <i>algD-gusA</i> .	39
7.8. Efecto de la mutación de <i>gacS2</i> en la expresión de los genes que codifican para los sRNAs reguladores RsmZ1, RsmY y de la GDP- manosa deshidrogenasa.	40
8. CONCLUSIÓN	43
9. PERSPECTIVAS	43
10. BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de alginato en <i>Azotobacter vinelandii</i>	10
Figura 2. Sistemas de Doble Componente (SDC).	13
Figura 3. Ensayo de interacción de proteínas de dos híbridos.	17
Figura 4. Cascada de regulación hipotética de HptB en <i>P. aeuriginosa</i>	19
Figura 5. Construcción del plásmido de las fusiones transcripcionales con el gen reportero <i>gusA</i> (β -glucuronidasa)	26
Figura 6. Alineamiento de secuencia múltiple BLASTX GacS2 vs SagS.	30
Figura 7. Ubicación de Avin_15460 en el contexto genómico de <i>A. vinelandii</i>	30
Figura 8. Patrón de restricción con <i>Pst</i> I de la construcción del plásmido mutagénico pGEMgacS2::Gm	31
Figura 9. Comprobación por PCR de la mutación en <i>A. vinelandii</i> utilizando oligonucleótidos que reconocen los extremos del gen silvestre <i>gacs2</i> .	32
Figura 10. Comprobación de la mutación del gen <i>gacS2</i> por análisis de PCR utilizando un par de oligonucleótidos que reconocen los extremos río arriba del gen silvestre <i>gacs2</i> y el casete de resistencia a Gm.	33
Figura 11. Fenotipo de producción de alginato en las cepas silvestre AEIV y AEIVgacS2.	33
Figura 12. Amplificación del gen silvestre <i>gacS2</i> con su región reguladora (RR)	34
Figura 13. Clonación de <i>gacS2</i> con su RR en el vector de mantenimiento pJET 2.0 para generar el extremo <i>Xba</i> I flanqueando la RR de <i>gacS2</i> .	35
Figura 14. En el carril 5 muestra la digestión enzimática <i>Xba</i> I y <i>Sac</i> I del plásmido integrativo pUMATcgacS2com.	35
Figura 15. Amplificación del gen silvestre <i>gacS2</i> con su RR en la mutante <i>gacS2::gm</i> complementada. En el carril 1 se encuentra la cepa silvestre, en el carril 2 y 3 son amplificaciones de la inserción del gen silvestre en un locus neutro <i>MeIA</i> .	36
Figura 16. Fenotipo de la cepa silvestre AEIV (E), de la mutante <i>EgacS2::gm</i> (M5) y la mutante complementada <i>EgacS2com</i> (C5), las células fueron cosechadas de cultivos realizados en medio BS sólido a las 24 h de incubación a 30 °C.	37
Figura 17. Cuantificación de alginato por el método espectrofotométrico de Carbazol de la cepa silvestre AEIV (E) y de la mutante <i>EgacS2::gm</i> la determinación se realizó en cultivos en BS líquido a las 24 h de incubación a 30 °C.	38
Figura 18. Izquierda: Amplificación de la mutación <i>gacS2</i> en las cepas que contienen las fusiones transcripcionales <i>gusA</i> de los genes <i>rsmY</i> , <i>rsmZ1</i> y <i>algD</i> . Derecha: comprobación de la fusión transcripcional de los genes <i>rsmY</i> , <i>rsmZ1</i> y <i>algD</i> .	40
Figura 19. Cuantificación de actividad enzimática del gen reportero β -glucuronidasa de la cepa silvestre EalgD en comparación de la cepa mutante <i>EgacS2::gm</i> algD.	41
Figura 20. Cuantificación de actividad enzimática del gen reportero β -glucuronidasa de la cepa silvestre EY y EZ1 en comparación de la cepa mutante <i>EgacS2::gmY</i> y <i>EgacS2::gmZ1</i> .	42
Figura 21. Modelo putativo de regulación a través de la vía PA2824/HptB/ <i>rsmY</i>	42

ESTUDIO DEL PAPEL DEL gen *Avin15460* (*gacS2*) INVOLUCRADO EN LA SÍNTESIS DE ALGINATOS en *A. vinelandii*.

Resumen

Con la finalidad de acrecentar el conocimiento sobre la regulación de la síntesis de alginatos en *A. vinelandii* se realizaron experimentos de mutagénesis sitio dirigida mediada por la inserción de un casete de resistencia en un gen que codifica para una histidín cinasa híbrida a la que llamamos GacS2. Los experimentos mencionados mostraron la participación de GacS2 en la síntesis de alginatos actuando como regulador negativo. También exploramos la posibilidad de que este regulador controlara a nivel transcripcional a los pequeños RNAs (sRNAs) reguladores de RsmZ1 y RsmY, reportados como reguladores positivos de la expresión del gen *algD*, un gen clave para la síntesis de alginatos. Los resultados obtenidos mostraron que no existe regulación sobre los sRNAs de la familia RsmZ, en tanto hay efecto muy discreto sobre la expresión de RsmY. De manera interesante este efecto marginal no corresponde al efecto que tiene la mutación en *gacS2* sobre el abatimiento de la síntesis de alginato. Como esperábamos la expresión del gen *algD* no se vio afectada en la mutante *gacS2*. Por lo anterior podemos inferir que si bien GacS2 está implicado en el control de la síntesis de alginatos no lo hace a través del sistema Rsm y no controla la expresión del gen *algD*. GacS2 podría estar regulando otros genes biosintéticos indispensables para llevar a cabo la biosíntesis de alginatos en *A. vinelandii* como el gen *algC*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales de *Azotobacter vinelandii*

La familia *Azotobacteriaceae* está formada por 2 géneros *Azotobacter* y *Azomonas*, ambas bacterias gram negativas filogenéticamente cercanas al género *Pseudomonas*.

Azotobacter vinelandii es una γ -proteobacteria poliploide, puede tener hasta 80 copias de su cromosoma (Punita et al., 1989) de 1.5 a 2.0 μm de diámetro; pleomórfica, varían su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos (Espín, 2009).

Se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares. Se mueven por flagelos peritricos, son aerobios y pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas; Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococum* bajo condiciones adversas como la desecación o algún estrés ambiental (Avedaño et al., 2013) (Hendrick, 2006), pueden pasar de un estado planctónico a la forma diferenciada de quiste donde las células pierden sus flagelos y se presenta una última división celular generando dos células esféricas de tamaño menor, las cuales están formadas por dos capas cubierta, intina y exina, constituidas principalmente de alginato (13 y 32% respectivamente) y lipoproteínas (Lin & Sadoff, 1969).

A. vinelandii es una bacteria productora del heteropolisacárido alginato el cual es sintetizado para formar parte de la cápsula de los quistes. El alginato es un componente esencial de las dos capas que cubren a los quistes maduros llamadas exina e intina de las cuales el 32 y 13% de su peso seco es alginato. En las células vegetativas la acumulación extracelular del alginato actúa como

una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados, así como una barrera de protección contra otro tipo de adversidades del medio ambiente (Espín, 2009). La bacteria además produce otro polímero, el poli- β -hidroxibutirato, y algunos pigmentos fluorescentes que actúan como quelantes de Hierro (azotobactinas) (Hendrick, 2006).

1.2. Composición y genética molecular en la biosíntesis de alginato.

Los alginatos son una familia de heteropolímeros lineales compuestos por monómeros de ácido manurónico (M) y su epímero el ácido gulurónico (G) (Espín, 2009); Estos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) (Miranda et al., 2008).

El alginato se sintetiza a partir de fructosa-6-P, que es isomerizada por la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa/guanosina difosfomanosa pirofosforilasa (PMI-GMP o AlgA) para producir manosa-6-P; que a su vez se convierte por la fosfomanomutasa (PMM o AlgC) en manosa-1-P; la PMI-GMP (AlgA) cataliza la conversión de manosa-1-P en GDP-manosa; La GDP-manosa se oxida por la GDP manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) convirtiéndose en ácido manurónico. La polimerización del ácido GDP-manurónico se lleva a cabo por la proteína Alg8, una polimerasa de manuronato (MP). Posteriormente el polimanuronato resultante se modifica en algunos residuos por un complejo con actividad acetilasa compuesto por las proteínas AlgI, AlgV, AlgF; algunos de los residuos no acetilados de manuronato se epimerizan a guluronato por una manuronato epimerasa (ME o AlgG).

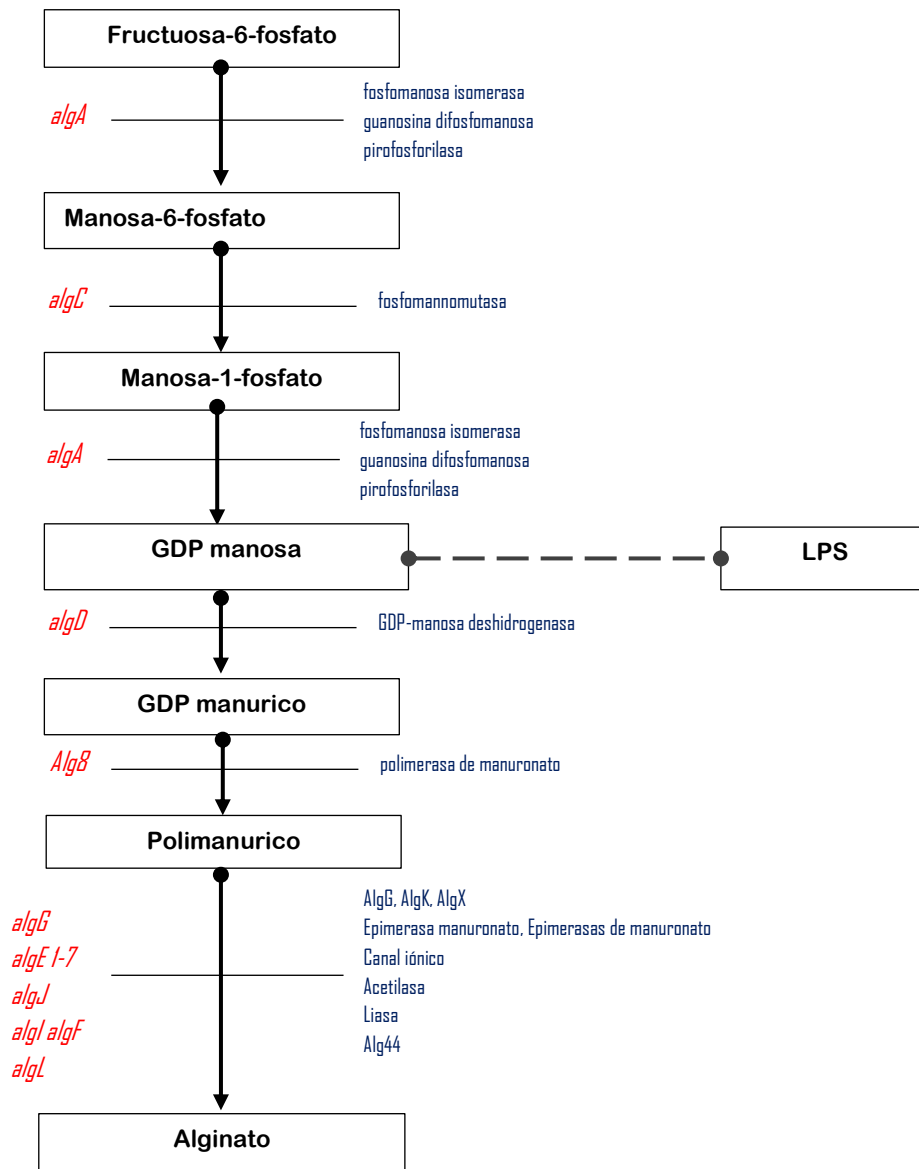


Figura 1. Biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*

Finalmente, el polímero se exporta a través de la membrana externa atravesando un poro formado por la proteína AlgJ. En el caso de *A. vinelandii*, el polímero exportado se convierte en alginato maduro por una familia de siete manuronato C-5 epimerasas extracelulares (AlgE1-7) (Figura 1) que son esenciales para la formación de quistes maduros (Espín, 2009). Se cree que las proteínas *AlgG*,

AlgK, *AlgX* y *AlgL* forman un andamio que guía al polímero a través del periplasma, para luego ser secretado a través de la membrana externa. *AlgL* es una alginato liasa que se propone controla el peso molecular del polímero (Galindo et al., 2007). Sin embargo, cabe mencionar que la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* está regulada de por un sistema de doble componente llamado GacS/A.

1.3. Sistemas de doble componente.

Las bacterias responden a las señales ambientales a través de redes reguladoras globales, que coordinan cambios radicales en la expresión génica, algunas de ellas pertenecen a sistemas conocidos como sistemas de doble componente (SDC). Los SDC, están constituidos por una proteína receptora (cinasa histidínica, HK) que al recibir una señal se autofosforila y activa vía fosforilación al segundo elemento del sistema conocido como regulador de respuesta (RR), los cuales mayoritariamente actúan como reguladores transcripcionales, en menor proporción algunos RR presentan actividades enzimáticas. En ambos casos la actividad de los RR es controlada por su estado de fosforilación (Gao & Stock, 2009).

Las HK se encuentran en su mayoría ancladas a la membrana y funcionan como dímeros. La HK está constituida por un dominio sensor localizado en el extremo N-terminal y un dominio transmisor localizado en el extremo C-terminal de la proteína (H1). Algunos de estos residuos están involucrados en la unión al ATP (cajas G, N y F), en la autofosforilación (caja H) y en la dimerización o la

regulación de la actividad de cinasa (Gao & Stock, 2009). Por otro lado, el RR está constituido por un dominio receptor y un dominio efector, el primero está localizado en el extremo N-terminal en el que destaca el residuo de aspartato (D2) que cataliza la transferencia del grupo fosforilo de la histidina conservada en el dominio transmisor de la HK; el segundo, un dominio efector que comúnmente es un dominio de unión a ADN en el extremo C-terminal como son los dominios HTH, aunque también existen otros reguladores de respuesta con dominios de salida que tienen actividad enzimática y ellos mismos participan en la transducción de señales: metilesterasas, adenilato ciclasas, diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP, histidina quinasas, proteína serina/treonina quinasas y proteínas fosfatasa, lo que permite la diversificación en la respuesta que resulta de la interacción HK- RR en la cascada de señalización (Galperin, 2010). Una vez que es detectada la señal un residuo de histidina de la HK es fosforilado en su dominio transmisor o H1 (en este proceso las HKs funcionan como dímeros), posteriormente el fosfato es transferido al dominio receptor (D2) del RR lo que genera cambios conformacionales en la proteína que posibilitan su unión a la región reguladora de sus genes blanco (Gao & Stock, 2009). Existen SDC con HKs híbridas, multi-dominios o también llamados de fosforrelevo, las que además del dominio transmisor o H1, poseen dos dominios extras de fosforilación, un dominio receptor (D1) y dominio llamado H2 o Hpt y que puede encontrarse formando parte del mismo péptido o como una proteína independiente. En estas cinasas la transferencia del fosfato se da secuencialmente del dominio H1 al D1 y de este al H2, el cual transfiere el fosfato al dominio D2 del RR (Georgellis, Lynch, & Lin, 1997).

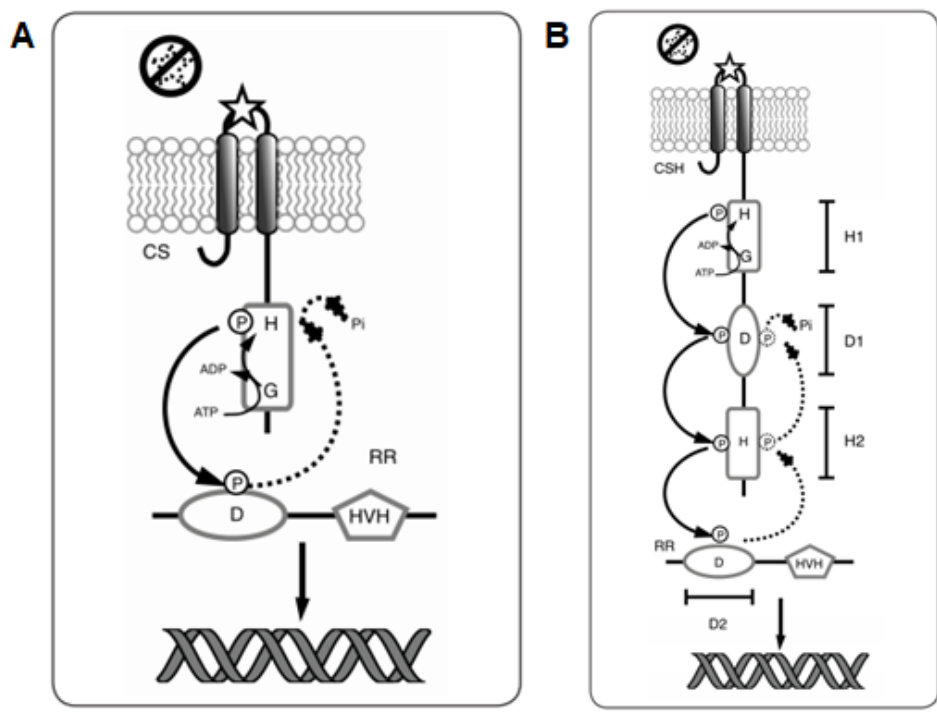


Figura 2. Sistemas de Doble Componente (SDC). **A** sistema simple conformado por HK la cual tiene dominio sensor, dominio H con un residuo conservado de histidina (H) y el RR que posee un residuo de aspartato (D) pudiendo tener una actividad como factor transcripcional. La fosforilación del residuo Asp causa la activación del RR como factor de transcripción. **B** Sistemas de dos componentes híbridos o de fosforrelevo, la HK tiene además del dominio transmisor, un dominio receptor similar al presente en los RR y un dominio H2 o HPt que contiene un residuo de histidina conservado (Barba, 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1. Cascada de regulación GacS-Rsm en la biosíntesis de alginatos

P. aeruginosa tiene un SDC llamado GacS/A, el cual es común en bacterias del subgrupo γ y es considerado un sistema regulador global de metabolismo secundario. En el caso de *P. aeruginosa* controla el cambio de un estilo de vida

planctónico a uno sésil (biopelícula). GacS es una HK híbrida, con un dominio de entrada en el extremo N-terminal que contiene dos motivos transmembranales separados por un asa periplásmica seguida por un dominio H1, además posee un dominio D1 y un dominio C-terminal H2 o Hpt. La proteína GacA es el RR del sistema, a su vez tiene dos dominios: un receptor D2 y un dominio de salida con un motivo de unión a ADN (Lapouge et al., 2008) que funciona como un regulador transcripcional. Castañeda y cols en 2000 describieron GacS en *A. vinelandii* que comparte similitud con GacS de *P. aeruginosa* con una identidad del 65%. La secuencia de aminoácidos GacS de *A. vinelandii* contiene motivos típicos de la subfamilia ArcB, cinasas histidínicas que se caracterizan por contener, además de los dos dominios transmembranales y el dominio transmisor H1, un receptor D1 y un dominio con segunda histidina conservada H2 o Hpt (Castañeda et al., 2000). Al generarse mutantes en GacS en *A. vinelandii* se detectó una reducción del 60% en la producción de alginato en medio líquido además de disminuir la transcripción del gen *algD* durante el crecimiento exponencial y se abroga en la fase estacionaria. La mutación en *gacA*, depleta la producción de alginato y la expresión del gen *algD* (Castañeda et al., 2001).

La regulación que ejerce GacS/A sobre *algD* no se establece de forma directa sino tiene como intermediario al sistema de control post-transcripcional Rsm (Csr) (Romeo, 1998). Los sistemas Rsm están constituidos por una proteína y dos o más pequeños RNAs reguladores (sRNAs) (Chambonnier, 2016). La proteína del sistema, codificada por el gen *rsmA* (*csrA*), se une a sus RNAs blancos de regulación bloqueando su traducción y promoviendo su degradación. Los sRNAs-Rsm contrarrestan la actividad represora de la proteína RsmA secuestrándola y permitiendo la traducción de los RNAs sujetos a regulación

(Lapouge, Schubert, & Haas, 2007). Los sRNAs-Rsm se han agrupado en tres familias de acuerdo a su secuencia ribonucleotídica y a su estructura secundaria: RsmX, RsmY y RsmZ (Moll, 2001): el número y el tipo de los sRNAs-Rsm varía entre las bacterias donde se ha descrito el sistema.

A. vinelandii es la bacteria con el mayor número de Rsm-sRNAs reportados hasta la fecha, con ocho sRNA pertenecientes a la familia RsmZ (RsmZ1–RsmZ8) y uno de la familia RsmY (Hernández et al., 2012). En *A. vinelandii* los sRNAs de la familia Rsm actúan sinérgicamente para contrarrestar el efecto negativo de RsmA sobre la expresión del gen *algD* (Manzon et al., 2011). Por otra parte, una mutación en el C-terminal en la proteína RsmA aumenta la producción de alginato (Morales, 2014). Mutaciones individuales en los genes *rsmZ1–7* generaron afectaciones parciales en la síntesis de alginato y mediante el uso de fusiones transcripcionales se pudo determinar que la expresión de estos sRNAs responden a las condiciones de crecimiento celular y a la fuente principal de carbono (López et al., 2018).

2.2. Sistemas de dos componentes multidominios y su relación con la producción de metabolitos secundarios

En *P. aeruginosa* existen reguladores involucrados en el control funcional del sistema GacS/A (Lapouge, Schubert, & Haas, 2007). Estos reguladores son las cinasas híbridas LadS (del inglés “lost adherence”) que responde a la presencia de calcio en el periplasma (Broder et al., 2016) y RetS (regulator of exopolysaccharide and type III secretion) (Goodman et al., 2004), que detectan

señales ambientales aún desconocidas, las cuales inhiben y activan al sistema Gac S/A, respectivamente. Se sabe que RetS forma heterodímeros con GacS, impidiendo la autofosforilación de GacS y por lo tanto la fosforilación de GacA, regulando así negativamente la expresión del gen *rsmZ* (Goodman et al., 2004). Estudios de micro-arreglos revelaron que la regulación realizada por RetS y LadS convergen en el regulador GacA, influyendo en los niveles de expresión de los pequeños ARN reguladores RsmZ y RsmY, que finalmente modulan la expresión, en conjunto con RsmA, de sus genes blanco de control (Ventre et al., 2006). En *P. aeruginosa* se sabe que además de RetS y LadS existe otra cinasa (PA1611) involucrada en el control de la actividad de GacS. PA1611 es una HK híbrida que interactúa con RetS de una manera similar a lo que hace RetS con GacS, en este caso al interactuar PA1611 con RetS le impide a este último bloquear la fosforilación de GacS (Kong, 2013). Las cuatro HKs (GacS, RetS, LadS y PA1611) se encuentran en la mayoría de las especies de *Pseudomonas* pero no se han reportado fuera de este género. Se propone que los mecanismos y el modo de señalización de este sistema de multi-componentes pueden variar de una especie a otra (Chambonnier et al., 2016).

En *A. vinelandii* se encuentra un homólogo putativo del gen *retS* y una proteína homólogo putativo que presenta todos los dominios presentes en LadS (Cruz, 2012). La mutación en *retS* modifica la expresión de los sRNAs-*rsm* (Reyes, 2018) y mediante un ensayo de doble híbrido se determinó la interacción de RetS y GacS (fig. 3) (Sánchez, 2012). En cuanto a *ladS*, su mutante muestra una producción elevada de la síntesis de alginatos que se puede visualizar con el aumento de la mucoidía en placa (Reyes, 2018).

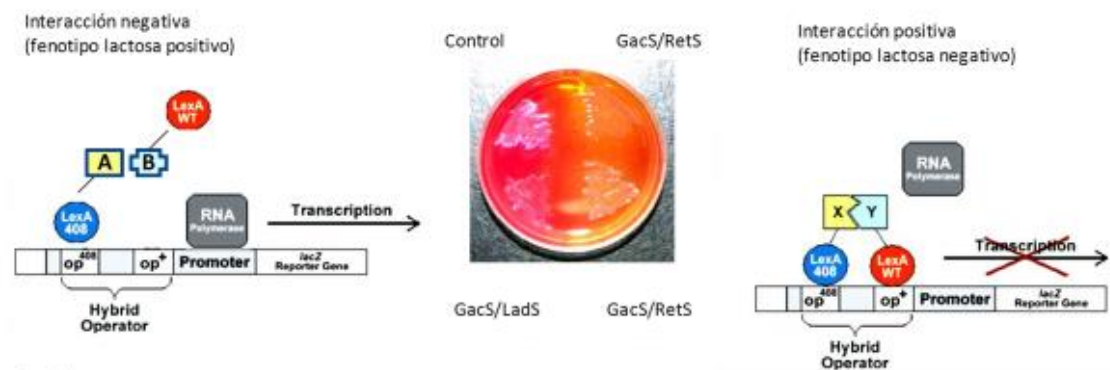


Figura 3. Ensayo de interacción de proteínas de dos híbridos. **A)** A la izquierda la cepa control que muestra la interacción negativa del sistema. A la derecha la interacción se visualiza por el fenotipo lactosa negativo al reprimirse la expresión del gen reportero *lacZ* lo cual refleja la interacción de RetS con GacS. **B)** A la izquierda se muestra un vire de coloración rosada lo que indica ausencia de interacción de LadS con GacS (Sánchez, 2012).

Por otro parte, *P. aeruginosa* tiene tres genes que codifican para proteínas citoplásmicas con un dominio Hpt (H2), una de ellas llamada HptB, puede ser fosforilada por homodímeros de las HKs híbridas, PA1976, PA2824 y PA1611, que no poseen el dominio Hpt (H2) en su C-terminal (Fig. 5) (Hsu et al., 2011). Se propone que esta vía conformada por las tres HKs y HptB controla a su vez a un factor sigma hipotético que es necesario para establecer una transcripción eficiente del sRNA de la familia RsmY. Al respecto se propone que HptB activa por fosforilación al RR PA3346, un regulador que posee actividad enzimática de fosfatasa en su dominio de salida; a su vez el RR PA3346 activa mediante desfosforilación a una proteína que actúa como un factor anti-anti-sigma (PA3347). Sin embargo, a la fecha se desconocen tanto el factor anti-sigma como el factor sigma controlados por PA3347 (Bordi, 2010).

A la HK PA2824, también llamada SagS (Surface Attachment and Growth Sensor hybrid), se le ha relacionado con la estabilidad de la biopelícula formada por la bacteria e indirectamente con la expresión de *rsmY* (Petrova & Sauer, 2011).

A diferencia de *P. aeruginosa*, *A. vinelandii* solo posee un gen que codifica para una proteína citoplásmica con un dominio Hpt, siendo esta homóloga a HptB (Avin34350). Con respecto a la HK PA1611, la cual interactúa con RetS en *P. aeruginosa*, no se encontraron homólogos. Sin embargo, sí se encuentra un homólogo de PA2824 (Avin 15460), que como se recordará en *P. aeruginosa* también puede fosforilar a HptB (Fig.4). De forma interesante en el locus donde se encontró el homólogo para HptB también se encontraron homólogos putativos para el RR PA3346 (Avin34360) y para el anti-anti-sigma PA3347 (Avin34370) (Fig.4), lo cual sugiere que en *A. vinelandii* existe una cascada de regulación formada por RetS, Avin16460 (GacS2), HptB, el RR Avin3346 y el anti-anti-sigma Avin3347 que podría controlar la expresión de *rsmY*. Por otra parte, cabría la posibilidad de que Avin_15460 pudiera suplir funcionalmente al homólogo ausente de PA1611 bloqueando funcionalmente a RetS involucrándose así en la expresión de los sRNAs de las familias RsmZ y RsmY. Al gen *Avin_15460* se le llamó *gacS2* por su alta similitud en su dominio H1 con la cinasa GacS.

HptB-mediated Phosphorelay in *P. aeruginosa*

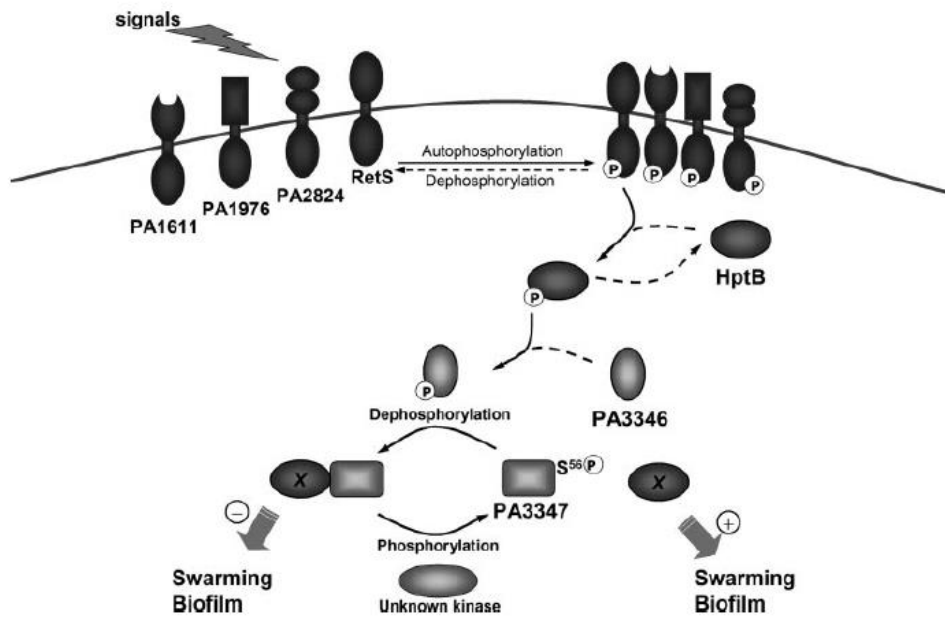


Figura 4. Cascada de regulación hipotética de HptB en *P. aeruginosa* (Hsu et al., 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de la industria, los alginatos, han adquirido gran importancia en los últimos años; estos tienen la capacidad de actuar como agentes estabilizantes, gelificantes, espesantes y formadores de películas (Avedaño et al., 2013). La realización de este trabajo tendrá como beneficio la generación y actualización de conocimiento sobre la regulación de síntesis de alginatos producidos por *A. vinelandii*.

4. HIPÓTESIS

El gen *Avin15460* está involucrado en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Estudiar el papel del gen *Avin15460* en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*.

5.2. Objetivos particulares

- Generar mutantes del gen *Avin15460* y sus derivadas complementadas con el gen silvestre.
- Establecer el efecto de la mutación en la producción de alginato, y en su caso, en la expresión de *algD*.
- Determinar si *Avin15460* controla la expresión de los genes que codifican para los sRNAs RsmZ1 y RsmY.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

CEPA	Características	Referencia	Cultivo
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>SupE44, ΔlacU169, hsdR17, resA1,</i>	Gibco BRL	Medio Luria Bertani (LB)/37°C
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Cepa silvestre, <i>Nal R</i>	Larsen y Haugh (1971)	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.015 mg/mL

AEIV (E)			
AEIV$rsmZ1-gusA$	Derivada de la cepa E que porta una fusión transcripcional $rsmZ1-gusA$	López, 2018	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.015 mg/mL Tetraciclina 0.020 mg/mL
AEIV$rsmY-gusA$	Derivada de la cepa E que porta una fusión transcripcional $rsmZY-gusA$	López, 2018	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.015 mg/mL Tetraciclina 0.020 mg/mL
AEIV$algD-gusA$	Derivada de la cepa E que porta una fusión transcripcional $algD-gusA$	López, 2018	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 0.015 mg/mL Tetraciclina 0.020 mg/mL

PLASMIDO	CARACTERÍSTICAS	
pGEM T Easy	Vector de clonación, , Amp R	Promega
pJET 1.2	Vector de clonación, Amp R	ThermoFisher scientific
pUMATc	Vector integrativo, que permite recombinar material genético en el locus <i>melA</i> de <i>A. vinelandii</i> . Tc R	

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA
gacS2 D	5´ TCG CCC TCG TCC TGC TGG TGG TGT 3´
gacS2 R	5´ TCG AGG GCG GCG GCG GGC TGA GG3´
Gm Rv	5´ GCA TCA TTC GCA CAT GTA GG 3´
gacS2com Fw	5´ CCA GGG TGC GGC TCC AGT CG3´

gacS2 th Rv	5' GAG CTC TCA TGT GGC ATT CGC CCC3'
Tc Rv	5' GCT AGC AGC ACG CCA TAG TGA 3'
gusA1	5' TGT AAC GCG CTT TCC CAC CAA C 3'

6.2. Medios de cultivo

6.2.1. Medio Luria Bertani (LB)

Fórmula	Cantidad (g/l)
NaCl	5.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de caseína	10.0
Agar Agua*	15.0
*Se adiciona en caso de preparar medio sólido	

6.2.2. Medio mínimo Burk-Sacarosa (BS)

Fórmula	Cantidad (g/l)
K_2HPO_4	8.0
KH_2PO_4	2.0
Sacarosa	200.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.3
Na_2SO_4	18.3
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	16.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.2
Para medio sólido se adiciona:	
Agar bacteriológico	15.0

*Ajustar a pH 7.2

6.2.3. Medio de competencia (CM)

Fórmula	Cantidad (g/l)
K_2HPO_4	8.0
KH_2PO_4	2.0
Sacarosa	200.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.3
Na_2SO_4	18.3
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	16.0
Para medio sólido se adiciona:	
Agar bacteriológico	15.0

*Ajustar a pH 7.2

6.3. METODOLOGÍAS

6.3.1. Extracción de plásmido por lisis alcalina

Se inocula 3ml de LB líquido con antibiótico con la cepa de interés, se incuba a 37°C y 200 rpm durante un tiempo aprox. De 14 hrs. Se centrifuga el medio de cultivo y se lava la pastilla con 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM. Se adiciona 100 μ l de Solución I (Glucosa/Dextrosa 50 mM, EDTA 10 mM, 25 μ l TRIS a pH8). Se agrega 200 μ l de Solución II (preparada al momento 80% H_2O , 10% NaOH 2N, 10% SDS). Se mezcla muy suavemente por inversión y dejar reposar en hielo 10 min. Adicionar 150 μ l de solución III (40 ml de CH_3COOK 3M ajuste de pH 4.8 con ácido acético glacial), reposar otros 10 min y centrifugar 15 min a 13 000 rpm. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, colocar 10 μ l de sílica. Reposar 5

min para posteriormente centrifugar 2 min a 13 000 rpm, lavar el pellet con New Wash (500 µl) por triplicado, dejar secar a 37°C y resuspender en 30 µl de RNAsa diluida (4µl de RNAsa en 1000 µl de H₂O). Finalmente centrifugar para recuperar el sobrenadante.

6.3.2. Extracción de ADN plasmídico MAXIPREP

Partir de un cultivo de 40 ml y lavar las células con MgSO₄ 10 mM, resuspender en 1.5 ml de solución I, agregar 3.5 ml de solución II y mezclar por inversión. Se deja durante 10 min en hielo y se agrega 2.5 ml de solución III, mezclar suavemente. Dejar reposar durante 10 min para posteriormente centrifugar por 10 min a 6000 rpm. Transferir cuidadosamente con una punta el sobrenadante a tubos limpios y adicionar 5 ml de Isopropanol, mantener en hielo 10 min y centrifugar a 6 000 rpm, decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70% por triplicado, dejar secar a 37°C y adicionar 200 µl de RNAsa diluida dejar incubar hasta eliminar el RNA.

6.3.3. Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

De una placa fresca Bs con la cepa que se desea transformar se cultiva una placa CM, incubar por 48 horas a 30°C (1er pase). Realizar un segundo pase a placa CM cultivando sobre toda la superficie de la placa (masivo) e incubar por 48 horas a 30°C. MgSO₄ Recuperar las células por centrifugación 13 000 rpm/10 min para proceder a transformar.

6.3.4. Transformación de *A. vinelandii*

Mezclar en un microtubo 200 µl de células competentes y 10-20 µg de DNA plasmídico (MaxiPrep) y mezclar completamente, para verter la mezcla en una placa de CM, dejar secar e incubar durante 48 horas. Posteriormente recuperar el tapete celular y lavar con MgSO₄ 10 mM centrifugar durante 5 minutos a 13 000 rpm hasta retirar el alginato. Posteriormente resuspender la pastilla celular en MgSO₄ 10 mM o medio BS líquido de acuerdo a la cantidad de células, plaquear con perlas en medios BS con el antibiótico que nos permita seleccionar posibles recombinantes, dejar secar e incubar 48 horas 30°C para seleccionar candidatas.

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

Se crecen la células en medio Burk Sacarosa con antibiótico de selección durante 2 días a 30°C, cosechar las células y lavar con MgSO₄ para quitar alginato, resuspender en 450 µl de buffer TRIS EDTA 50/20, agregar 50 µl de lizosima (10mg/ml) e incubar 30 min a 37°C; agregar 30 µl de proteasa (10mg/ml) incubar 30 min a 37°C; agregar 50 µl de SDS (10%) e incubar 15 min a 37°C; agregar 100 µl de NaCl 5 M e incubar 10 min a 65°C, adicionar 80 µl de solución CTAB 10% NaCl 0.7M (previamente incubada a 65°C) e incubar 20 min a 65°C, extraer con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y centrifugar por 5 min. Pasar sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 10 µl de sílica para posteriormente centrifugar 1 min, decantar sobrenadante y lavar 3 veces con 500 µl de solución NEW WASH y dejar secar la pastilla a 50 °C para ser resuspendida en 30 µl de RNAsa diluida dejándola incubar a 37°C/1 h.

6.3.6. Mutación del gen *Avin15460* (*gacs2*) en cepas con fusiones transcripcionales de los genes *rsmY*, *rsmZ1* y *algD*.

Se cultivó en medio Burk Sacarosa (BS) a la cepa mutante *EgacS2::Gm*, se recuperaron las células por centrifugación y se lavó el paquete celular con NaCl 0.85% para posteriormente agregarle 2 ml de buffer 1 (15 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, SDS 0.05% a un pH 7), lisar e incubar 60° C/ 1h, para finalmente mezclar 100 µl de células competentes de las cepas mutantes que contienen fusiones transcripcionales de los genes *rsmZ1*, *rsmY* y *algD* (Fig. 5) (López, 2018) con 100 µl del lisado de las células donadoras.

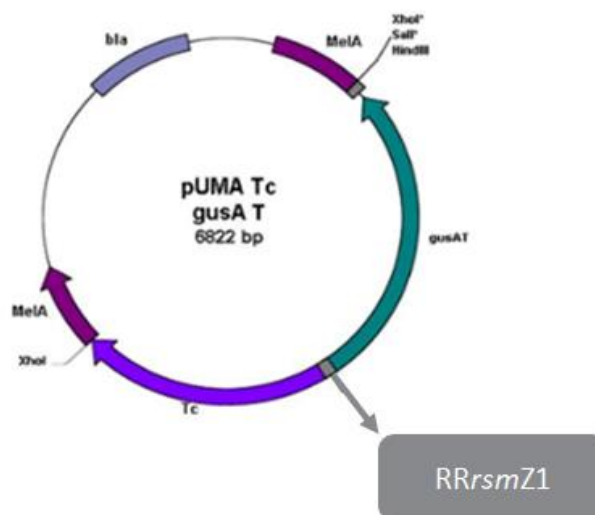


Figura 5. Construcción del plásmido de las fusiones transcripcionales con el gen reportero *gusA* (β -glucoronidasa) (López, 2018).

6.3.7. Cuantificación de alginato por el método de carbazol

Crece inóculo estandarizado en 25 ml de medio Burk Sacarosa con antibiótico de selección durante 48-72 horas a 30°C, cosechar las células y lavar con solución de EDTA 0.01M, agitar y centrifugar 4000 rpm/10 min. Se determina proteína por el método de Lowry. Una porción del sobrenadante se precipita con 2 volúmenes de isopropanol, anotar la fracción del sobrenadante para posteriormente el precipitado se recupere por centrifugación, se seca y se resuspende en un volumen adecuado de H₂O o en solución NaCl 0.85%.

Para la reacción de alginato-carbazol se deposita 3 ml de solución ácido sulfúrico-boratos 1:40 un tubo de ensaye de vidrio previamente sumergidos en hielo. Cuidadosamente colocar 350 µl de la solución problema de alginato con las siguientes concentraciones 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 100 µg de alginato/ml de solución. Se añadió 100 µl de carbazol al 0.1% y agitar. Se coloca la reacción en un baño de agua a 50°C/30 min y se lee absorbancia a 530 nm y se reporta con base a la curva de calibración la producción específica de alginato en mg de alginato/mg de proteína.

6.3.8. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se toma 1 ml de cultivo problema y centrifugar hasta obtener el paquete celular, lavar las células con MgSO₄ 10 mM ó con NaCl 0.85%. Resuspender las células en 1 ml. Tomar el volumen adecuado para que la medición de proteína quede en valores dentro de la curva estándar. Llevar la muestra a un volumen de 200 µl con H₂O dd, añadir 1 ml de la solución reactiva e incubar por 10 min, añadir 0.1

ml de reactivo de Folin diluido con un volumen de H₂O dd y dejar reposar por 30 min. Leer absorbancia a 625 nm, correr al mismo tiempo una curva de calibración, usando albúmina Sigma (solución Stock a 2 mg/ml).

6.3.9. Cuantificación de la expresión de los sRNAs *rsmZ1* y *rsmY*, y del gen *algD* (Medición de la actividad de β -glucoronidasa).

Se cultiva las cepas por 18 h, se lavan con MgSO₄ 10 mM y se estandariza el inóculo por 30°C durante 48 h. Se toma una muestra de 1 ml de cultivo y centrifugar la muestra para obtener el paquete celular a 20°C y resuspender la pastilla en 1ml de MgSO₄ 10 mM. Tomar 20 μ l de la muestra y agregar 710 μ l de amortiguador Z (K₂HPO₄ 0.03 M, KH₂PO₄ 0.02 M, EDTA 0.001 M, PTT 0.005 M). agregar 10 μ l de solución de lisozima 10mg/ml e incubar 50 min a 37°C en baño maría. Agregar 10 μ l de una solución tritón 10%, agregar 100 μ l de solución 4-Nitrofenyl β -D-glucopiranosido (PNPG) 4mg/ml, colocar los tubos a 28°C (Temperatura de reacción) en baño de agua por 15 min. Se agrega 150 μ l de solución Na₂CO₂ 1.2 M para obtener la reacción y leer absorbancia a 405 nm.

$$\beta\text{-glucoronidasa} = \frac{\text{DO (405 nm)} \times 100}{(0.018)(\text{TRx min}) (\text{vol Rx } \mu\text{l}) \left(\text{mg de } \frac{\text{proteínas}}{\text{ml}}\right)}$$

6.3.10. Condiciones de amplificación por PCR

DNA 1:5

2 μ l

Buffer Dream 10X	5 μ l
Nucleótidos 1.25 mM	8 μ l
Enzima Dream	0.4 μ l
H ₂ O	32.6 μ l
Primer Fw \approx 30 nmol	1 μ l
Primer Rv \approx 30 nmol	1 μ l

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Búsqueda del gen homólogo a PA1611 de *P. aeruginosa* en *A. vinelandii*.

El trabajo se inició repitiendo la búsqueda del homólogo para PA1611, no solo buscando proteínas homólogas en la totalidad de su secuencia sino también buscando proteínas que tuvieran conservados alguno de sus dominios. La búsqueda arrojó resultados negativos para PA1976 y PA1611 pero si ratificó un homólogo de la HK PA2824 (SagS) (fig. 6). La HK encontrada esta codificada por el gen *Avin_15460* (Gene ID: 7760481). En estudios previos ya se había localizado al gen *Avin_15460* por ser una cinasa híbrida con un dominio H1 muy parecido al de GacS, por lo que se le llamo GacS2. Ya que la HK PA2824 pertenece al grupo de la PA1611 se planteó la posibilidad de que el homólogo a la PA2824 podría sustituir funcionalmente al homólogo de la PA1611 bloqueando a RetS. Otra posibilidad es que *Avin_15460* actuara en una vía de señalización independiente a GacS/A probablemente relacionada con HptB. Cabe mencionar que en el contexto genómico *Avin_15460* se encuentra en contrasentido de dos genes flanqueantes que codifican para una proteína hipotética (*Avin_15470*) y la glutathion peroxidasa (*Avin_15450*) (Fig. 7)

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

GacS2 -----MNIAPTNRLSYKQASLAVLAAFVGLTLLSLAKISLDYASQSASIER 46
SagS   MLGGRTSPRLIPAPMDIALTHRLSFKQASLTVLVAFILGTLSSLIQVGVYASQDASINR 60
      *:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 EINSLQQISLNPAAARIAYNIDAEALQELLLGLLRSPAVIGAEIVGSDQRPLAAVSRPAMN 106
SagS   EVRALLDVSHNPAARIAYNIDAEALQELVLGLLRSPAVVRAEIIDTSGPLASASREPAE 120
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 SEYRVFSOMLFKPRRYFEAPLSIAHAPDEALGFLRLEIDTYAFGSAFLERSGLTLLTGFA 166
SagS   SRLRPLSDFLFGHKRVYEDPLHVDHAPGEALGVHLLEIDTFVFGNDFLRAGITLLSGFV 180
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 SLLLLLALLLVFNRMRLRPLIGIQRLESEHNPNES--RPLPCPRHESDEIGILVQAIN 224
SagS   RLLLLLILLVLFYTLTKPLVSLIQALSGHDPSPARMRLPCPKGHERDEIGVLEVIN 240
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 QLLRKTQGEIEQRREAENRLEYLEENMVSARTAELEAANARLTQSNRDLAARSTAL 284
SagS   RQLGRISVEIEQRREAENRLTYLEELSIVAARTAELEAANARLTLSNQLEEARQAL 300
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 EMAQARSFLANMSHEIRTPNLNGLLGMLSLSDGPLSNEQRQQLSVAHASGKVLVRLND 344
SagS   DMAQARSFLANMSHEIRTPNLNGLLGMLSLSDGPLTPEQRQQLSIAHDSGKVLVRLND 360
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 VLDLSKFESGOMELERIPFDLGGALIEDATALLSQSAAPGVELTCLIDPGLPTQVIGDPTR 404
SagS   VLDLSKFAGQLVLEQIPFDLGVLEDTASLLSQNAAGVELTCLVDPALPAQVSGDPTR 420
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 VRQIASNLISNALKFTRFGRVDVCLQASSENVRVIRDTGIGISREAQTRIFQFPAQATA 464
SagS   IRQIVSNLLSNALKFTRLGRVDVREATAEGVRISVRTDGTGIAQEAALDRIFQFQADA 480
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 NITRQYGGTGLGLALTRKLCAMQGQLTFFSKEGLGSTFTVELPLPCHTPATPRVPLHGR 524
SagS   GITRQYGGTGLGLALTRKLCAMQGLTVESTVGLGSLFSVGLPLAPVSPPLQALPLRGR 540
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 VIGMTPGSSGLAQLLEMHLPGWGLEYYRRLDIGSGLAGVGTDLITDCPQCLLGMRAVSA 584
SagS   VIAQCSANGLAQLLQTLWLRWGLEYKRLTDDSLGHSLDVLISDCPDCLMGLRPSIGT 600
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 PFLVVAAYGSFLPREETHALAPLQQLARPLSRAALYQAVVRALQAVEEPQAALEAVQAT 644
SagS   PILLVTAYGSFLEPELARRLSPLRQLARPLSRNQLYQALKVLEHTAI-APSSASDTTGE 659
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 PRQRQVLLVEDNPVNQMVAKGMLAKLGYEVAIAPHGAEALSYLEHGPVDLILMDCNMPVM 704
SagS   QRNTRVLLVEDNPVNQLVAKGLLHKLGCQW-IAEHGLNALKMLEEHPIDLVLMDNMPVM 718
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 DGYETSRRIRQDGRWSELPPIIALTANVLPPEERERCRTAGMNDYLAKPLRREDLANMLHTW 764
SagS   DGYEATRQIRDSGRWGLPIIALTANALPDERERCRAAGMDDYLAKPFHREDELKAILDRW 778
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      *:*:*:*:*:*:*:*:*:*

GacS2 LPGGANAT 772
SagS   CPLTASD- 785
      * *

```

Figura 6. Alineamiento de secuencia múltiple BLASTX GacS2 vs SagS (71.25 % de identidad).

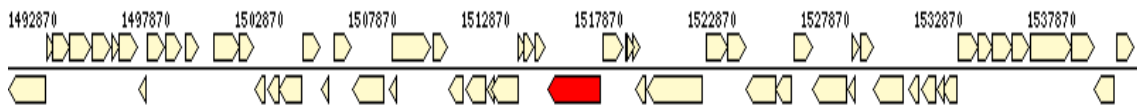


Figura 7. Ubicación de Avin_15460 en el contexto genómico de *A. vinelandii*

7.2. Verificación de la construcción del plásmido pGEMgacS2::gm

Se verificó el plásmido mutagénico previamente construido dentro del laboratorio pGEMgacS2::Gm realizándose un patrón de restricción usando la enzima *Pst*I (Fig. 8).

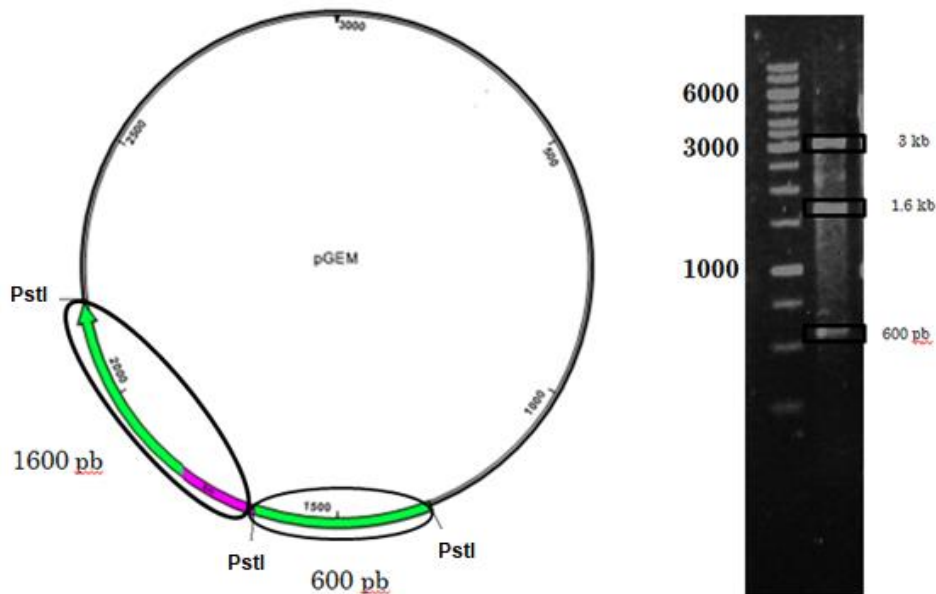


Figura 8. Patrón de restricción con *Pst*I de la construcción del plásmido mutagénico pGEMgacS2::Gm

7.3. Comprobación de la mutación de GacS2 en cepa silvestre.

Se realizó la transformación del plásmido pGEMgacS2::Gm en células competentes de la cepa silvestre E de *A. vinelandii* donde se recuperaron transformantes que pudieron establecer un evento de doble recombinación homóloga, la cual se probó por análisis de PCR en el ADN total de la mutante y se usaron dos pares de oligonucleótidos, un par que aparea con el gen silvestre (Primer gacS2 Fw y Primer gacS2 Rv) (Fig. 9) y otro que hibrida con el gen

silvestre y con el casete de resistencia a gentamicina (Gm) (Primer gacS2 Fw y Primer Gm) (Fig. 10). El experimento se realizó bajo estas condiciones:

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión
Primer gacS2 Fw	68 °C	3 min
Primer gacS2 Rv		

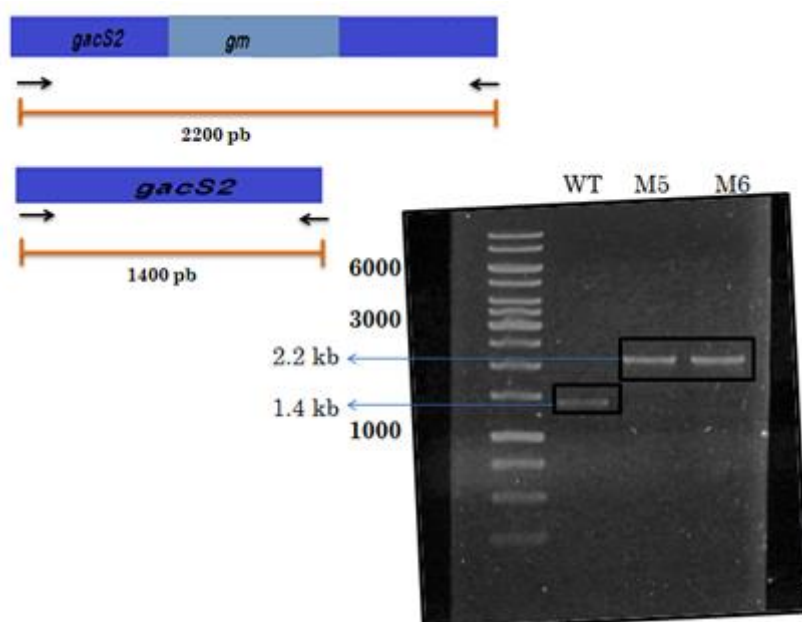


Figura 9. Comprobación por PCR de la mutación en *A. vinelandii* utilizando oligonucleótidos que reconocen los extremos del gen silvestre *gacs2*.

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión
Primer gacS2 Fw	62 °C	1 min
Primer Gm		

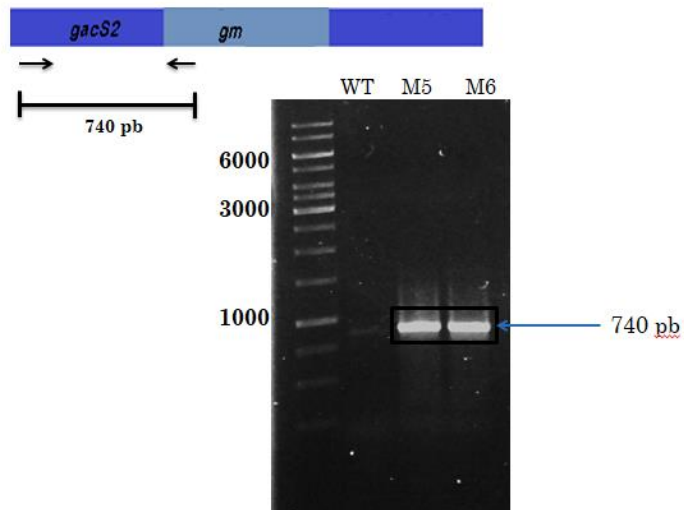


Figura 10. Comprobación de la mutación del gen *gacS2* por análisis de PCR utilizando un par de oligonucleótidos que reconocen los extremos río arriba del gen silvestre *gacs2* y el casete de resistencia a Gm.

Una vez verificada la mutación se realizó el crecimiento en medio mínimo y se pudo observar en una disminución en la síntesis del alginato (Fig.11).

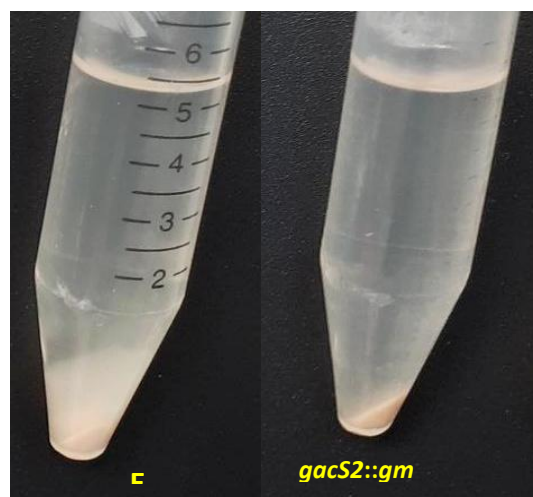


Figura 11. Fenotipo de producción de alginato en las cepas silvestre AEIV y AEIV*gacS2*. Se cosecharon células crecidas en BS sólido, en ambas fotografías podemos ver en el fondo del tubo cónico el paquete celular y en la parte superior el exopolisacárido.

7.4. Construcción del plásmido integrativo pUMATcgacS2 para la complementación de la cepa mutante.

Para realizar la complementación se diseñaron oligonucleótidos (Primer gacS2 com Fw y Primer gacS2 Th Rv) con los que se amplificó el gen *gacS2* y su región reguladora (Fig. 12), uno de los oligonucleótidos cuenta con un extremo *SacI*, así el amplicón por estrategia se clonó en el vector de mantenimiento pJET 2.0 poder *XbaI* (Fig. 13). Una vez clonado el fragmento en pJET2.0 se escindió con las enzimas *XbaI* y *SacI* para finalmente subclonarlo en el plásmido integrativo pUMATc generando el plásmido recombinante pUMATcgacS2com (Fig.14).

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión
Primer gacS2 com Fw	56 °C	3 min
Primer gacS2 Th Rv		

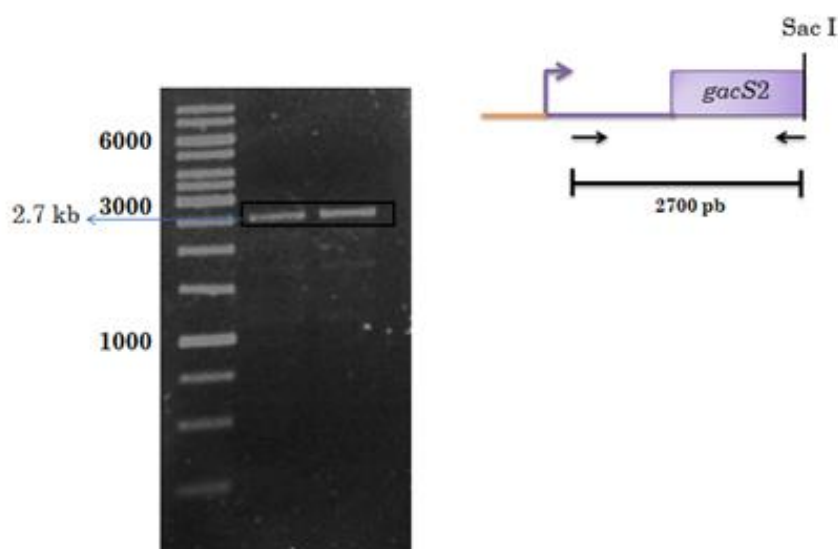


Figura 12. Amplificación del gen silvestre *gacS2* con su región reguladora (RR)

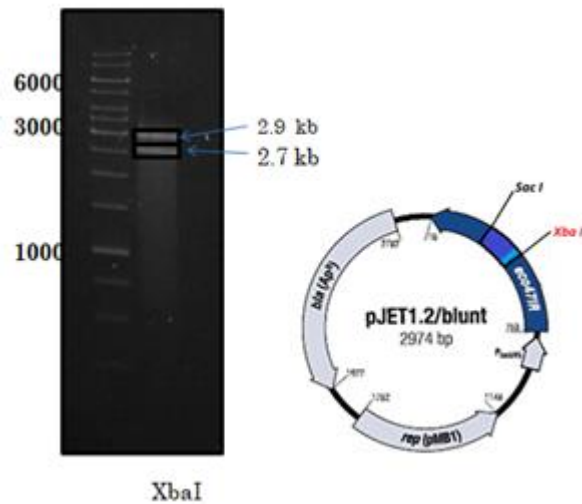


Figura 13. Clonación de *gacS2* con su RR en el vector de mantenimiento pJET 2.0 para generar el extremo *XbaI* flanqueando la RR de *gacS2*.

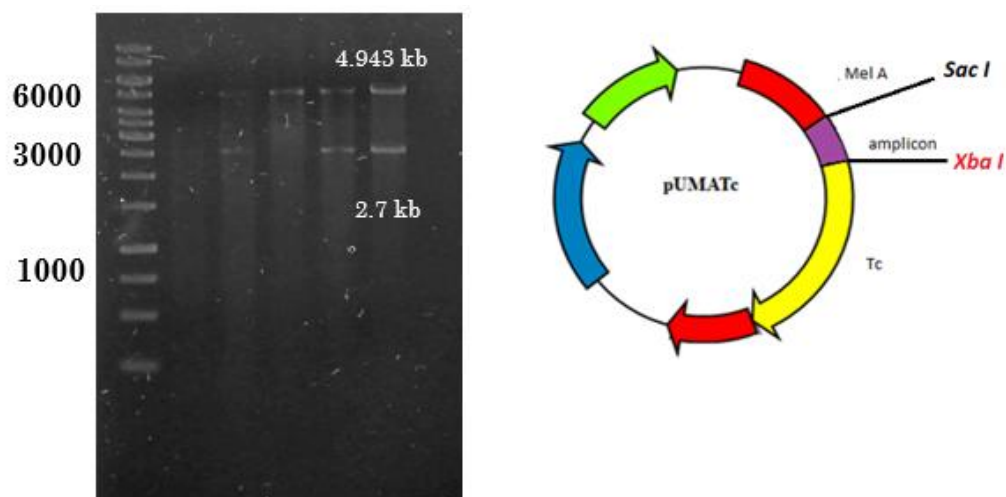


Figura 14. En el carril 5 muestra la digestión enzimática *XbaI* y *SacI* del plásmido integrativo pUMATc*gacS2com*.

7.5. Comprobación de la cepa complementada.

El plásmido pUMATc*gacS2com* se transformó en la cepa mutante *EgacS2::Gm* obteniendo transformantes donde hubo recombinación del gen *gacS2* silvestre en el locus neutro *meIA*. Dicha complementación se comprobó mediante análisis

de PCR (Fig. 15) Como resultado del experimento de complementación observamos la restauración del fenotipo mucoide silvestre (Fig. 16) con lo que podemos probar que el gen *gacS2* es el responsable del fenotipo observado.

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión
Primer <i>gacS2</i> com Fw	56 °C	3 min
Primer Tc		

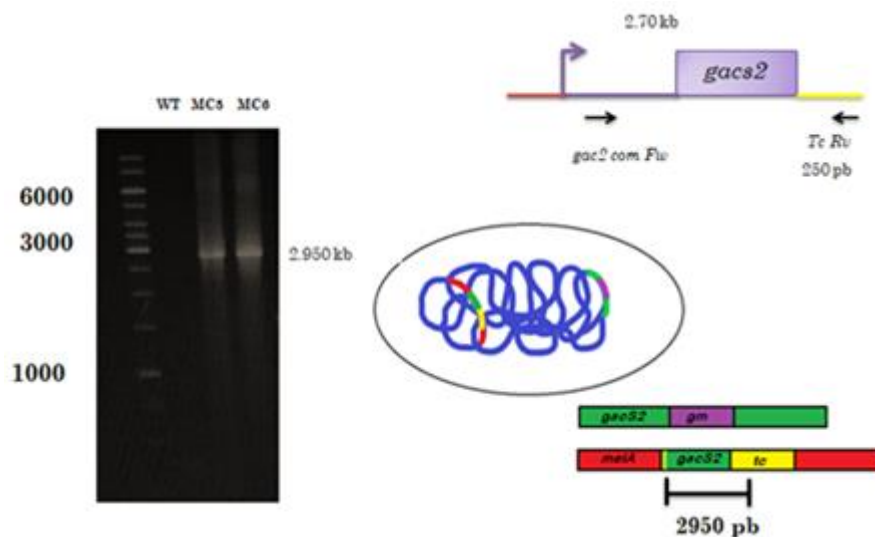


Figura 15. Amplificación del gen silvestre *gacS2* con su RR en la mutante *gacS2::gm* complementada. En el carril 1 se encuentra la cepa silvestre, en el carril 2 y 3 son amplificaciones de la inserción del gen silvestre en un locus neutro *MeIA*.

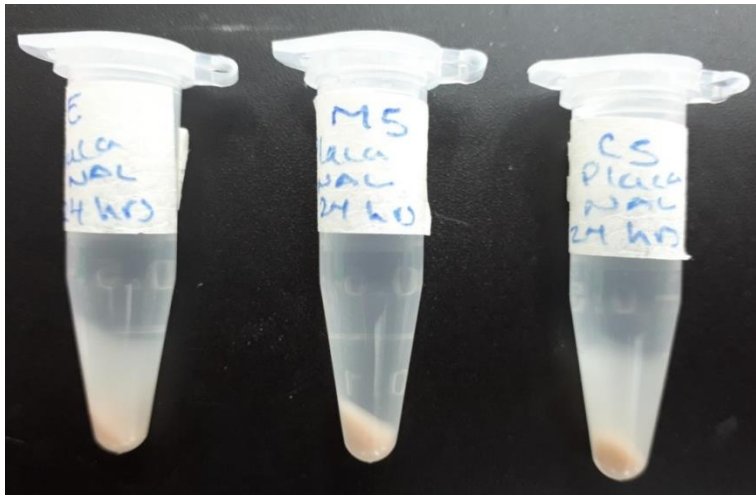


Figura 16. Fenotipo de la cepa silvestre AEIV (E), de la mutante *EgacS2::Gm* (M5) y la mutante complementada *EgacS2com* (C5), las células fueron cosechadas de cultivos realizados en medio BS sólido a las 24 h de incubación a 30 °C.

7.6. El gen *Avin_15460* (*GacS2*) está implicado en la regulación de la síntesis de alginato.

La transformación del plásmido pGEM*gacS2::Gm* en células competentes de la cepa silvestre E de *A. vinelandii*, tuvo influencia en la producción de alginato al generar la mutación en el gen *gacS2* (Fig. 17), disminuyendo considerablemente la producción de dicho polisacárido. Esto evidencia una actividad reguladora positiva en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*. En *P. aeruginosa* PA1611 contrarresta la función reguladora negativa de RetS sobre GacS, por lo que mutaciones en PA1611 producen una disminución en la expresión de genes y metabolitos controlados por GacS (Bhagirath, 2017). En el caso de *A. vinelandii* RetS actúa de manera contraria, es un regulador positivo, por lo que si *GacS2* contrarrestara la actividad de RetS la mutación de *gacS2* tendría que generar un

fenotipo negativo en la síntesis de alginato. Este dato sugiere fuertemente que GacS2 en *A. vinelandii* no está relacionado con RetS, apuntando a que es más probable que GacS2 sea parte de la vía en la que interviene HptB.

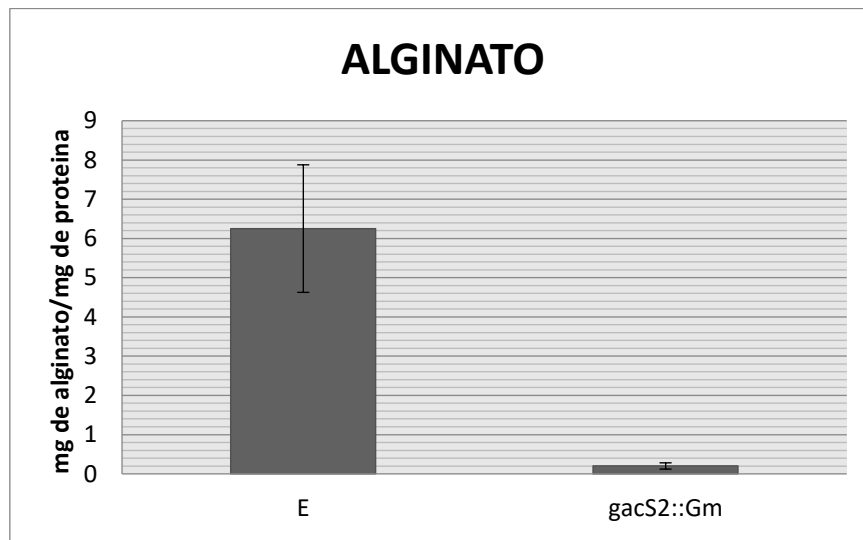


Figura 17. Cuantificación de alginato por el método espectrofotométrico de Carbazol de la cepa silvestre AEIV (E) y de la mutante *EgacS2::Gm* la determinación se realizó en cultivos en BS líquido a las 24 h de incubación a 30 °C.

En los ensayos de cuantificación de alginato, se observó que la cepa complementada crecida en BS sólido a las 48 h de incubación (fase estacionaria) procedía a despolimerizar el alginato, esto podría deberse a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o al pH del medio, puesto que el estrés ambiental puede influir en la producción exopolisacáridos en *A. vinelandii* ya que se ha demostrado que la calidad del alginato depende del estrés generado por oxígeno y la concentración de amonio (Sabra et al., 2000). También, una posible mutación generada en la región reguladora o dentro del mismo gen silvestre durante la amplificación del gen podría suscitar una variación en la funcionalidad

del gen silvestre en la cepa complementada, es por ello que no se procedió a realizar la cuantificación de alginato de la cepa complementada.

7.7. Generación de la mutación en las cepas con fusiones transcripcionales de los genes *rsmY-gusA*, *rsmZ1-gusA* y *algD-gusA*.

Para determinar si *gacS2* controla la expresión de los sRNAs *rsmZ1* y *rsmY*, así como al gen biosintético de alginato *algD*, se transformaron células competentes de cepas que contienen fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los genes *rsmZ1*, *rsmY* y *algD* cotranscribiendo el gen reportero *gusA* mediante transformación con lisado celular utilizando como célula donadora a la cepa mutante *gacS2*. La mutación se comprobó mediante PCR, se extrajo ADN total de las cepas recombinantes y se utilizaron oligonucleótidos que reconocen un extremo del gen silvestre y el casete de Gm (Fig. 18). También, se corroboró en cada cepa las fusiones transcripcionales usando un par de oligonucleótidos que reconocen el gen reportero *gusA* y el casete de resistencia Tc.

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión
Primer <i>gacS2com</i> Fw	56 °C	1 min
Primer Gm		

Oligonucleótidos	Tm	Tiempo de extensión
Primer <i>gusA1</i>	65 °C	1.5 min
Primer Tc		

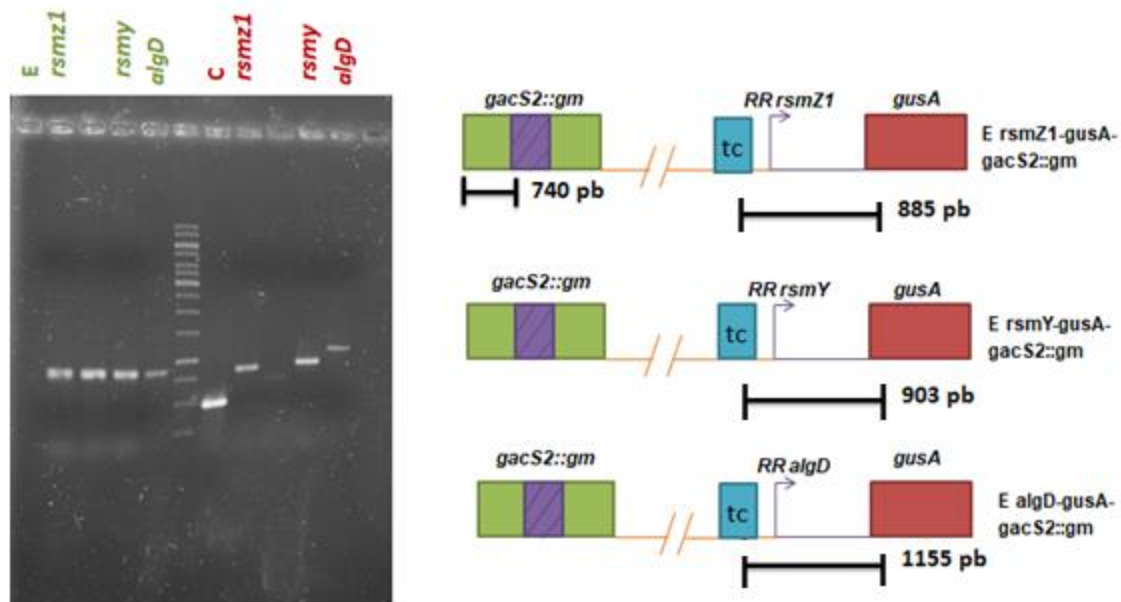


Figura 18. **Izquierda:** Amplificación de la mutación *gacS2* en las cepas que contienen las fusiones transcripcionales *gusA* de los genes *rsmY*, *rsmZ1* y *algD*. **Derecha:** comprobación de la fusión transcripcional de los genes *rsmY*, *rsmZ1* y *algD*.

7.8. Efecto de la mutación de *gacS2* en la expresión de los genes que codifican para los sRNAs reguladores RsmZ1, RsmY y de la GDP- manosa deshidrogenasa.

Una vez obtenidas las mutantes *gacS2* que portan las fusiones transcripcionales *gusA rsmZ1*, *rsmY* y *algD* se cuantificó la expresión mediante la medición de la actividad β -glucuronidasa en las cepas silvestres y sus respectivas mutantes.

Como podemos observar en la gráfica (fig.19) la expresión del gen *algD* no se ve afectada por la mutación generada en *gacS2*; sin embargo, la disminución en la producción de alginato indica que éste HK regula positivamente en la síntesis

de alginato (Fig. 17), sin embargo, no tiene una implicación directa en la expresión del gen *algD* (Fig. 19), gen que codifica para una enzima esencial para la síntesis de alginato, y que es el blanco de regulación de la vía GacS/A- Rsm, lo cual apunta a que GacS2 podría tener una participación distinta a la realizada por esta cascada de regulación.

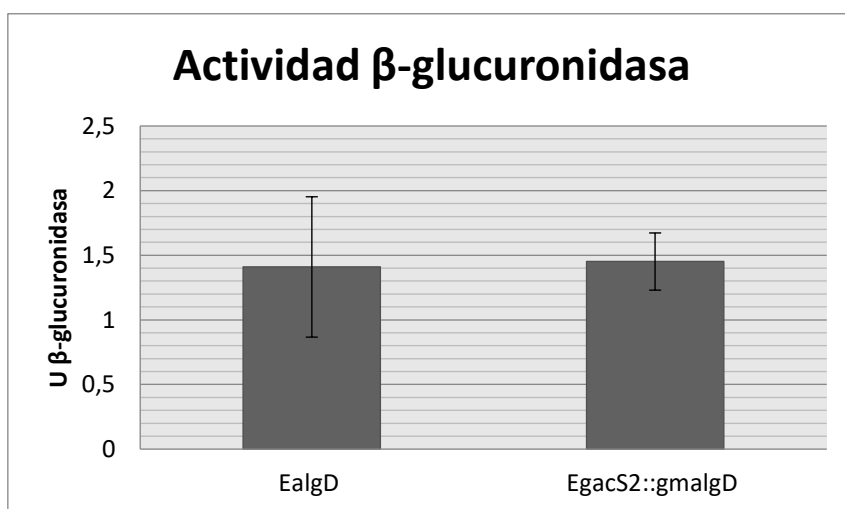


Figura 19. Cuantificación de actividad enzimática del gen reportero β -glucuronidasa de la cepa silvestre EalgD en comparación de la cepa mutante EgacS2::gm algD.

En la Figura 20 se observa que la mutación en *gacS2* disminuye marginalmente la transcripción de la fusión *rsmY-gusA*, pero no tiene efecto sobre la expresión de los sRNA de la familia *rsmZ* (Fig. 20). Lo anterior podría ser explicado por la posibilidad de que GacS2 utilice una vía de regulación independiente a GacS/A como lo reportado en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 donde HptB activa por fosforilación al regulador de respuesta PA3346 que posee actividad enzimática de fosfatasa en su dominio de salida y que regula únicamente la expresión de sRNAs de la familia *rsmY* (Fig. 20) (Bordi, 2010).

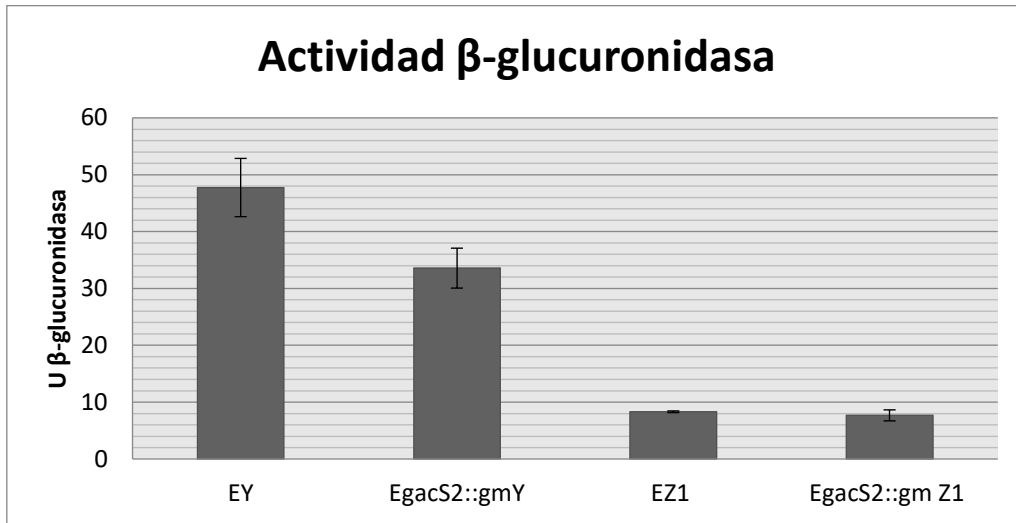


Figura 20. Cuantificación de actividad enzimática del gen reportero β-glucuronidasa de la cepa silvestre EY y EZ1 en comparación de la cepa mutante EgacS2::gmY y EgacS2::gmZ1

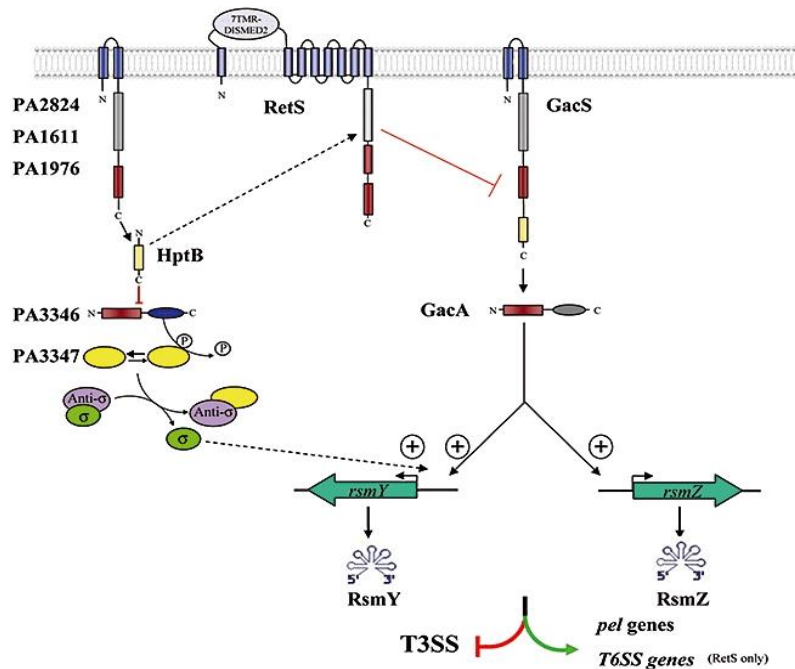


Figura 21. Modelo putativo de regulación a través de la vía PA2824/HptB/rsmY (Bordi, 2010)

Por otra parte, aunque se observa influencia de GacS2 en la transcripción de sRNA *rsmY*, no explicaría el efecto observado sobre la producción de alginato. Por lo anterior, no podríamos descartar que GacS2 podría estar regulando otros genes blancos que codifican enzimas cruciales en la síntesis de alginato como el producto del gen *algA*, enzima bifuncional que cataliza el primer y tercer paso de la biosíntesis de alginatos, *algC* que codifica para la fosfomannomutasa y *alg8* que codifica para una glicosil transferasa membranal que se ha propuesto con actividad de polimerasa (Fig. 1) (Espín, 2009).

8. CONCLUSIÓN

GacS2 regula la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

GacS2 no controla la expresión del gen *algD*.

GacS2 no controla la expresión del gen *rsmZ1*.

Es poco probable que GacS2 esté relacionada funcionalmente con RetS.

9. PERSPECTIVAS

Establecer si GacS2 actúa en conjunto con HptB.

Determinar si GacS2 controla la expresión genes biosintéticos de alginato distintos al gen *algD*.

Investigar si GacS2 está involucrado en la formación de biopelículas como su homólogo SagS en *P. aeruginosa*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, A., & Georgellis, D. (2016). Características y funcionamiento de los Sistemas de Dos Componentes de organismos procariotas y eucariotas. *Química Viva*, 11-27.
- Barba, C. (2014). Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 62-72.
- Bhagirath, A. e. (2017). Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis*, 162-175.
- Bordi, C. e. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol*, 1427-1443.
- Broder, U. N., Jaeger, T., & Jenal, U. (2016). LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Microbiology*, 1-11.
- Chambonnier, e. a. (2016). The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*, 1-30.
- Cruz, Y. (2012). Estudio de la influencia de factores ambientales y genéticos en la expresión de *rsmB* en *Azotobacter vinelandii*. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas*.
- Espín, G. (2009). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Obtenido de Microbios: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>
- Espín, G. (2009). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Recuperado el 17 de octubre de 2019, de Microbios: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of Structure and Function of Response Regulator Output Domains. *Current Opinion in Microbiology*, 150–159.
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 150-159.
- Gao, R., & Stock, A. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*, 133-154.

- Georgellis, D., Lynch, S., & Lin, E. (1997). In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 5429–5435.
- Goodman, e. a. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, 745-754.
- Hendrick, J. (2006). The Family Azotobacteraceae. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt, *The Prokaryotes* (págs. 759-770). New York, U.S.A.: Springer.
- Hernández, A. H. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 1953–1963.
- Kong, W. e. (2013). Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Molecular Microbiology*, 784–797.
- Lapouge, K., Schubert, M. F., & Haas, T. A. (2007). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular microbiology*, 241-253.
- Lin, L. P., & Sadoff, H. L. (1969). Chemical Composition of *Azotobacter vinelandii* Cysts. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 480-486.
- Manzon, e. a. (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 147–159.
- Moll, e. a. (2001). Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *RNA Biology*, 508-516.
- Morales, I. P. (2014). Generación y caracterización de mutantes *rsmA* en *Azotobacter vinelandii*. *Centro de investigación en ciencias Microbiológicas, Posgrado en microbiología*, (págs. 1-30). Puebla.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2011). SagS Contributes to the Motile-Sessile Switch and Acts in Concert with BfiSR To Enable *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 6614–6628.
- Punita, J., S., Reddy, M., & Das, H. (1989). Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 3133-3138.

- Records, A., & Gross, D. (2010). Sensor Kinases RetS and LadS Regulate *Pseudomonas syringae* Type VI Secretion and Virulence Factors. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 3584–3596.
- Reyes, J. I. (2018). Estudio del efecto regulador de las cinasas RetS y LadS sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm en *Azotobacter*. *Facultad de Medicina, Laboratorio de Genética Molecular Microbiana*.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology*, 1321–1330.
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lünsdorf, H., & Deckwer, W. (2000). Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 4037–4044.
- Sánchez, Z. (2012). Estudio de la cascada de regulación GacS/RetS/LadS/GacArsmZ en *Azotobacter vinelandii*. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas*.
- Ventre, e. a. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 171-176.