



Benemérita Universidad Autónoma de  
Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología

Tesis profesional:

**Estudio de la proteína HptB como intermediario en la regulación  
de la biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii* AEIV.**

Para obtener el título de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Alan Shared Meneses Carbajal

Director experto:

D.C. Miguel Castañeda Lucio

Codirector:

D.C. Liliana López Pliego

Revisores:

D.C. Beatriz Eugenia Baca y D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas

Instituto de Ciencias

Puebla, Puebla. Julio 2023

## Agradecimientos

A mi amada esposa; por ser mi hogar y brindarme siempre la motivación e inspiración para seguir adelante, con quien una eternidad no será suficiente.

A mi hermana; un ejemplo de humildad, bondad y superación, aunque sea la menor.

A mi madre y padre, a quienes debo todo lo que soy y con quienes por siempre estaré agradecido por todo el esfuerzo y dedicación.

A mi abuelita Marina por la lata que le doy, sus siempre interesantes relatos y sus deliciosos platillos.

A D.C. Miguel Castañeda Lucio, por ser un ejemplo de pasión por la investigación, por sus sabios consejos y por darme la confianza y conocimiento para hacer posible este trabajo.

A D.C. Liliana López Pliego, por toda la ayuda que me diste en el laboratorio y por ser una gran maestra y excelente persona.

A D.C. Beatriz Eugenia Baca, por todas las maravillosas clases de biología molecular, que eran tan desafiantes como apasionadas y por amablemente proveer la cepa HB101 pRK2013 de *E. coli*.

A mis compañeros de licenciatura y del laboratorio: gracias por su amistad y por compartir tantos momentos de crecimiento académico y personal, con gusto recuerdo esas partidas de UNO.

En memoria de:

† María Elizabeth Gallardo Elizalde, Gracias por la gran persona que me dejas a cargo, por siempre te extrañaremos.

† Diana Elizabeth Hernández Cerón, tu partida fue tan inesperada como la unilateral rivalidad académica que te tenía. Sé que hubieses logrado grandes cosas.

† Alicia Esmeralda Islas Montiel, Fuiste un ejemplo de esfuerzo, dedicación y humanidad, me esforzaré por hacer mejores hombres de mí y mi familia.

# Índice

1. Antecedentes .....	5
1.1. Antecedentes generales.....	5
1.1.1. <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	5
1.1.2. Alginatos.....	6
1.1.3. Sistemas de doble componente.....	7
1.2. Antecedentes específicos .....	9
1.2.1. Biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .....	9
1.2.2. Regulación postranscripcional de <i>algD</i> en <i>A. vinelandii</i> .....	10
1.2.3. Iteración génica de los sRNA RSM en <i>A. vinelandii</i> .....	12
1.2.4. Vía alternativa de regulación de <i>rsmY</i> en <i>P. aeruginosa</i> .....	13
1.2.5. Vía alternativa de regulación de <i>rsmY</i> en <i>A. vinelandii</i> .....	14
1.2.6. HptB y su contexto genómico .....	15
1.2.7. Panorama de la transmisión de la señal a HptB.....	16
2. Justificación.....	18
3. Planteamiento del problema.....	18
4. Hipótesis científica .....	18
5. Objetivos .....	19
5.1. Objetivo general .....	19
5.2. Objetivo particular .....	19
6. Materiales y métodos .....	20
6.1. Vectores .....	20
6.2. Material biológico .....	21
6.3. Oligonucleótidos.....	22
6.4. Medios de cultivo.....	23

6.5. Técnicas y procedimientos .....	24
7. Resultados .....	34
7.1. Estudio fenotípico de la mutación en <i>hptB</i> . .....	34
7.1.1. Clonación del gen <i>hptB</i> . .....	34
7.1.2. Construcción del plásmido mutagénico. ....	36
7.1.3. Obtención de la mutante <i>A. vinelandii hptB::FRT</i> .....	38
7.1.4. Escisión del casete de resistencia a gentamicina mediado por el sistema FLP-FRT. ....	40
7.2. Complementación de la mutante <i>hptB<sup>-</sup></i> y <i>sobre-expresión</i> . .....	43
7.2.1. Clonación del gen estructural <i>hptB</i> . .....	44
7.2.2. Generación del vector integrativo. ....	45
7.2.3. Obtención de las cepas complementada y sobre-expresada. ....	47
7.3. Relación de HptB con <i>rsmZ1</i> , <i>rsmZ2</i> y <i>rsmY</i> .....	49
7.3.1. Obtención de las mutantes con la fusión <i>rsm-gusA</i> . .....	49
7.3.2. Cuantificación de la expresión de los sRNA del sistema RSM. ....	50
7.4. Relación de HptB con las HK's GacS2, RetS y LadS. ....	52
7.4.1. Ensayo de doble híbrido, el sistema LexA. ....	52
7.4.2. Generación del vector "cebo". ....	54
7.4.3. Obtención de las cepas doble híbrido. ....	55
7.4.4. Resultados de la interacción. ....	56
8. Conclusiones. ....	58
9. Perspectivas. ....	61
10. Bioética. ....	61
11. Anexos .....	62
11.1. Anexo 1 – Resultados de la cuantificación de la $\beta$ -glucuronidasa. ....	62

11.1.1.	Curva de calibración albúmina sérica bovina (ASM): .....	62
11.1.2.	Cuantificación de proteína por método de Lowry. ....	62
11.1.3.	Cuantificación de la actividad $\beta$ -glucuronidasa .....	63
11.1.4.	Estadística .....	63
12.	Índice de figuras, tablas y fotografías. ....	65
13.	Bibliografía .....	67

# 1. Antecedentes

## 1.1. Antecedentes generales

### 1.1.1. *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria didérmica perteneciente a la clase de las Gamma-proteobacterias y la familia *Pseudomonadaceae*. Es una bacteria de vida libre, encontrada en suelos y aguas alrededor del mundo. Tiene un cromosoma de 5.36 Mpb con un contenido G/C del 65%.

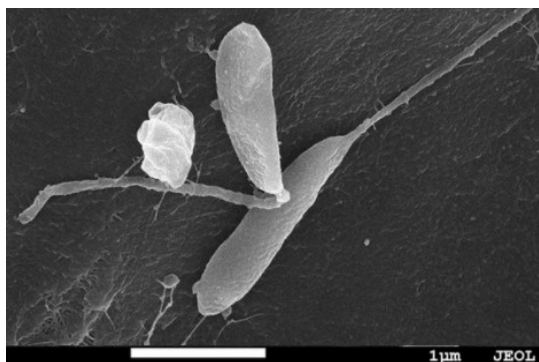


Fig. 1.- Micrografía electrónica de barrido de *Azotobacter vinelandii*, tomado de Smercina, 2019.

Las características de *A. vinelandii* incluyen un estilo de vida obligadamente aeróbico, diazotrófico y móvil mediante flagelos peritricos, la formación de quistes ante un ambiente de estrés físico, químico y nutricional, y posee una morfología celular pleomórfica con células predominantemente ovoides (Smercina, Evans, Friesen, & Tiemann, 2019) dependiendo de su estado fisiológico y condiciones de crecimiento (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

En el área de la investigación muestra la característica favorable de ser competente natural, ya que expresa los genes para tomar ADN lineal del medio y llevar a cabo una doble recombinación con fragmentos homólogos de su genoma, así permitiendo modificaciones estables en el mismo (Page & Sadoff, 1976). Por otra parte, tiene la característica de ser poliploide, ya que posee múltiples copias de su cromosoma, lo cual complica la obtención de mutantes con este alelo completamente segregado en todas las copias del cromosoma (Eberhart, Knutson, & Barney, 2016).

En el área de la industria se han observado un metabolismo secundario bastante versátil, ya que tiene la capacidad de metabolizar una gran variedad de sustratos de carbón, incluyendo alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares (JENSEN, 1954),

también posee una alta tasa de respiración celular, y la capacidad de llevar a cabo la biosíntesis de diferentes compuestos de interés biotecnológico, como el alginato que es un polisacárido estructural importante del quiste así como de la matriz extracelular (Hay, Rehman, Moradali, Wang, & Rehm, 2013) y el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) un poliéster intracelular que acumula al final del crecimiento exponencial, como reserva de carbono y fuente de energía (Urtuvia, Villegas, González, & Seeger, 2014).

### 1.1.2. Alginatos

Los alginatos son polisacáridos lineales compuestos de tasas variables de dos azúcares ácidos: el ácido (1-4)- $\beta$ -D-manurónico (M) y su epímero C-5 el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) unidos covalentemente por enlaces glucosídicos (Hay et al., 2013). Éstos se encuentran arreglados en bloques homopoliméricos de residuos G consecutivos (bloques G) y residuos M consecutivos (bloques M) o bloques heteropoliméricos de residuos M y G alternantes (bloques MG) (Remminghorst & Rehm, 2006) (Fig. 2).

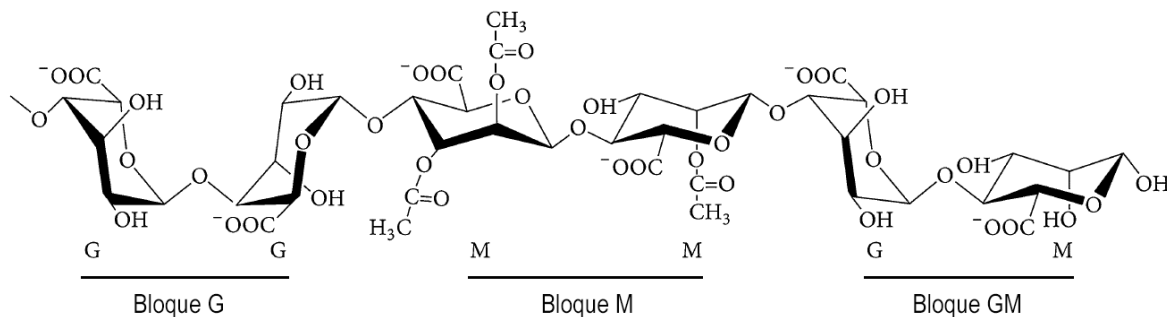


Fig. 2.- Estructura química del alginato en diferentes configuraciones del polímero. Residuos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G) en la molécula. Adaptado de Hay et al. 2013.

Las diferencias en la relación M/G y la configuración del bloque, así como el peso molecular del alginato tienen en cuenta las diferencias en las propiedades y la funcionalidad del mismo, especialmente en la capacidad de gelificación, la resistencia del gel y sus propiedades reológicas (George & Abraham, 2006).

Son estas propiedades únicas del alginato las cuales le permiten desempeñarse como agente espesante, como agente gelificante, estabilizador de la dispersión,

texturizador y formador de filamentos o películas en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética (Urtuvia et al 2012).

El alginato puede ser producido por diversas especies de algas feofíceas, y por dos géneros de bacterias: *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Actualmente se estima que la producción industrial de alginato es de 30,000 toneladas métricas anuales (Draget, Smidsrød, & Skjåk-Bræk, 2002), todas obtenidas de la cosecha de algas pardas, principalmente de los géneros *Laminaria* y *Macrocystis* quienes sintetizan el alginato en conformaciones variables o no reproducibles, dependiendo de diversos factores ambientales.

### 1.1.3. Sistemas de doble componente

Como parte de sus funciones, los organismos perciben y responden de manera rápida y precisa a condiciones ambientales cambiantes. La percepción y procesamiento intracelular de estos estímulos se lleva a cabo por circuitos moleculares que detectan y amplifican las señales, permitiendo la generación de respuestas específicas (Barba-Ostria, 2014), dentro de dichos sistemas biológicos de señalización se encuentran los sistemas de doble componente (SDC); éstos son las vías de señalización con pasos múltiples más abundantes en la naturaleza y se han estudiado exhaustivamente desde su descubrimiento hace más de 30 años (Gao & Stock, 2009).

En procariontes y algunos grupos de eucariontes, existen en una amplia red de sensores y efectores de SDC que regulan una gran variedad de comportamientos, incluidos procesos fundamentales como el metabolismo y la motilidad, además de procesos especializados como la virulencia y el desarrollo (Stock, Robinson, & Goudreau, 2000).

Los SDC clásicos (Fig. 3) están constituidos por al menos dos proteínas, una cinasa histidínica (HK *por sus siglas en inglés*) usualmente embebida en la membrana y un regulador de respuesta (RR) soluble, ambas proteínas tienen una estructura modular, la primera con un dominio de entrada periplásmico y un dominio transmisor

con un residuo de histidina y la segunda con un dominio receptor que tiene un residuo de aspartato y un dominio de salida (Groisman, 2016).

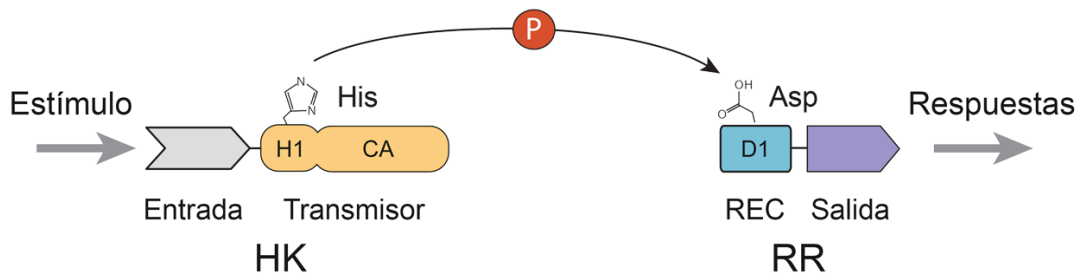


Fig. 3.- Modelo de la estructura clásica de los sistemas de doble componente, HK. Histidín Kinasa, RR. Regulador de Respuesta, REC. Dominio receptor, H1. Residuo conservado de histidina, CA. Centro catalítico, D1. Residuo conservado de aspartato. Adaptado de Gao et al. 2009.

Como forma de transmitir la señal, los SDC utilizan reacciones de transferencia de grupos fosforilo (Fig. 3), el esquema básico de señalización es el siguiente: el dominio de entrada recibe un estímulo extracelular que resulta en la fosforilación del dominio transmisor, después este grupo fosfato es transferido al RR por sí mismo en su dominio receptor así modificando su actividad ya sea de factor transcripcional, resultando en la modulación de la expresión de los genes blanco, o enzimática (Capra & Laub, 2012).

Actualmente se sabe que hay HK's híbridas las cuales incorporan a su estructura un dominio receptor D1 extra y un dominio Hpt (fosfotransferasa histidínica H2), de manera soluble o ligado covalentemente a la proteína (Fig. 4); de este modo expandiendo las vías de fosforilación, con dos o más pasos de fosfotransferencia entre múltiples proteínas siguiendo la ruta de histidina a aspartato y de aspartato a histidina. Un mayor número de proteínas dentro de una vía proporciona más dianas para una regulación más compleja (Zschiedrich, Keidel, & Szurmant, 2016).

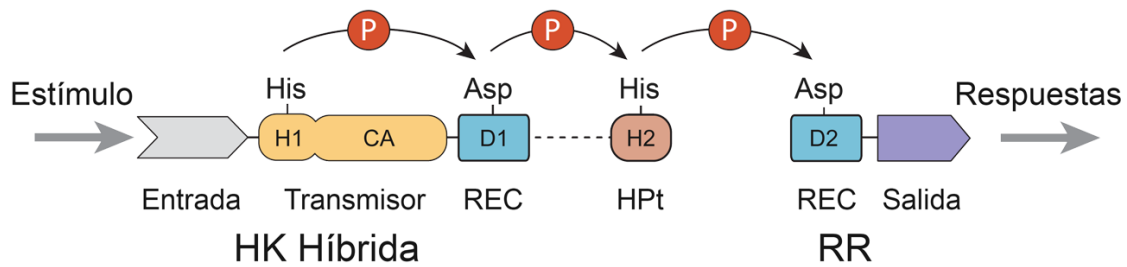


Fig. 4.- Modelo de la estructura de fosforelevo de los sistemas de doble componente, HK. Histidín Cinasa, RR. Regulador de Respuesta, Hpt. Dominio de histidín-fosfotransferasa, REC. Dominio receptor, H1, H2. Residuo conservado de histidina, CA. Centro catalítico, D1, D2. Residuo conservado de aspartato. Adaptado de Gao et al. 2009.

Los SDC han evolucionado para garantizar la eficiencia, especificidad y direccionalidad adecuada de la transmisión de una señal, permitiendo a los organismos que los usan una respuesta rápida y altamente modulable (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019).

## 1.2. Antecedentes específicos

### 1.2.1. Biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*

La biosíntesis de alginato dentro del citosol comienza con la conversión de Fructosa-6-fosfato (F6P) en manosa-6-fosfato (M6P), que es catalizada por AlgA, AlgC entonces convierte M6P en manosa-1-fosfato (M1P), seguido de la conversión a GDP-manosa, que es catalizada por AlgA. GDP-manosa se oxida por AlgD a GDP-ácido manurónico, que es el paso irreversible en la formación de precursores de alginato (Beale & Foster, 1996).

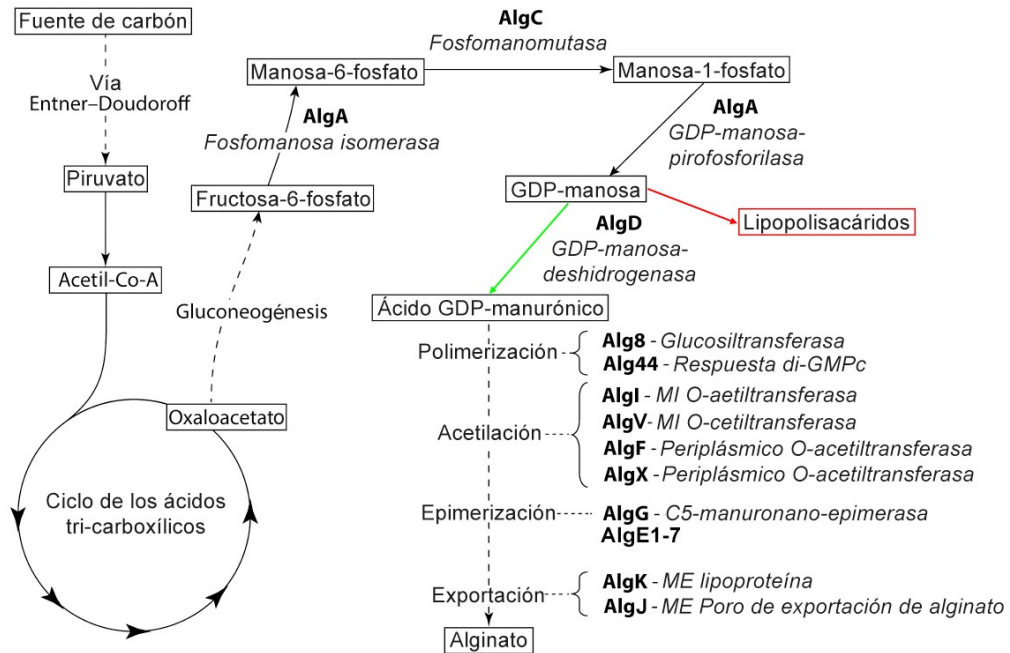


Fig. 5.- Esquema general de la biosíntesis microbiana de alginato. Adaptado de Hay, 2013.

La GDP-manosa puede ir a una de dos vías críticas, se dirige a la síntesis de lipopolisacáridos o a la síntesis de alginatos, según la actividad de AlgD quien dirige el sentido de la reacción hacia Ácido GDP-manurónico, el bloque fundamental de la síntesis de alginatos, ver Fig. 5, (Galindo, Peña, Núñez, Segura, & Espín, 2007); De tal que elucidar cómo se regula a AlgD es esencial para la entender la producción del polímero.

### 1.2.2. Regulación postranscripcional de *algD* en *A. vinelandii*

Trabajos previos en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana han demostrado que el sistema de doble componente GacS/GacA en conjunto con las HK's accesorias RetS y LadS controlan la producción de polímeros en *A. vinelandii* (M Castañeda, Sánchez, Moreno, Núñez, & Espín, 2001; Miguel Castañeda, Guzmán, Moreno, & Espín, 2000). La regulación descrita es realizada controlando la expresión de los pequeños RNAs reguladores (sRNA) del sistema de control postranscripcional Rsm (Miguel Castañeda, Espín, & López-Pliego, 2016; Hernandez-Eligio et al., 2012).

### 1.2.2.1. Sistema GacS/GacA

GacS/GacA es un sistema de doble componente con GacS como la histidín cinasa híbrida de membrana y GacA como el regulador de respuesta con un motivo hélice vuelta hélice; este sistema se encuentra presente en muchas gamma-proteobacterias y regula una gran cantidad de procesos como son la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares, *quorum sensing*, formación de biopelículas y movilidad, entre otros (Francis et al., 2018; Haas & Défago, 2005).

Cuando una señal activa a GacA, esta se “autofosforila” y permite la fosforilación de GacA, de este modo cambiando su estado de actividad y permitiendo la transcripción de sus genes diana (Lapouge, Schubert, Allain, & Haas, 2008) en el caso de *A. vinelandii*, de los pequeños RNA reguladores del sistema RSM de las familias Y y Z (Manzo et al., 2012a) Fig. 6.

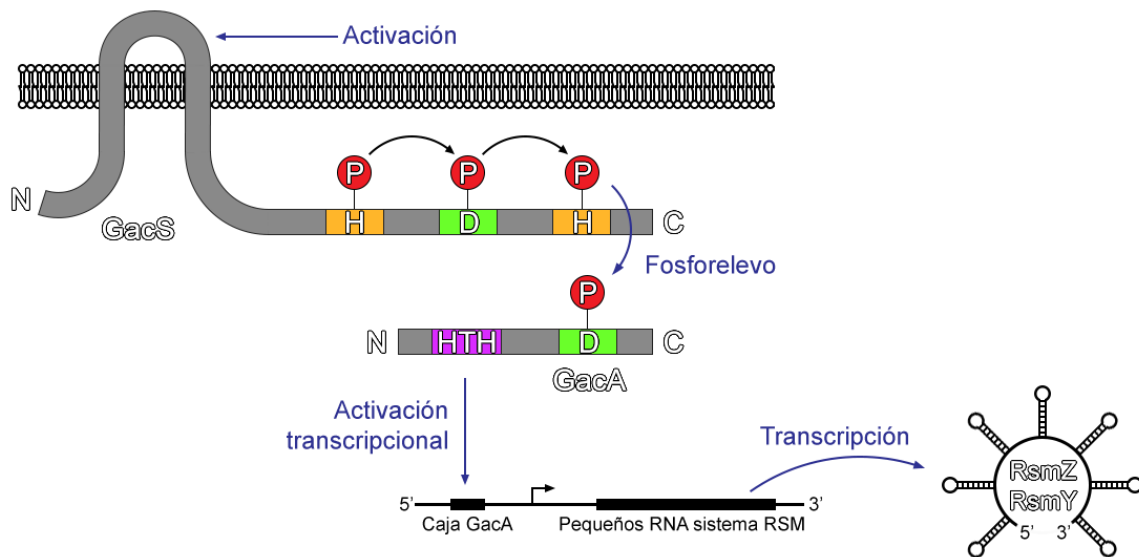


Fig. 6.- Esquema de la regulación que ejerce GacS/GacA sobre la transcripción de los pequeños RNA del sistema Rsm en *A. vinelandii*, H. residuo de histidina, D. residuo de aspartato, P. grupo fosfato, HTH. Motivo hélice vuelta hélice. Adaptado de Lapouge, 2008.

### 1.2.2.2. Sistema RSM

De manera común la región Shine Dalgarno (SD) del mRNA *algD* se encuentra reprimida por una proteína del sistema Rsm, llamada RsmA (Fig. 7), a la cual facilita la degradación del mRNA mediante el complejo RNAsa E.

La des-represión de la traducción del mRNA *algD* se da cuando los sRNA's del sistema RSM se encuentran en el medio, éstos sRNA's secuestran a la proteína del sistema (RsmA) debido a secuencias en estructuras de tallo y asa con alta afinidad por la misma, como resultado, la región SD del mRNA *algD* queda libre permitiendo el reconocimiento y traducción por el ribosoma (Fig. 7-B).

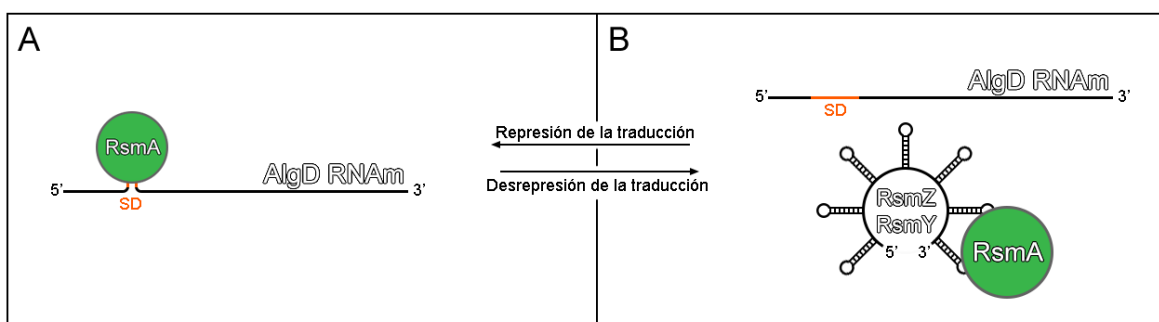


Fig. 7.- Mecanismo de des-represión de *algD* mRNA por el sistema Rsm en *A. vinelandii*. Adaptado de Lapouge, 2008.

Por lo tanto, cuando se activa a GacA, se transcriben los sRNA de las familias RsmY y RsmZ y se des-reprime la traducción del mRNA *algD*.

### 1.2.3. Iteración génica de los sRNA RSM en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* (AEIV) se han identificado 8 alelos diferentes para RsmZ mientras que para RsmY sólo uno (Manzo et al., 2012b), el cual es más grande, cuenta con más secuencias de unión a RsmA (Heeb et al., 2006) y se ha demostrado tener influencia en el sistema de síntesis de alginato y otros procesos fisiológicos en *Pseudomonas aeruginosa* (Bhuwan, Lees, Pengs, & Chang, 2012; Bordi et al., 2010), sugiriendo un papel principal de RsmY en la regulación post-transcripcional de *algD* (Miguel Castañeda et al., 2016).

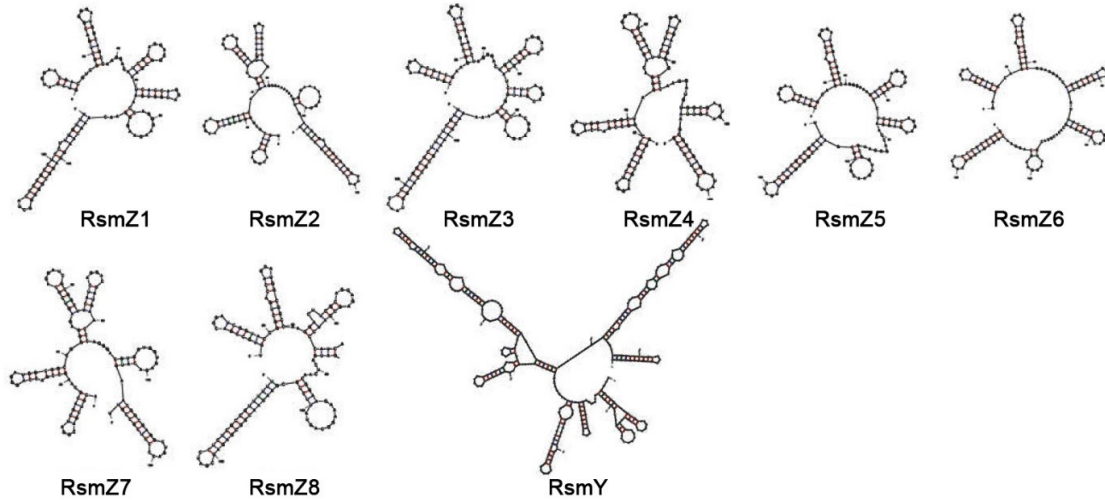


Fig. 8.- Estructuras de tallo y asa de los pequeños RNA de la familia RSM de *A. vinelandii*, tomado de Castañeda, 2016.

#### 1.2.4. Vía alternativa de regulación de *rsmY* en *P. aeruginosa*

GacS/GacA no es el único sistema de doble componente que regula a *algD* a través del control de *RsmY* (Fig. 8), se ha propuesto que en *P. aeruginosa* existen tres histidín cinasas híbridas que usan como segundo dominio transmisor a una histidín fosfotransferasa soluble HptB, quien a su vez fosforila a un regulador de respuesta con actividad fosfodiesterasa. Este regulador de respuesta escinde el grupo fosfato de un anti-anti-sigma, quien gana afinidad por un anti-sigma quien a su vez se encuentra inhibiendo a un factor sigma, cuando anti-anti-sigma y anti-sigma se unen, permiten que el factor sigma inicie la transcripción del pequeño RNA regulador *RsmY*, el cual regula post-transcripcionalmente a *algD*, Fig. 9, (Bordi et al., 2010).

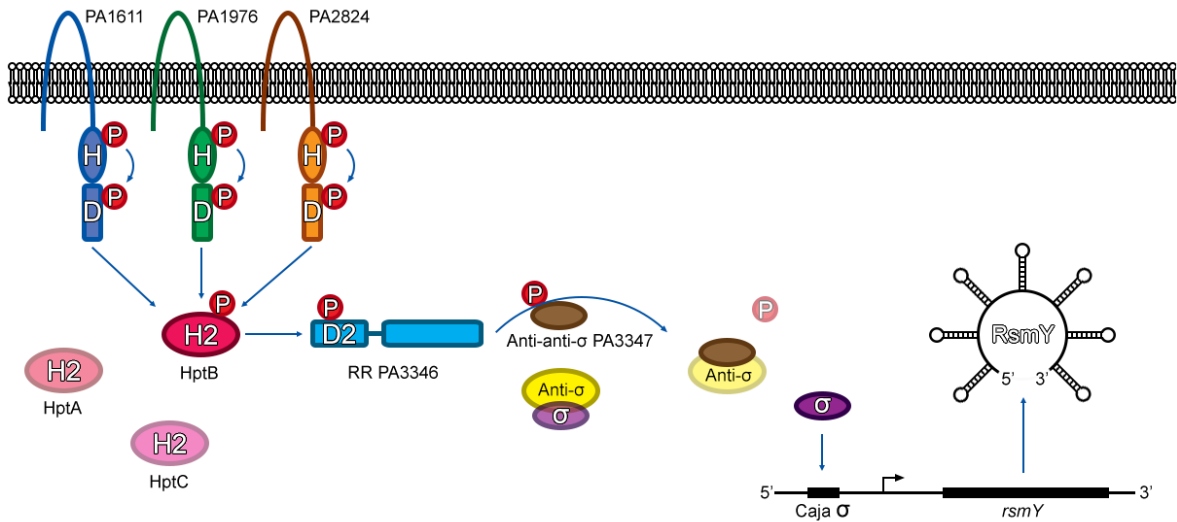


Fig. 9.- Esquema de la vía de regulación de *RsmY* alterna a *GacS/GacA* en *P. aeruginosa*, creado a partir de Bordi 2010 (32).

### 1.2.5. Vía alternativa de regulación de *rsmY* en *A. vinelandii*

Mediante estudios de genética comparativa se han hallado homólogos en *A. vinelandii* a algunos de los genes implicados en la vía HptB de *P. aeruginosa*: PA2824 (una proteína cinasa), HptB (una proteína con dominio Hpt soluble), PA3346 (un regulador de respuesta) y PA3347 (un anti-anti-sigma) que se encuentran en el mismo locus (Fig. 10), sugiriendo fuertemente que esta vía putativa podría estar activa en *A. vinelandii*, regulando la transcripción del pequeño RNA regulador RsmY.

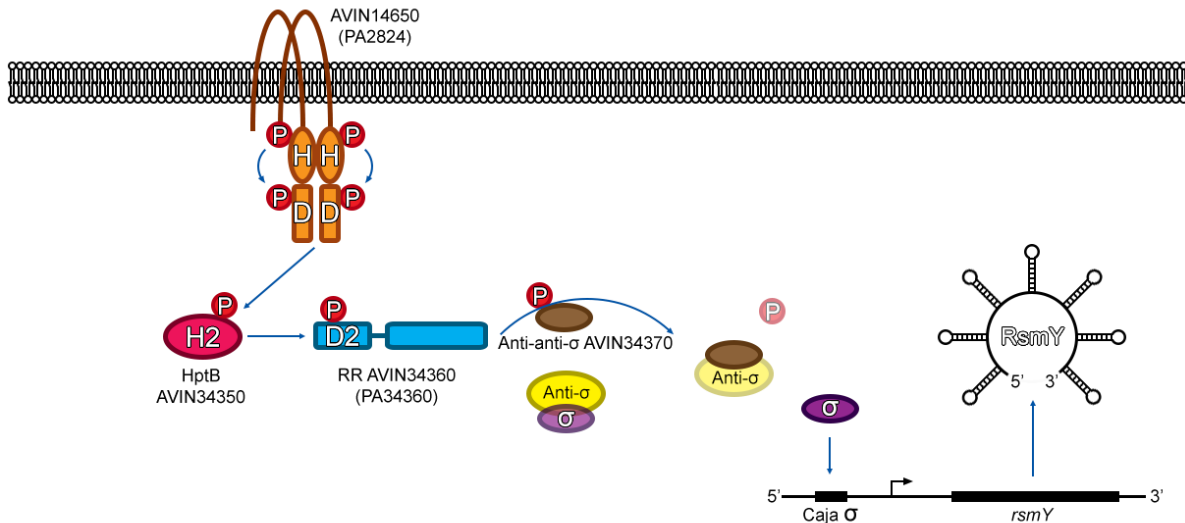


Fig. 10.- Esquema de las proteínas en *A. vinelandii* (AVIN) con sus homólogos en *P. aeruginosa* (PA); que podrían pertenecer a esta vía (comunicación personal, Castañeda 2018).

### 1.2.6. HptB y su contexto genómico

Las proteínas con un dominio Hpt son responsables de transferir un grupo fosforilo de un residuo de aspartato en un dominio "receptor" intermedio, típicamente parte de una histidina cinasa híbrida, a un aspartato en un regulador de respuesta final (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019).

En *P. aeruginosa* existen tres genes que codifican para proteínas con dominios Hpt, llamadas HptA, HptB y HptC, (Jye Lin Hsu, Chen, Peng, & Chang, 2008) mientras que en *A. vinelandii* sólo existe un homólogo a estas, HptB (por su nivel de homología).

HptB es una proteína de 115 aminoácidos muy conservada con un dominio Hpt central y un residuo altamente conservado de histidina, el contexto genómico de HptB es el siguiente: se encuentra en la cadena complementaria en el lugar 4 de un operón putativo compuesto por 7 genes, río arriba de HptB se encuentran el regulador de respuesta, el anti- anti- sigma y una región intergénica de 299 pb, ver Fig. 11.

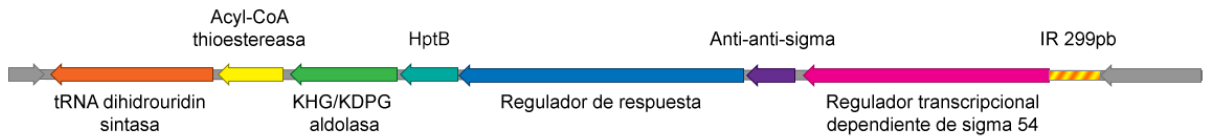


Fig. 11.- Esquema del operón putativo donde se encuentra *hptB*. IR.- Región Intergénica, pb.- pares de bases.

En *P. aeruginosa*, se sabe que HptB regula negativamente a uno de los sRNA's de la familia RSM, en específico, a RsmY (Bordi et al., 2010) mientras que existe confusión con respecto a RsmZ (Jean-Pierre, Tremblay, & Déziel, 2017); también se sabe que puede ser fosforilado por múltiples HK's: PA1611, PA1976, PA2824, y RetS (Jye L. Hsu, Chen, Peng, & Chang, 2008) y su regulador de respuesta putativo (PA3346) está relacionado con la regulación del cambio de movilidad entre twitching, swarming y swimming de una forma dependiente de los niveles de di-GMPc (Bhuwan et al., 2012; Valentini, Laventie, Moscoso, Jenal, & Filloux, 2016; Xu et al., 2016).

### 1.2.7. Panorama de la transmisión de la señal a HptB

Siguiendo el esquema de la transmisión de la señal en los sistemas de doble componente (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019), es altamente probable que la histidín cinasa GacS2, homóloga a PA2824 (SagS) en *P. aeruginosa* (Bordi et al., 2010), pueda ser la encargada de transmitir la señal a HptB.

En *A. vinelandii*, existen otras dos histidín cinasas HrgS y RetS, que carecen de un dominio transmisor final (H2) que pueda fosforilar al regulador de respuesta (Fig. 12) (Cruz, 2012), de tal manera que estas podrían usar a HptB como el dominio transmisor soluble en su proceso de señalización.

Otro factor que suma a esta hipótesis es que ambas HK's han demostrado tener un papel relevante en la regulación de los sRNA's de la familia Rsm en *P. aeruginosa* (Bordi et al., 2010; Chambonnier et al., 2016), además, se ha demostrado en ensayos de fosforilación que tanto RetS como PA2824 (homóloga a GacS2 en *A.*

*vinelandii*) tienen la capacidad de fosforilar a HptB (Jye L. Hsu et al., 2008) por lo que determinar si estas HK's tienen la capacidad de interactuar con HptB en *A. vinelandii* sería de gran relevancia para elucidar esta vía de señalización.

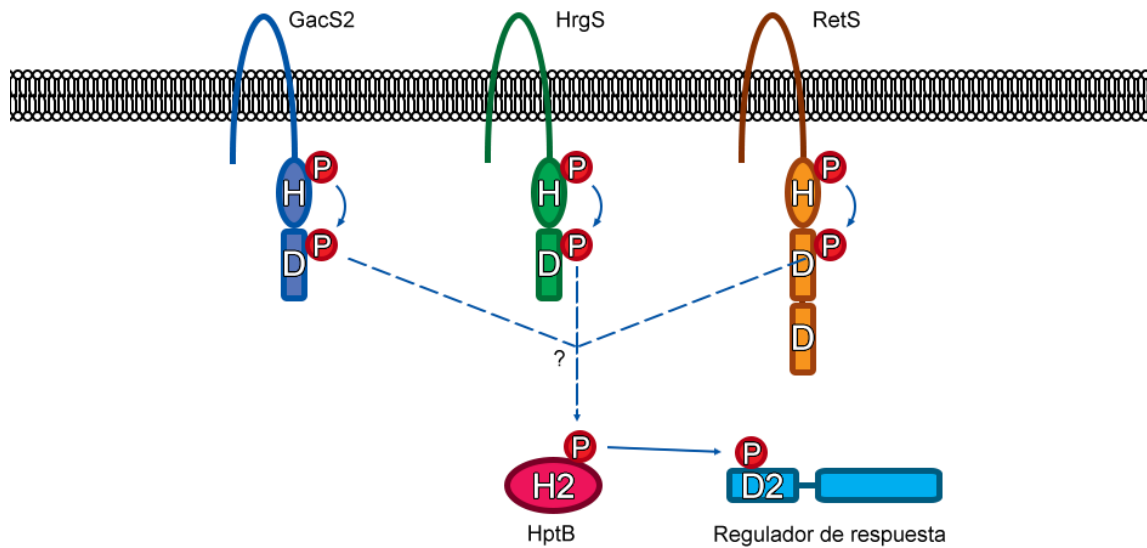


Fig. 12.- Histidín cinasas relacionadas con la biosíntesis de alginato que no poseen dominio transmisor final.

## 2. Justificación

Este trabajo generará conocimiento para elucidar una de las vías que regulan al sistema Rsm y permitirá comprender con más precisión la vía de biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* (AEIV).

## 3. Planteamiento del problema

Actualmente la demanda de alginato con propiedades definidas y reproducibles ha aumentado en la ciencia biomédica y la ingeniería debido a que el alginato es un material biocompatible, de baja toxicidad y relativamente barato (Lee & Mooney, 2012).

El alginato obtenido de plantas es poco reproducible, además de que requiere de procesos adicionales para obtener el material con las conformaciones deseadas (Rehm, 2010).

Debido a que existen más de 20 genes relacionados con la producción de alginato en *A. vinelandii* (Urtuvia et al., 2017), éste es un gran modelo de estudio, ya que permitiría la modulación en la producción del biopolímero.

Actualmente no se cuenta con una vía completa de regulación de la producción de alginato en *A. vinelandii*.

## 4. Hipótesis científica

HptB funge como intermediario de una cascada de señalización alternativa a GacS que modula la producción de alginato mediante la regulación post-transcripcional que ejercen los sRNA's del sistema Rsm en *A. vinelandii* (AEIV)

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general

Estudiar el gen *hptB* de *A. vinelandii* (AEIV) y su posible relación con el sistema Rsm en la producción de alginato.

### 5.2. Objetivos particulares

Obtener una mutante *hptB*, su derivada complementada y una cepa donde se sobre-exprese *hptB*.

Establecer el efecto fenotípico de la mutación de HptB sobre la producción de alginato

Determinar el efecto de la mutación de *hptB* en la transcripción de los genes *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY*.

Determinar la interacción entre HptB y las cinasas histidínicas cinasas RetS, LadS y GacS2.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Vectores

ID	Tamaño (pb)	Características	Marcadores de resistencia	Referencia
pFLPe4	7072	Vector de expresión de la proteína FLP mejorada, fusionada con el promotor inducible de <i>rhaB</i> .	<i>neo</i> (KAN <sup>R</sup> )	(Choi et al., 2008)
pFZEGm	4352	Vector de utilidad que contiene un cassette de resistencia a gentamicina flanqueado por sitios FRT (sitio diana de la recombinasa FLP), los cuales a su vez son flanqueados por polilinkers. Derivado de pFZE1 (Choi et al., 2008).	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> ), <i>aacC1</i> (GEN <sup>R</sup> )	(Rosales Cruz, 2018)
pGEMHptB TH-	3377	Vector de mantenimiento derivado de pGEM-T easy que porta el gen <i>hptB</i> obtenido a partir de PCR con los oligonucleótidos hptBTHFw y hptBTHRv.	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	Este trabajo.
pGEM-T easy	3016	Vector de clonación de productos de PCR, cribado blanco/azul por <i>lacZ</i> interrumpido.	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	Promega.
pJET1.2 / blunt	2974	Vector de clonación linealizado con EcoRV (extremos romos), <i>eco471R</i> (selección positiva del plásmido recombinante).	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	Thermo Fisher.
pJET1.2- <i>hptB</i>	4296	Vector derivado de pJET1.2 / blunt con un inserto del gen <i>hptB</i> obtenido de <i>Azotobacter vinelandii</i> AEIV mediante PCR con DNA polimerasa Pfu (alta fidelidad, extremos romos).	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	Este trabajo.
pJET- <i>hptB</i> ::FRT	6010	Vector mutagénico derivado de pJET1.2- <i>hptB</i> , con una inserción en el gen <i>hptB</i> en su sitio <i>SmaI</i> obtenida a partir de pFZE1 digerido con <i>HindIII</i> .	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> ), <i>aacC1</i> (GEN <sup>R</sup> )	Este trabajo.
pRK2013	N/D	Contiene los genes de transferencia RK2. Plásmido ayudante para la movilización de plásmidos no auto transmisibles.	Km <sup>R</sup>	(Boyer & Roulland-dussoix, 1969)
pSR658	≈4150	Vector de expresión de la proteína LexA <sub>DBDwt</sub> para ensayos de hetero dimerización, derivado de pMS604 (Dmitrova et al., 1998).	<i>tetK</i> (TET <sup>R</sup> )	(Daines, Granger-Schnarr, Dimitrova, & Silver, 2002)
pSR658-H	≈4150 + 360	Vector derivado de pSR658 que porta la fusión del gen <i>hptB</i> en marco de lectura con LexA <sub>DBDwt</sub> , insertado en los sitios <i>SacI</i> y <i>KpnI</i> .	<i>tetK</i> (TET <sup>R</sup> )	Este trabajo.
pSR659	≈2800	Vector de expresión de la proteína LexA <sub>DBDmut</sub> para ensayos de hetero dimerización, derivado de pDP804 (Dmitrova et al., 1998).	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	(Daines et al., 2002)
pSR659-G	≈2800 + 1789	Vector derivado de pSR659 que porta la fusión de la región citoplasmática de la proteína GacS2 en marco de lectura con LexA <sub>DBDmut</sub> , insertado en los sitios <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> .	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	Acocal, datos no publicados.
pSR659-L	≈2800 +	Vector derivado de pSR659 que porta la fusión de la región citoplasmática de la proteína LadS en marco de lectura con LexA <sub>DBDmut</sub> .	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	(Sánchez Cuapio, 2012)
pSR659-R	≈2800 +	Vector derivado de pSR659 que porta la fusión de la región citoplasmática de la proteína RetS en marco de lectura con LexA <sub>DBDmut</sub> .	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> )	(Sánchez Cuapio, 2012)
pUHptBTH +	7491	Vector de complementación en cis derivado de pUMAtac KM con <i>hptB</i> tomado de pGEMHptBTH- bajo control del promotor <i>ptac</i> , insertado en el sitio <i>EcoRI</i> .	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> ), <i>neo</i> (KAN <sup>R</sup> )	Este trabajo.

pUMAtac Km	7131	Vector transformante en cis por intercambio alélico en <i>melA</i> , con un sitio de multiclonación bajo control del promotor inducible <i>ptac</i> .	<i>bla</i> (AMP <sup>R</sup> ), <i>neo</i> (KAN <sup>R</sup> )	(López-Pliego et al., 2018)
pUMA <i>rsmZ1-gusA</i>	N/D	Vector transformante en cis por intercambio alélico en <i>melA</i> , que contiene la región codificante de <i>rsmZ1</i> fusionada al gen reportero <i>gusA</i> .	<i>tetK</i> (TET <sup>R</sup> )	(López-Pliego et al., 2018)
pUMA <i>rsmZ2-gusA</i>	N/D	Vector transformante en cis por intercambio alélico en <i>melA</i> , que contiene la región codificante de <i>rsmZ2</i> fusionada al gen reportero <i>gusA</i> .	<i>tetK</i> (TET <sup>R</sup> )	(López-Pliego et al., 2018)
pUMA <i>rsmY-gusA</i>	N/D	Vector transformante en cis por intercambio alélico en <i>melA</i> , que contiene la región codificante de <i>rsmY</i> fusionada al gen reportero <i>gusA</i> .	<i>tetK</i> (TET <sup>R</sup> )	(López-Pliego et al., 2018)

Tabla 1.- Lista de vectores utilizados.

Las secuencias se encuentran disponibles en el siguiente enlace:

[https://drive.google.com/drive/folders/1wVSfqBdxzlh\\_eapilHC1NX3JrIL0wz3K?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1wVSfqBdxzlh_eapilHC1NX3JrIL0wz3K?usp=sharing)

## 6.2. Material biológico

Especie	Cepa	Características	Fuente	Condiciones de crecimiento
<i>Azotobacter vinelandii</i>	AEIV	Cepa silvestre	(Larsen & Haug, 1971)	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml
	AEIV <i>rsmY-gusA</i>	Derivada de la cepa AEIV que porta la fusión transcripcional <i>rsmY-gusA</i>	(López-Pliego et al., 2018)	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, TET 40 µg/ml
	AEIV <i>rsmZ1-gusA</i>	Derivada de la cepa AEIV que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	(López-Pliego et al., 2018)	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, TET 40 µg/ml
	AEIV <i>rsmZ2-gusA</i>	Derivada de la cepa AEIV que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	(López-Pliego et al., 2018)	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, TET 40 µg/ml
	<i>hptB</i> <sup>-</sup>	Cepa derivada de AEIV, mutante por inserción en <i>hptB</i> , <i>hptB</i> ::FRT	Este trabajo	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml
	<i>hptB</i> <sup>Y</sup>	Derivada de la cepa <i>HptB</i> <sup>-</sup> que porta la fusión transcripcional <i>rsmY-gusA</i>	Este trabajo	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, TET 40 µg/ml
	<i>hptB</i> <sup>Z1</sup>	Derivada de la cepa <i>HptB</i> <sup>-</sup> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	Este trabajo	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, TET 40 µg/ml
	<i>hptB</i> <sup>Z2</sup>	Derivada de la cepa <i>HptB</i> <sup>-</sup> que porta la fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	Este trabajo	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, TET 40 µg/ml
	<i>hptB</i> <sup>+</sup>	Cepa sobre expresada derivada de AEIV, <i>melA</i> :: <i>hptB</i> .	Este trabajo	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, KAN 4 µg/ml
<i>hptB</i> <sup>c</sup>	Cepa complementada derivada de <i>HptB</i> <sup>-</sup> , <i>hptB</i> ::FRT, <i>melA</i> :: <i>hptB</i>	Este trabajo	Medio Burk-Sacarosa (BS) @30°C NAL 10 µg/ml, KAN 4 µg/ml	

<i>Escherichia coli</i>	dH5α	F <sup>-</sup> , $\delta 80dlacZ\Delta M15$ , $\Delta(lacZYA-argF)U169$ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Woodcock et al., 1989)	Medio Luria Bertani (LB) @37°C
	dH5α-pFZEGm	Derivado de dH5α, porta el vector pFZEGm	(Rosales Cruz, 2018)	Medio Luria Bertani (LB) @37°C GEN 3μg/ml
	DH5α-hptB	Derivado de dH5α, porta el vector pJET1.2-hptB.	Este trabajo	Medio Luria Bertani (LB) @37°C AMP 100μg/ml
	dH5α-hptB::FRT	Derivado de dH5α, porta el vector pJET-hptB::FRT	Este trabajo	Medio Luria Bertani (LB) @37°C GEN 3μg/ml
	dH5α - H	Derivado de la cepa dH5α, porta el plásmido pSR658-H	Este trabajo	Medio Luria Bertani (LB) @37°C AMP 100μg/ml
	HB101 pRK2013	Derivada de la cepa KB12 <i>supE44</i> , $\Delta(mcrC-mrr)$ , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , porta el plásmido pRK2013.	(Boyer & Roulland-dussoix, 1969)	Medio Luria Bertani (LB) @37°C KAN 4μg/mL
	su202	Derivado de la cepa JL1434. <i>lexA71::Tn5</i> , (Def) <i>sulA211</i> , $\Delta(lacIPOZYA)169/F'lacI^q/lacZ\Delta M15::Tn9$ ; <i>op408/op+::lacZ</i>	(Dmitrova et al., 1998)	Medio Luria Bertani (LB) @37°C CHL 20μg/mL, KAN 4μg/mL
	su202-G	Derivado de la cepa su202, porta el plásmido pSR659-G	Acocal, datos no publicados	Medio Luria Bertani (LB) @37°C TET 40μg/ml
	su202-GH	Derivada de la cepa su202-G que porta el plásmido pSR658-H	Este trabajo	Medio Luria Bertani (LB) @37°C TET 40μg/ml, AMP 100μg/ml
	su202-L	Derivada de la cepa su202 que porta el plásmido pSR659-L	(Sánchez Cuapio, 2012)	Medio Luria Bertani (LB) @37°C TET 40μg/ml
	su202-LH	Derivada de la cepa su202-L que porta el plásmido pSR658-H	Este trabajo	Medio Luria Bertani (LB) @37°C TET 40μg/ml, AMP 100μg/ml
	su202-R	Derivada de la cepa su202 que porta el plásmido pSR659-R	(Sánchez Cuapio, 2012)	Medio Luria Bertani (LB) @37°C TET 40μg/ml
	su202-RH	Derivada de la cepa su202-R que porta el plásmido pSR658-H	Este trabajo	Medio Luria Bertani (LB) @37°C TET 40μg/ml, AMP 100μg/ml

Tabla 2.- Lista de material biológico utilizado.

### 6.3. Oligonucleótidos

ID	Secuencia 5' a 3'	Notas	Tamaño (pb)	% GC	PM (Da)	Tm (°C)	Fuente
hptBFw	GGATCCGCTTCAATCCGCTGCCCTATC	N/A	27-mer	59%	8147.3	66.0	Este trabajo
hptBRv	GGTACCCTGAACGGCTCCTTGAACCT	N/A	26-mer	54%	7931.2	64.0	Este trabajo
hptBTHFw	<u>GAGCTCGTGTCCGAACATCTCGAT</u>	Inserta un sitio SacI en 5'	24-mer	54%	7328.8	54, 63	Este trabajo
hptBTHRv	<u>GGTACCCTCACGGATGACGCTGTCG</u>	Inserta un sitio KpnI en 3'	24-mer	63%	7369.8	58, 65	Este trabajo

pRhaRv	AAC TCGAGCTCGATCATATGCATT	N/A	24-mer	42%	7311.8	55.0	(Rosales Cruz, 2018)
pRhaFw	GGATCCTGTATATCTCCTTGCTGAA	N/A	25-mer	44%	7623.0	48.0	
G2ExFw	<u>GGATCC</u> CGGATGCTGACCCGGCC	Inserta un sitio BamHI en 5'	23-mer	74%	7026.6	68	Este trabajo
G2ExRv	<u>AAGCTT</u> TGTGGCATTGCCCCGCC	Inserta un sitio HindIII en 3'	25-mer	64%	7569.9	70	Este trabajo
ptac	ACAATTAATCATCGGCTCGTAT	N/A	22-mer	36%	6693.4	54	(López-Pliego et al., 2018)
gusA1	TGTAACGCGCTTTCCACCAC	N/A	21-mer	57%	6302.1	60.5	
Tc Rv	GCTAGCAGCACGCCATAGTGA	N/A	21-mer	57%	6440.2	59.7	

Tabla 3.- Lista de oligonucleótidos utilizados.

## 6.4. Medios de cultivo

Nombre	Reactivo	Cantidad (g/L)
Luria-Bertani (LB) pH 7.2 ± 0.2	NaCl	5.000
	Extracto de levadura	5.000
	Peptona de caseína	10.000
	Agar bacteriológico*	15.000
MacConkey Agar (MCA) pH 7.1± 0.2	Digerido pancreático de gelatina	17.000
	Digerido pancreático de caseína	1.500
	Digerido péptico de tejido animal	1.500
	Lactosa	10.000
	Sales biliares	1.500
	NaCl	5.000
	Rojo neutro	0.030
	Cristal violeta	0.001
	Agar bacteriológico*	13.500
Burk-Sacarosa (BS) pH 7.1 - 7.2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.000
	Sacarosa	200.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7.300
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.300
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	16.000
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.000
	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.200
	Agar bacteriológico*	15.000
Burk-Sacarosa para competencia (BSC) pH 7.1 - 7.2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.000
	Sacarosa	200.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7.300
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.300
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	16.000
	Agar bacteriológico*	15.000

Tabla 4.- Lista de medio de cultivo utilizados, \* aplica cuando se prepare medio sólido.

## 6.5. Técnicas y procedimientos

### 6.5.1. Extracción de ADN plasmídico

#### 6.5.1.1. Extracción por perclorato

Reactivos:

- Solución TES (Tris-EDTA-Sacarosa): Sacarosa 15%, Tris 50 mM a pH 8.5, EDTA 50 mM a pH 8.0
- Lisozima 10 mg/ml
- NaClO<sub>4</sub> 5 M
- RNAsa 10 mg/ml

Protocolo:

- Centrifugar 3 ml de cultivo (con todo y palillo)
- Lavar con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM (pasar a tubo eppendorf)
- Resuspender en 175 µl de solución TES
- Agregar 25 µl de lisozima (10 mg/ml)
- Enfriar agua y Calentar termoblock a 73°C
- Mantener 20 min en hielo
- Agregar 400 µl de agua helada
- Incubar 15 min a 73°C
- Centrifugar 15 min a 12000 rpm
- Transferir sobrenadante en un tubo nuevo
- Agregar 60 µl de NaClO<sub>4</sub> 5 M
- Agregar 600 µl de isopropanol, Mezclar
- Precipitar en hielo 10 min
- Centrifugar 15 min a 12000 rpm
- Lavar pellet (2 veces) con 500µl de etanol al 70% (centrifugar por 2 min).
- Secar a 47°C y resuspender en 30 µl de RNAsa diluida.
- Incubar 1 hora a 37°C

#### 6.5.1.2. Extracción por maxiprep:

Reactivos:

- Solución I: Glucosa 10 mM, EDTA 2 mM, TrisCl 5 mM, todo a pH 8.0
- Solución II: NaOH 2 N, SDS 10%
- Solución III: Acetato de Na o K (5 M), Ac. Acético Glacial, todo a pH 4.8

- RNAsa 20 mg/ml

Protocolo:

- Cultivar en 50 ml de LB de 8-12 hrs con antibiótico correspondiente a 37°C, en agitación.
- Transferir las células a dos tubos Falcon de 50 ml (25 ml c/u) y centrifugar por 5 min a 6000 rpm.
- Lavar la pastilla en 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

Preparar la solución II:

H <sub>2</sub> O	800 ul	Por cada 1 ml
NaOH 2 N	100 ul	
SDS 10%	100 ul	

- Resuspender la pastilla en 1.5 ml de solución de lisis alcalina I
- Agregar 3.5 ml de solución II e invertir el tubo lentamente 2-3 veces
- Agregar 2.5 ml de solución III agitar fuertemente con la mano y dejar reposar por 15 minutos en hielo
- Centrifugar por 10 min a 6000 rpm y transferir la fase líquida a tubos Falcon de 15 ml
- Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol por 15 min en hielo
- Centrifugar por 10 min a 6000 rpm y decantar sobrenadante
- Lavar la pastilla 3 veces con 2 ml de etanol al 70% (centrifugados de 2 min a 6000 rpm)
- Secar la pastilla a temperatura ambiente o a 50°C
- Resuspender en 200 µl de RNAsa diluída e incubar durante la noche a 37°C.

### 6.5.2. Extracción de ADN total (*A. vinelandii*)

Reactivos:

- Solución TE 50/20: EDTA 50 mM, TrisCl 20 mM, todo a pH 8.0
- Lisozima 10 mg/ml
- Proteasa 10 mg/ml
- SDS 10%: Duodecil sulfato de sodio 10%
- NaCl 5 M
- CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio 10%, NaCl 0.7 M
- Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1

- New Wash: 50% New wash stock diluido 10:1, 50% etanol absoluto
- RNAsa 20 mg/ml

#### Protocolo:

- Crecer a *A. vinelandii* en 100 ml de BS adicionado con 20 ml de PY durante 2 días a 30°C en agitación
- Lavar células con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta quedar sin alginato
- Resuspender en 450 µl de buffer TE 50/20 y vortexear
- Agregar 50 µl de lisozima (10 mg/ml) incubar por 30 min a 37°C
- Agregar 30 µl de proteasa (10 mg/ml) incubar por 30 min a 37°C
- Agregar 50 µl de SDS 10% e incubar por 15 min a 37°C (o más tiempo hasta que se observe una solución turbia y viscosa)
- Agregar 100 µl de NaCl 5 M, mezclar e incubar por 10 min a 65°C
- Adicionar 80 µl de solución CTAB 10% NaCl 0.7M (calentada a 65°C) e incubar de 15 a 20 minutos a 65°C
- Extraer una vez con un volumen de solución cloroformo-álcool isoamílico 24:1, vortexear y centrifugar por 5 minutos
- Recuperar la fase superior
- [Continuar con protocolo con sílica o protocolo con fenol-cloroformo]

#### Protocolo con sílica:

- Agregar 10 µl de sílica y dejar reposar por 5 minutos
- Centrifugar por un minuto y decantar el sobrenadante
- Lavar 3 veces con 500 µl de New Wash (centrifugaciones de 1 min)
- Secar la pastilla a 37°C o 50°C
- Resuspender en 30 µl de RNAsa diluida e incubar por una hora a 37°C

#### Protocolo con fenol-cloroformo

- Agregar un volumen de solución fenol-cloroformo-álcool isoamílico
- Vortexear y centrifugar por 5 min
- Recuperar el sobrenadante
- Extraer una vez con un volumen de cloroformo-álcool isoamílico
- Vortexear y centrifugar por 5 min
- Recuperar sobrenadante
- Añadir 600 µl de isopropanol
- Centrifugar 10 min y decantar el sobrenadante (con cuidado de no tirar la pastilla)
- Lavar 3 veces con etanol al 70%
- Secar la pastilla por 15 minutos a 37°C
- Resuspender en 30 µl de RNAsa diluida e incubar por 1 hora a 37°C

### 6.5.3. Electroforesis

Reactivos:

- Amortiguador Tris-acetatos- EDTA (TAE1X): Tris pH 8, 90 mM; ácido acético 90 mM; EDTA 2 mM.
- Marcador de peso molecular
- Agarosa al 1%.

Protocolo:

- Cargar en el primer pozo de un gel de agarosa el marcador de peso molecular de concentración conocida, seguido de las muestras de DNA en los pozos que siguen.
- Teñir el gel en solución TAE 100ml / EtBr 5ul por 2 min.
- Visualizar en un transiluminador de luz UV.

### 6.5.4. PCR

Reactivos:

- Agua tridestilada
- Oligonucleótidos 25  $\mu$ M (c/u)
- dNTP's 10 mM
- Buffer enzima taq 10X
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- Polimerasa taq 5 U/ $\mu$ l
- ADN molde ~200 ng/ $\mu$ l

Protocolo:

- Hacer un mix de cada muestra con todos los reactivos en un volumen final de 10  $\mu$ l y una concentración de 1:10.
- Programar el equipo según las especificaciones de la reacción, así como la temperatura de alineación de los oligonucleótidos.
- Analizar las muestras mediante electroforesis.

### 6.5.5. Purificación de ADN

#### 6.5.5.1. Precipitación con glucógeno

- Agregar 500  $\mu$ l de Isopropanol al DNA.

- Agregar 1  $\mu\text{l}$  de glucógeno.
- Incubar 15 min a  $-70^{\circ}\text{C}$
- Centrifugar 10 m a 13,300 rpm
- Decantar sobrenadante (cuidando de no desechar pellet)
- Lavar pellet con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% [x3]
- Secar la pastilla a  $37^{\circ}\text{C}$
- Resuspender la pastilla en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  min

#### 6.5.5.2. Extracción a partir de banda de agarosa

- Correr un volumen apropiado por electroforesis y teñirlo con BET
- Visualizar el gel en transiluminador a baja potencia y marcar la zona a cortar (hacerlo con rapidez)
- Apagar el transiluminador y cortar la banda previamente marcada, ponerla en un Eppendorf
- Pesar la banda y agregar 3 volúmenes (con respecto al peso) de  $\text{NaI}$  6 M
- Incubar a  $50^{\circ}\text{C}$  por 5 min (hasta que la banda se disuelva por completo)
- Agregar 10  $\mu\text{l}$  de sílica y esperar por 5 min a temperatura ambiente
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Lavar 3 veces con 500  $\mu\text{l}$  de New Wash (resuspender suavemente)
- Quitar exceso de solución y secar pastilla
- Resuspender en volumen adecuado

#### 6.5.6. Restricción

Reactivos:

- Enzima de restricción 5 U/ $\mu\text{l}$
- Buffer específico 10X
- Agua tridestilada
- ADN  $\sim 200$  ng/ $\mu\text{l}$

Protocolo:

- Mezclar 30  $\mu\text{l}$  de ADN, 5  $\mu\text{l}$  de buffer, 0.25  $\mu\text{l}$  de enzima de restricción y aforar hasta un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  con agua tridestilada.
- Incubar la mezcla por la cantidad de tiempo temperatura óptima de reacción de la enzima usada.
- Detener la reacción inactivando la enzima por 20 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ .
- Analizar la reacción mediante electroforesis.

### 6.5.7. Ligación

Reactivos:

- Enzima de ADN ligasa 5 U/ $\mu$ l
- Buffer específico 10X
- Agua tridestilada
- ADN ~200 ng/ $\mu$ l (Fragmentos cohesivos y fosforilados)

Protocolo:

- Mezclar 15  $\mu$ l de ADN1, 15  $\mu$ l de ADN2, 5  $\mu$ l de buffer, 0.25 $\mu$ l de enzima ligasa y aforar hasta un volumen final de 40  $\mu$ l con agua tridestilada.
- Incubar la mezcla por 30 minutos a 22°C.
- Usar ADN para transformar.

### 6.5.8. Transformación por de *E. coli* químico-competente

- Preparar baño a 42 °C
- Descongelar células *E. coli* DH5- $\alpha$
- Agregar DNA para transformar
- Incubar por 30 min en hielo
- Incubar 2 min en baño a 42°C
- Agregar 1 ml de LB (medio de recuperación)
- Incubar 1 hora a 37°C en agitación
- Sembrar en medio de selección (200  $\mu$ l y 400  $\mu$ l con perlas)

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

Preparación de células competentes

- A partir de una placa fresca de medio BS sólido subcultivar la cepa de *A. vinelandii* en medio CM incubando por 48 horas a 30°C.
- A partir de este cultivo sembrar una placa de CM en toda su superficie con la ayuda de un asa. Incubar a 24 horas a 30°C.
- Recolectar todas las células en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM con la ayuda de un asa grande.
- Lavar las células por dos veces con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- Resuspender las células en 160  $\mu$ l de medio CM y 840  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- Proceder a transformar.

## Transformación

- Se toman 200  $\mu$ l de células competentes de *A. vinelandii* y se le agregan de 10 a 50  $\mu$ l de plásmido, dependiendo de la concentración del mismo, y se mezcla despacio.
- Se depositan los 200  $\mu$ l de células en el centro de una placa pequeña de CM con una pipeta, cuidando que el líquido no se derrame por toda la superficie.
- Se deja secar en esterilidad y se incuba por 48 horas a 30°C.
- Se recogen las células con un asa grande y se depositan en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, se lavan dos veces con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- Se siembran 200  $\mu$ l en placas de selección, de medio BS con los antibióticos correspondientes.

### 6.5.10. Conjugación triparental.

#### Cepas:

- Cepa ayudante – *E. coli* HB101 pRK2013
- Cepa donadora – *E. coli* DH5 $\alpha$  pFLPe4
- Cepa receptora – *A. vinelandii* hptB:FRT

#### Materiales:

- Medio LB líquido y sólido
- Medio BS líquido y sólido
- Antibióticos de selección.
- MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

#### Protocolo:

- Día 1.- inocular cepa receptora en BS líquido con gentamicina e incubar en condiciones adecuadas.
- Día 2.- inocular cepas ayudante y donadora en medio LB líquido con kanamicina e incubar en condiciones adecuadas (ver nota).
- Día 3.-
  - Lavar las cepas con MgSO<sub>4</sub> 10 mM, repetir al menos dos veces para eliminar antibióticos; Resuspender en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

- Medir densidad óptica y combinar las cepas suavemente con la pipeta en un relación 2:1:1, receptora:donadora:ayudante.
- Inocular 100µl de la combinación en medio BS-LB sólido sin antibióticos. No dispersar las células.
- Incubar la placa de la conjugación por 24hrs @ 30°C.
- Día 4.-
  - Recoger los puntos de conjugación con un asa suavemente y lavar dos veces con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
  - Resuspender cada muestra en 1ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
  - Preparar diluciones 1:10 de cada muestra.
  - Inocular por dispersión 200 µl de cada muestra sin diluir y de su dilución 1:10 en placas de medio BS sólido adicionado con kanamicina.
- Día 5 a 6.-
  - Verificar el crecimiento de colonias, aislarlas y verificar por PCR la presencia del plásmido.
- Nota, ya que el plásmido pFLPe4 es termosensible, la cepa donadora se debe manejar en todo momento a  $\leq 30^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.5.11. Cuantificación de proteína por método de Lowry

##### Reactivos

- Solución reactiva: 1 ml de solución B + 1ml de solución C + 98 ml de solución A
- Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1N
- Solución B: Tartrato de Na y K 2%
- Solución C: CuSO<sub>4</sub> 1%
- Folin 1:2

##### Protocolo:

- Obtener un pre-inóculo de 18-24 h de *A. vinelandii*.
- Inocular 50 ml de BS con 1 ml de pre-inóculo, incubar a 30°C por 48 h.
- Centrifugar 25 ml de cultivo de 48 horas hasta obtener paquete celular.

[Guardar en refrigeración los 25 ml restantes para cuantificar actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el mismo día, método 6.5.12]

- Lavar las células con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y resuspender en 1 ml.
- Tomar 10  $\mu\text{l}$  y llevarlo a un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  con  $\text{MgSO}_4$ .
- Agregar 1 ml de la solución reactiva, mezclar y dejar reposar 10 minutos.
- Agregar 100  $\mu\text{l}$  de folin diluido 1:1 y dejar reposar 30 minutos.
- Medir absorbancia a 625 nm y registrar los resultados.
- Correr al mismo tiempo una curva de calibración con un estándar de albúmina sérica bovina (2  $\mu\text{g}/\text{ul}$ ), usando muestras obtenidas a partir de las siguientes concentraciones:

Volumen de estándar albúmina sérica bovina (2 $\mu\text{g}/\text{ul}$ )	Volumen de $\text{H}_2\text{O}$	Concentración conocida final
2 ul	198 ul	0.02 $\mu\text{g}/\text{ul}$
4 ul	196 ul	0.04 $\mu\text{g}/\text{ul}$
8 ul	192 ul	0.08 $\mu\text{g}/\text{ul}$
16 ul	184 ul	0.16 $\mu\text{g}/\text{ul}$
32 ul	168 ul	0.32 $\mu\text{g}/\text{ul}$

- Usar la fórmula de la recta obtenida en la curva de calibración para determinar la concentración de proteína en cada muestra en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

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

Reactivos:

- Buffer Z
- Lisozima 10 mg/ml
- Tritón al 10%
- 4-Nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (PNPG)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Protocolo:

[Usar los 25 ml restantes de la cuantificación de proteína por método de Lowry, método 6.5.11]

- Centrifugar 25 ml de cultivo de 18-24 horas hasta obtener paquete celular.
- Lavar las células con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y resuspender en 1 ml.
- Tomar 20  $\mu\text{l}$  [V Rx] y ponerlo en un tubo nuevo de 1.5 ml con 710  $\mu\text{l}$  de buffer Z.
- Agregar 10  $\mu\text{l}$  de lisozima e incubar 5 minutos a 37°C.
- Agregar 10  $\mu\text{l}$  de tritón e incubar 5 minutos a 28°C
- Agregar 200  $\mu\text{l}$  de PNPG y cronometrar la reacción.

- Agregar 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para detener la reacción, registrar tiempo cronometrado [ $t_{\text{Rx}}$ ].
- Medir la absorbancia a 405 nm contra el blanco [ $D.O_{.405}$ ]
- Realizar los cálculos de actividad B-glucuronidasa usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta\text{glucuronidasa}_{U_{\text{miller}}} = \frac{D.O_{.405} \times 1000}{0.018 \times t_{\text{Rx}_{\text{min}}} \times V_{\text{Rx}_{\text{ul}}} \times \text{Proteína}_{\mu\text{g/ml}}}$$

Donde:

$\text{Proteína}_{\mu\text{g/ml}}$  corresponde a la concentración de proteína reportada con el método 6.5.11, *tomar especial atención a las unidades.*

Notas:

Las unidades de actividad reportadas son unidades Miller [U miller] que equivalen a los nmoles de p-nitrofenil generados cada minuto a 28°C/mg de proteína.

## 6.6. Prueba estadística

Para la cuantificación de la expresión de los sRNA del sistema Rsm (ver 7.3.2) Se analizaron tres muestras diferentes de cada fusión, los resultados fueron cuantificados y estandarizados a una lectura mock (niveles de expresión con fusiones vacías), se dibujaron barras de error de acuerdo con la desviación media estándar de cada grupo y se determinó diferencia estadística significativa con un análisis de varianza de una vía ANOVA (ver 11.1.4).

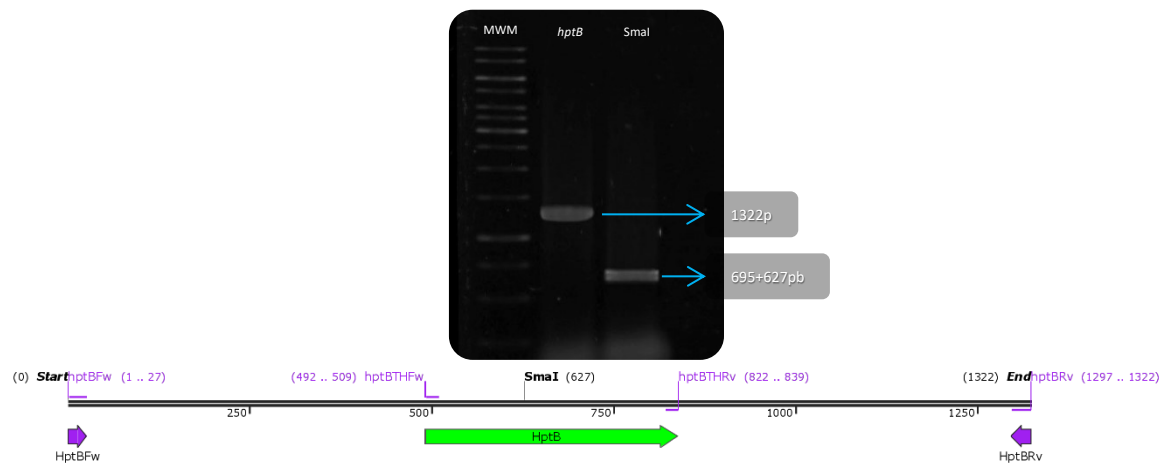
## 7. Resultados

### 7.1. Estudio fenotípico de la mutación en *hptB*.

#### 7.1.1. Clonación del gen *hptB*.

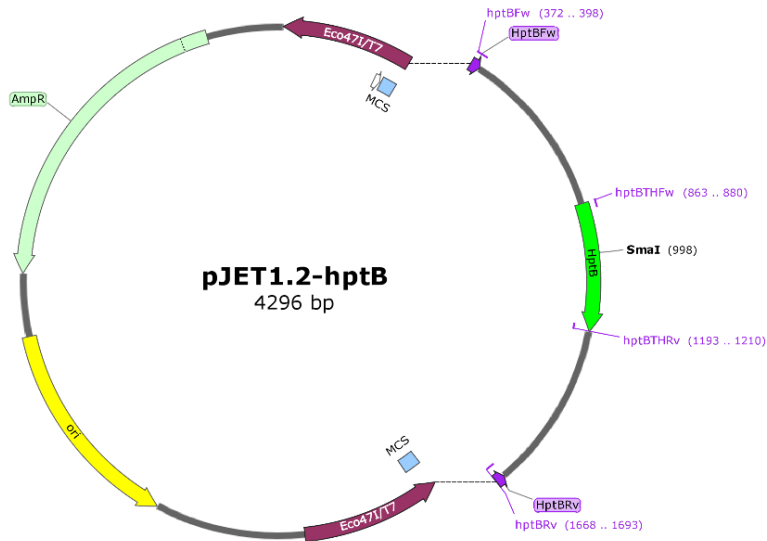
Se llevó a cabo la extracción de ADN total de *Azotobacter vinelandii* AEIV utilizando el método descrito en el apartado 6.5.2. A continuación, se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos *hptBFw* y *hptBRv*, y la ADN polimerasa Pfu. Las condiciones de PCR incluyeron una temperatura de hibridación de 61°C, un tiempo de extensión de 2.5 min y 25 de ciclos de amplificación. Esta amplificación permitió obtener la secuencia codificante de *hptB*, junto con aproximadamente 490 pb río arriba y río abajo, resultando en una secuencia total de 1322 pb.

La presencia del amplicón que contiene el gen *hptB* se confirmó mediante electroforesis y restricción enzimática utilizando el sitio único de restricción *SmaI* [695+627] (ver Fotografía 1).



Fotografía 1.- Arriba, gel de electroforesis, carril 1: marcador de peso molecular (MWM), carril 2: fragmento amplificado por PCR, carril 3: restricción del fragmento amplificado con endonucleasa *SmaI*; abajo, esquema del amplicón y sitio *SmaI*

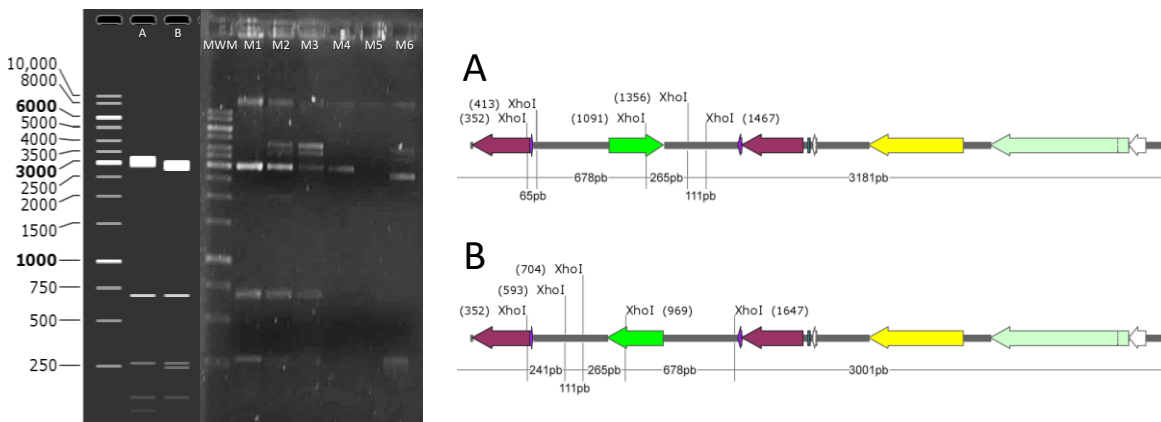
El producto de la amplificación fue ligado en el vector de clonación pJET1.2 / blunt siguiendo el protocolo del proveedor, para dar origen al vector pJET1.2-*hptB* (ver Mapa 1).



Mapa 1.- Vector pJET1.2-hptB, destacando el sitio de inserción de hptB.

Utilizando el procedimiento descrito en la sección 6.5.8, se realizó la transformación de células químicamente competentes de *E. coli* DH5α con el vector pJET1.2-hptB. Los transformantes resultantes, designados como DH5α-hptB, fueron seleccionados por resistencia en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

Se extrajo ADN plasmídico de las células candidatas a transformantes mediante el procedimiento descrito en 6.5.1.1; La verificación de la inserción, su orientación y las transformantes se realizó mediante ensayo de restricción con la endonucleasa XhoI: A:[3181+678+265+111+61] ó B:[3001+678+265+241+111] (ver Fotografía 2).



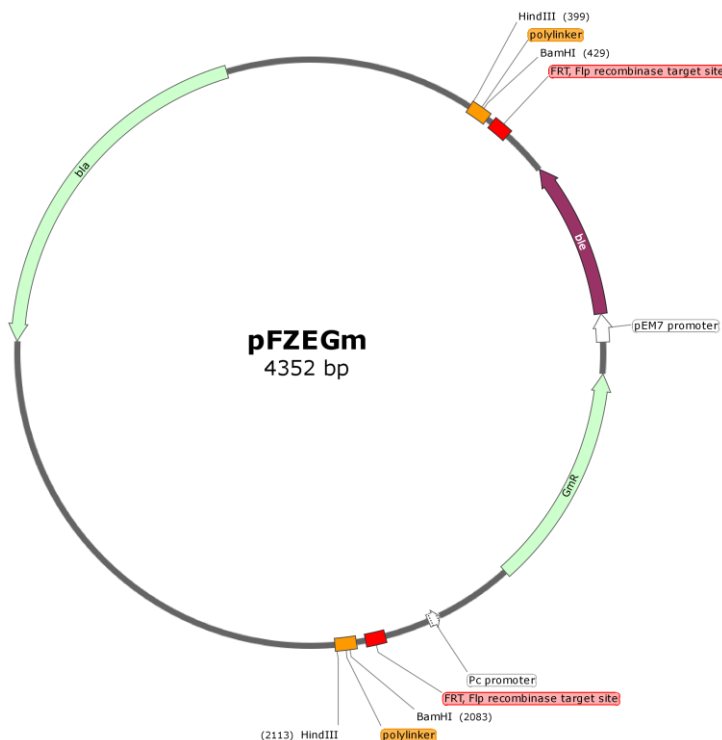
Fotografía 2.- Gel de electroforesis, de izquierda a derecha: MWM, pJET1.2-hptB Muestras 1-6, digeridas con XhoI. En la simulación del gel se puede apreciar patrón de restricción según sentido A o sentido B, a la derecha se tiene esquema de los sitios de restricción XhoI, se conservó la muestra 1 con el patrón "A"

### 7.1.2. Construcción del plásmido mutagénico.

Debido a su tamaño reducido y a que forma parte de un operón con tres genes río abajo (ver Fig. 11), se optó por realizar una mutación por inserción libre de marcadores en *hptB*. Esta estrategia permite una selección sencilla de las transformantes al mismo tiempo que evita la posibilidad de obtener mutantes con efectos polares. Para ello, se utilizó la herramienta pFZEGm desarrollada previamente en nuestro laboratorio (Rosales Cruz, 2018); este vector contiene un marcador de resistencia a gentamicina flanqueado por sitios FRT (Sitios diana de la recombinasa FLP) (ver Mapa 2).

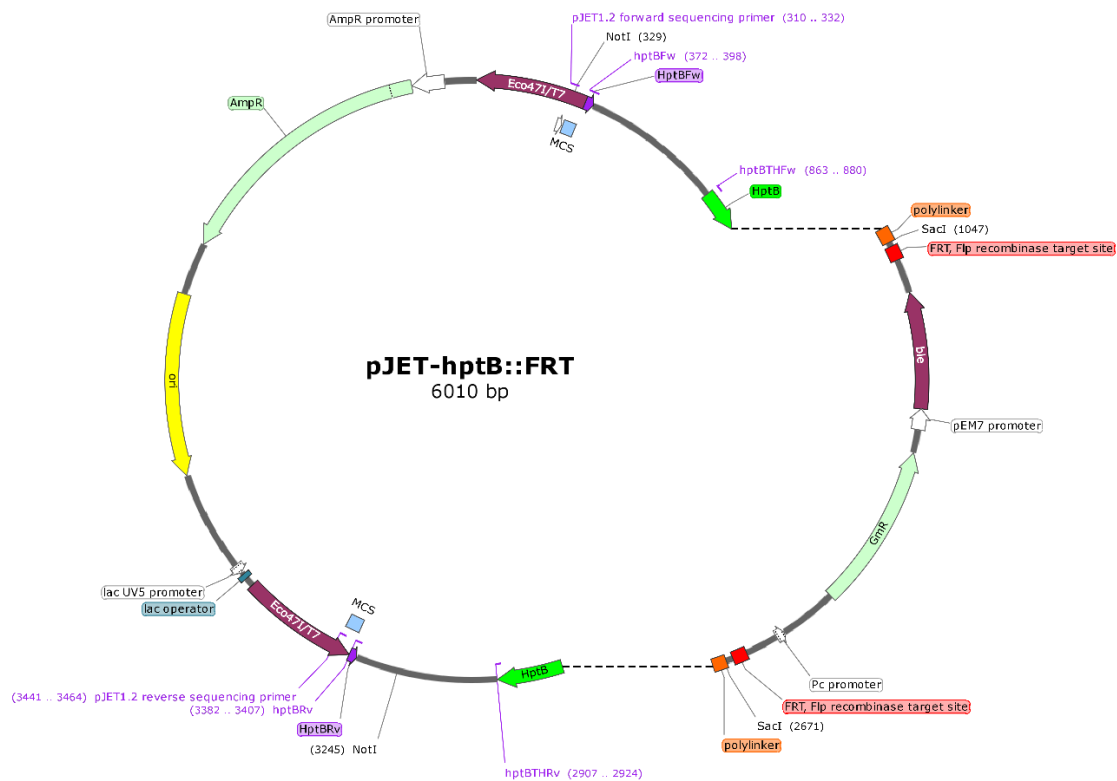
Se extrajo el plásmido base pJET1.2-*hptB* a través del procedimiento descrito en 6.5.1.1. Posteriormente, se llevó a cabo la digestión de dicho plásmido utilizando la endonucleasa *Sma*I (sitio único, extremos romos).

El inserto fue obtenido mediante la digestión de pFZEGm con la endonucleasa *Hind*III; el fragmento de interés (que contiene los sitios FRT y el marcador de resistencia a gentamicina) fue seleccionado y purificado a partir de una banda de agarosa (ver 6.5.5.2).



Mapa 2.- Vector pFZEGm; GmR: Gentamicina Acetiltransferasa, FRT: sitio Diana de la FLP Recombinasa, ble: Proteína de Resistencia a Zeocina. Nótese el sitio de reconocimiento de la endonucleasa *Hind*III.

Dado que en el inserto se generaron extremos adhesivos y en el plásmido base extremos romos, fue necesario rellenar los extremos del inserto utilizando la T4 DNA polimerasa para que fueran compatibles. La ligación se realizó siguiendo el procedimiento descrito en 6.5.7, lo que resultó en la obtención del vector pJET-*hptB*::FRT (ver Mapa 3).

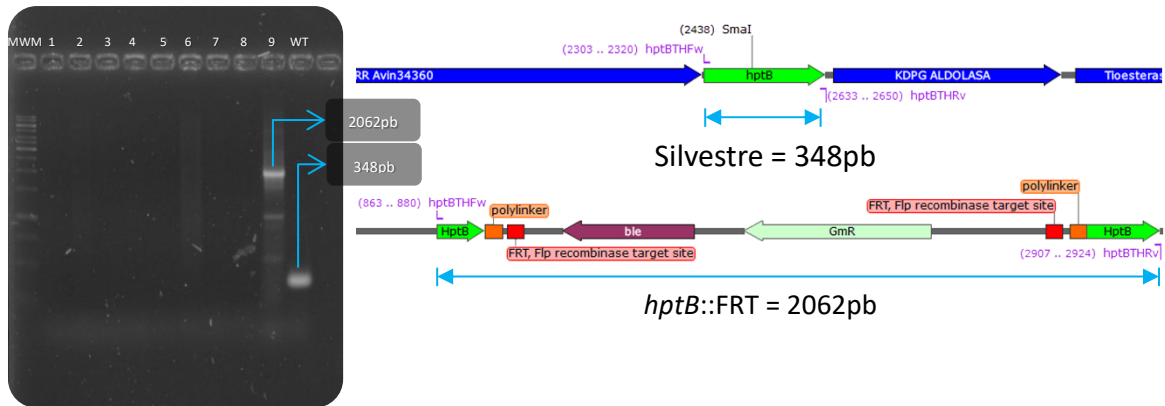


Mapa 3.- Vector pJET-*hptB*::FRT, el fragmento obtenido a partir de pFZEGm es insertado en el sitio *Sma*I, directamente a la mitad del gen *hptB*.

El vector pJET-*hptB*::FRT se transformó en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes utilizando el método descrito en 6.5.8. Las colonias potenciales transformantes se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, y las placas se incubaron a 37°C durante 16 -18 horas. Este proceso de selección resultó en la generación de la cepa dh5 $\alpha$ -*hptB*::FRT.

La verificación del vector pJET-*hptB*::FRT se llevó a cabo mediante ensayo de restricción con las endonucleasas *Sac*I: [4381+1624] y *Not*I: [3094+1624] (ver Fotografía 3).





Fotografía 4.- Gel de electroforesis, de izquierda a derecha: Marcador de peso molecular, PCR ADN total de candidatas a recombinantes muestras 1-9, control negativo; La muestra 9 amplifica el tamaño de la mutante sin amplificar el tamaño del gen silvestre, por lo que es una colonia mutante isogénica. En el esquema de la derecha se puede apreciar el tamaño del amplicón silvestre (WT) y el mutante (*hptB::FRT*) usando los oligonucleótidos *hptBTHFw* y *hptBTHRv*.

Al incubar a la cepa de *A. vinelandii hptB::FRT*, en medio BS líquido por 36 hrs, a 30°C en agitación, se observó reducción en la producción de alginato (ver Fotografía 5).

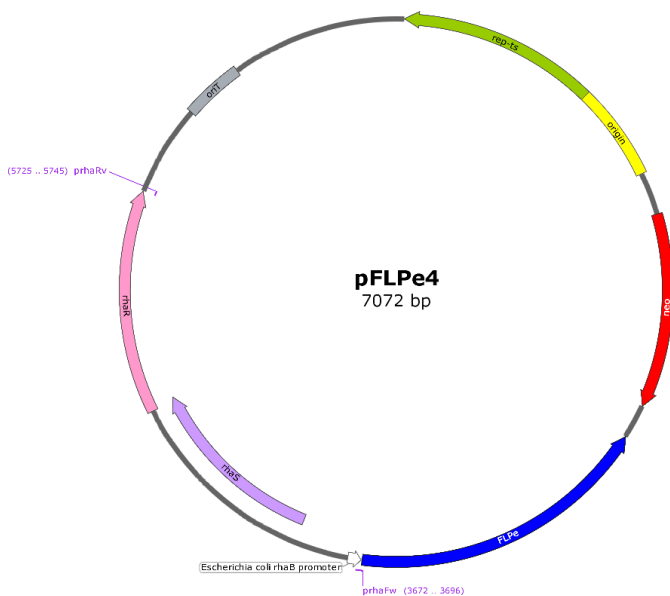


Fotografía 5.- Tubo izquierdo, *A. vinelandii* cepa AEIV (silvestre); Tubo derecho, *A. vinelandii* cepa *hptB:FRT* (mutante), la carga celular se puede apreciar con color café oscuro, el alginato se puede apreciar en color beige semisólido.

#### 7.1.4. Escisión del casete de resistencia a gentamicina mediado por el sistema FLP-FRT.

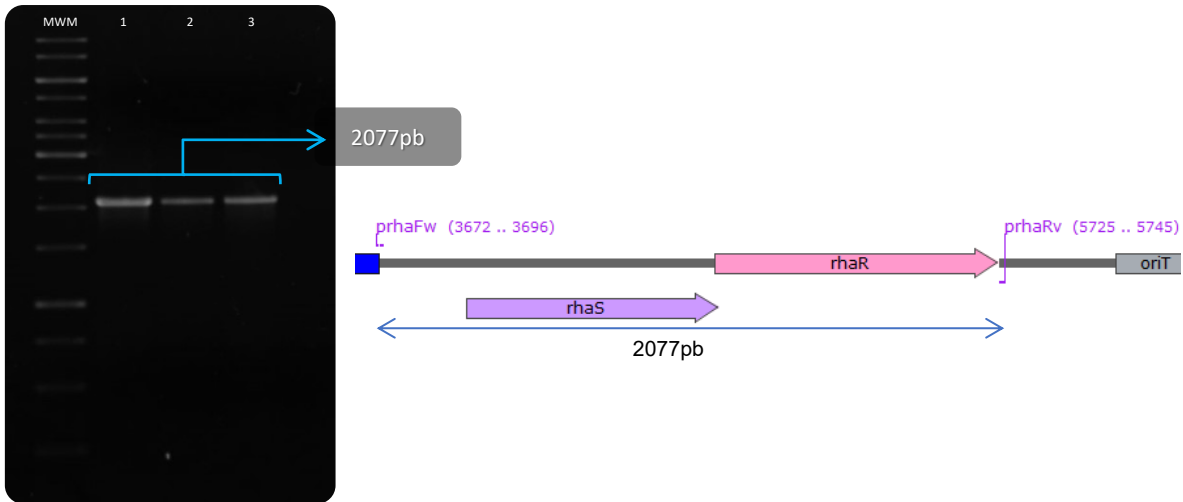
Con el propósito de asegurar que el fenotipo observado en la mutante no es causado por efecto polar derivado de la inserción, se continuó con la escisión del casete de resistencia a gentamicina cromosomalmente integrado en la cepa *hptB*::FRT, mediado por el sistema FLP-FRT (Choi et al., 2008).

Con ayuda de la cepa de *E. coli* HB101 pRK2013, Se realizó una conjugación triparental del plásmido pFLPe4 en la cepa *hptB*::FRT de *A. vinelandii*, según el protocolo descrito en la sección 6.5.10; pFLPe4 es un plásmido termosensible que contiene la región codificante de la recombinasa FLP bajo control del sistema de expresión inducible en presencia de L-ramnosa (*rhaR/rhaS*), además contiene un casete de resistencia a kanamicina (ver Mapa 4).



La selección de las posibles colonias transconjugantes se realizó mediante el marcador de resistencia otorgado por el plásmido pFLPe4, para esto se seleccionaron aleatoriamente algunas colonias y se sembraron en medio BS adicionado con kanamicina (30 µg/mL).

La verificación de las cepas transconjugantes se realizó mediante PCR del ADN plasmídico; Se usaron los oligonucleótidos pRhaFw y pRhaRv (ver Mapa 4), donde se confirmó la presencia del vector pFLPe4 en la mutante *A. vinelandii hptB::FRT* (ver Fotografía 6).



Fotografía 6.- Gel de electroforesis, Amplicón obtenido usando los oligonucleótidos pRhaFw y pRhaRv en las posibles transconjugantes de *A. vinelandii hptB::FRT*. Carril 1: Marcador de peso molecular (MWM), Carril 2: Control positivo obtenido a partir del vector pFLPe4, Carriles 3 y 4: Muestras 1 y 2.

Ya verificada la conjugación, se indujo la expresión de la recombinasa FLP al inocular la cepa transconjugante en medio bs líquido adicionado con L-ramnosa al 0.2% e incubar los matraces por 48 h a 30°C en agitación.

La proteína FLP es una recombinasa sitio específico de la familia de las tirosinas y lleva a cabo su función por un mecanismo de topoisomerasa tipo IB, en ello, reconoce dos hebras de ADN con el sitio FRT, y mediante un empalme de holliday las recombina (Ma, Kwiatek, Bolusani, Voziyanov, & Jayaram, 2007), lo que para el gen *hptB* significa la escisión del casete sin la pérdida de la mutación como se puede apreciar en la Fig. 13.

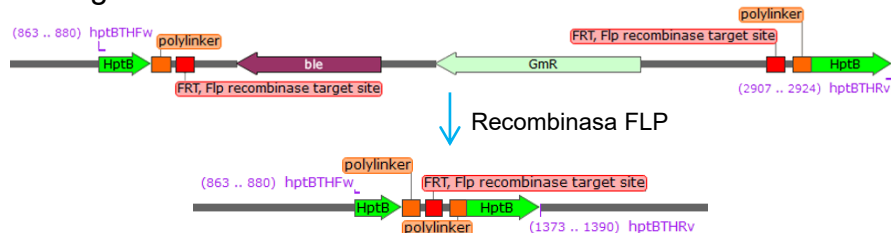
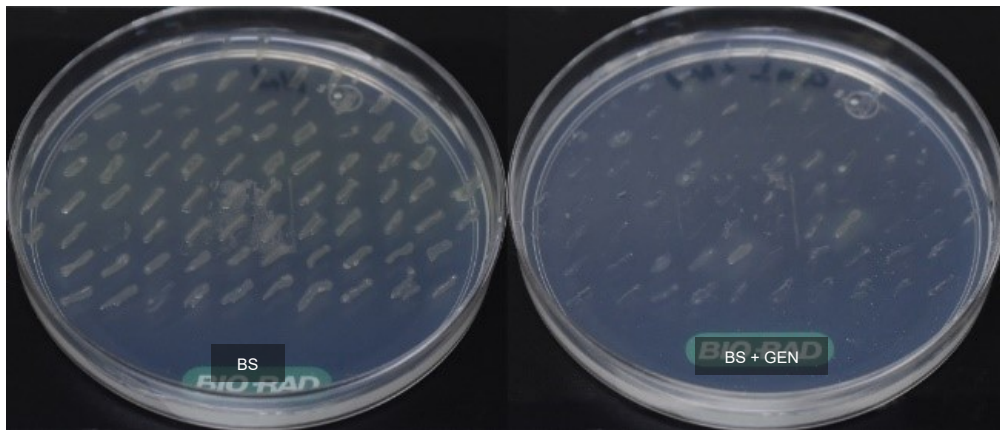


Fig. 13.- Esquema del mecanismo de escisión del casete de gentamicina y mapa del gen *hptB* cromosomal de la cepa *hptB::FRT* pre y post escisión.

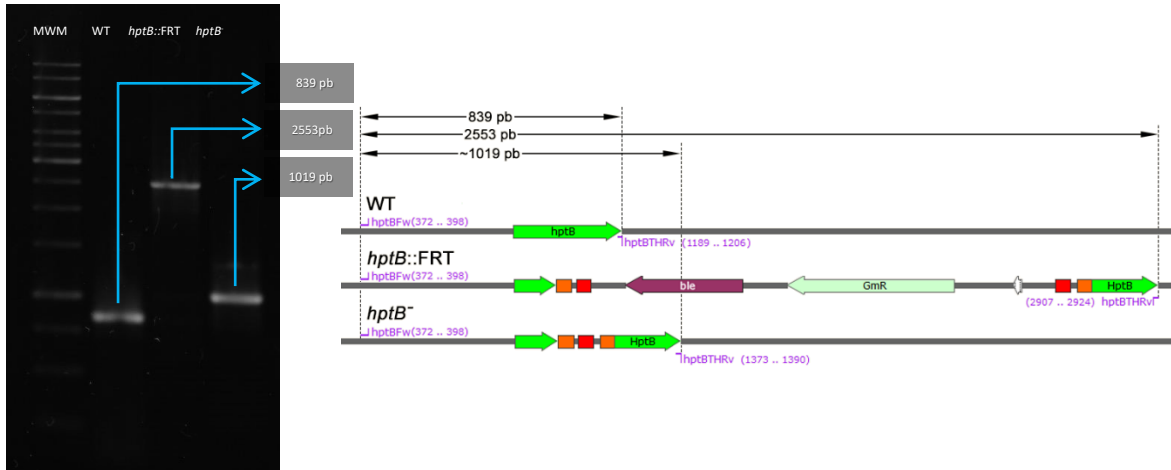
Posterior a la inducción de recombinasa FLP se incubaron los matraces a 37°C por 12 hrs para eliminar el plásmido pFLPe4 de *A. vinelandii hptB::FRT*, según lo reportado previamente en otro trabajo (Rosales Cruz, 2018).

La selección de las colonias que perdieron el casete de resistencia a gentamicina se realizó por ensayo de contra-selección, para esto se realizó una dilución  $1 \times 10^{-6}$  con la cual se obtuvieron ~80 UFC, se inoculó una misma colonia en dos placas diferentes y en posición determinada, una placa que contiene medio BS sin antibióticos y otra de medio BS adicionado con gentamicina 10 µg/ml. Se tomaron como candidatas potenciales aquellas colonias que no crecieron en la placa de medio BS adicionado con gentamicina, pero sí en la placa sin antibióticos (ver Fotografía 7).



Fotografía 7.- Ensayo de contra-selección para la escisión del casete de gentamicina, Izquierda: Agar Burk-Sacarosa, Derecha: Agar Burk-Sacarosa adicionado con gentamicina.

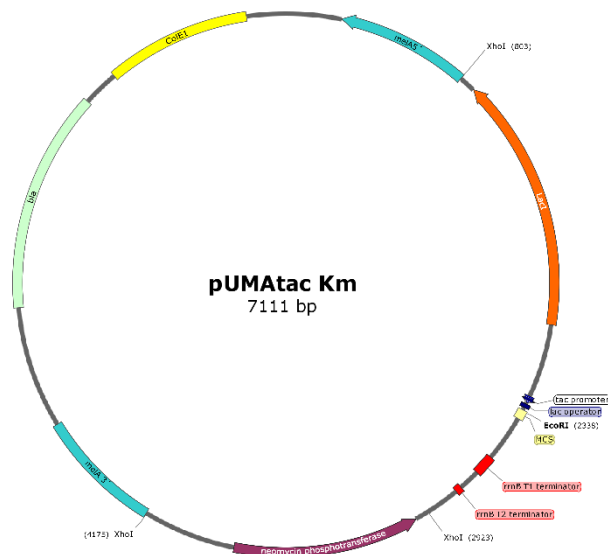
Las colonias seleccionadas fueron verificadas mediante PCR usando los oligonucleótidos hptBFw y hptBTHRv a una TM 64°C de donde se visualizó la reducción en el tamaño del amplicón derivada de la pérdida del casete (ver Fotografía 8) dando origen a la cepa *A. vinelandii hptB<sup>-</sup>*, la cual conserva el fenotipo alginato negativo, con lo que se descarta que el fenotipo observado sea consecuencia de una mutante polar; cabe mencionar que a partir de la inserción en *hptB* se crea un cambio en el marco de lectura sin sentido que detiene la traducción de la proteína antes del sitio activo de esta.



Fotografía 8.- Gel de electroforesis, PCR con oligonucleótidos *hptBFw* y *hptBTHRv* de: Carril 2, Cepa silvestre (WT); Carril 3, cepa *hptB::FRT*; Carril 4, Cepa *hptB<sup>-</sup>* (después de la escisión de casete). A la derecha se aprecia el esquema de la secuencia y el tamaño del amplicón.

## 7.2. Complementación de la mutante *hptB<sup>-</sup>* y sobre-expresión.

Con el fin de complementar a la cepa recombinante en HptB de *A. vinelandii*, y obtener una cepa sobre-expresante se optó por una estrategia de intercambio alélico utilizando el vector pUMAtacKm (Coxca - Isidro, 2015); Este vector integrativo es capaz de recombinarse en el locus neutro *meIA* de *A. vinelandii*, contiene un casete de resistencia a kanamicina y un sitio de multiclonación (MCS) rio abajo del promotor híbrido *tac* (de Boer, Comstock, & Vasser, 1983) seguido por el terminador complejo de *rrnB* T1/T2 (ver Mapa 5).



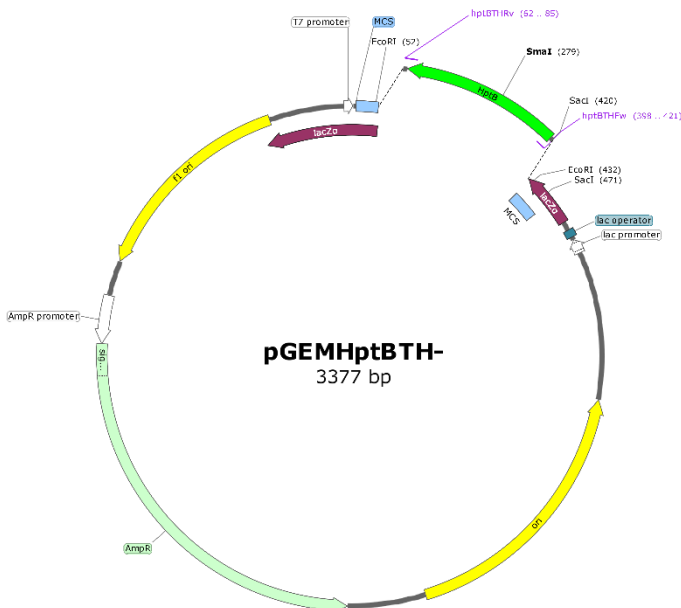
Mapa 5.- Vector pUMAtac Km, se puede apreciar el sitio de multiclonación (MCS) debajo del promotor híbrido *tac*, seguido por los terminadores T1/T2 de *rrnB*; se denotan los sitios *XhoI* y *EcoRI*, relevantes para este estudio.

### 7.2.1. Clonación del gen estructural *hptB*.

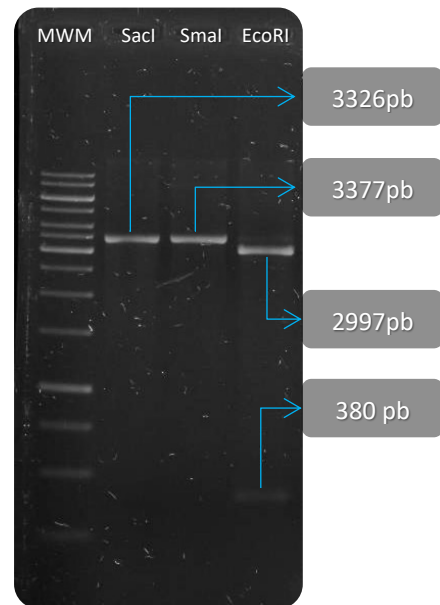
Se llevó a cabo la extracción de ADN total de *Azotobacter vinelandii* AEIV utilizando el método descrito en el apartado 6.5.2. A continuación, se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos *hptBTHFw* y *hptBTHRv*, usando la ADN polimerasa dream Taq. Las condiciones de PCR incluyeron una temperatura de hibridación de 56°C, un tiempo de extensión de 1 min y 25 de ciclos de amplificación. Esta amplificación permitió obtener la secuencia estructural de *hptB*, resultando en un amplicón de 361 pb (ver esquema en Fotografía 1).

El amplicón previamente obtenido fue purificado según y ligado en el vector comercial pGEM-T Easy siguiendo el protocolo del proveedor, dando origen al vector pGEMHptBTH- (ver Mapa 6); el cual fue transformado en *E. coli* DH5α químico-competentes, usando el método descrito en 6.5.8.

Las colonias candidatas a transformantes fueron seleccionadas en medio LB adicionado con kanamicina 20 µg/ml, La verificación de la inserción se realizó mediante ensayo de restricción con las endonucleasas *SacI*, *SmaI* y *EcoRI* a partir de la extracción plasmídica de las candidatas a transformantes (ver Fotografía 9).

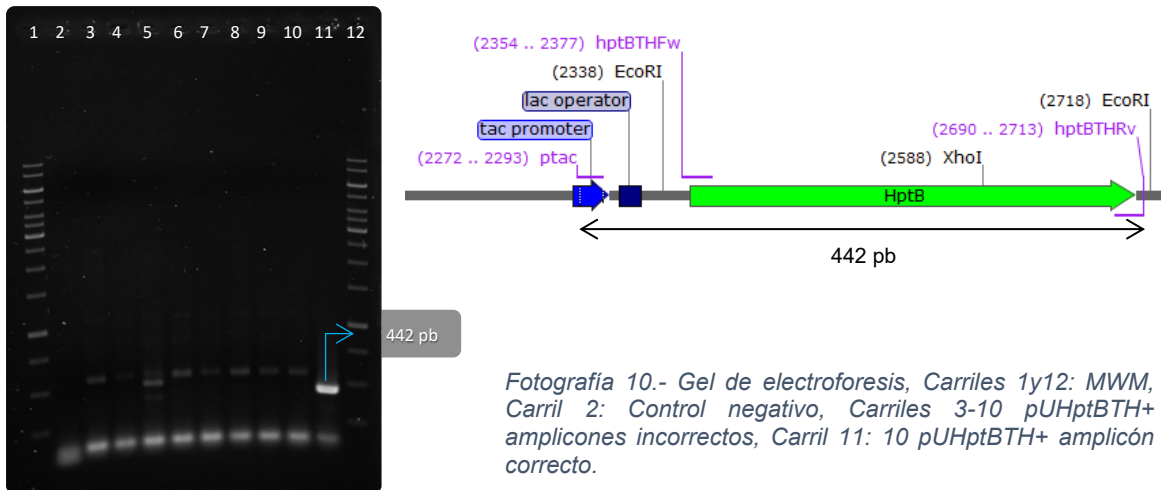


Mapa 6.- Vector pGEMHptBTH-, se puede apreciar el sitio de inserción del amplicón HptB así como los sitios de restricción importantes para este estudio (*SacI*, *SmaI*, *EcoRI*).

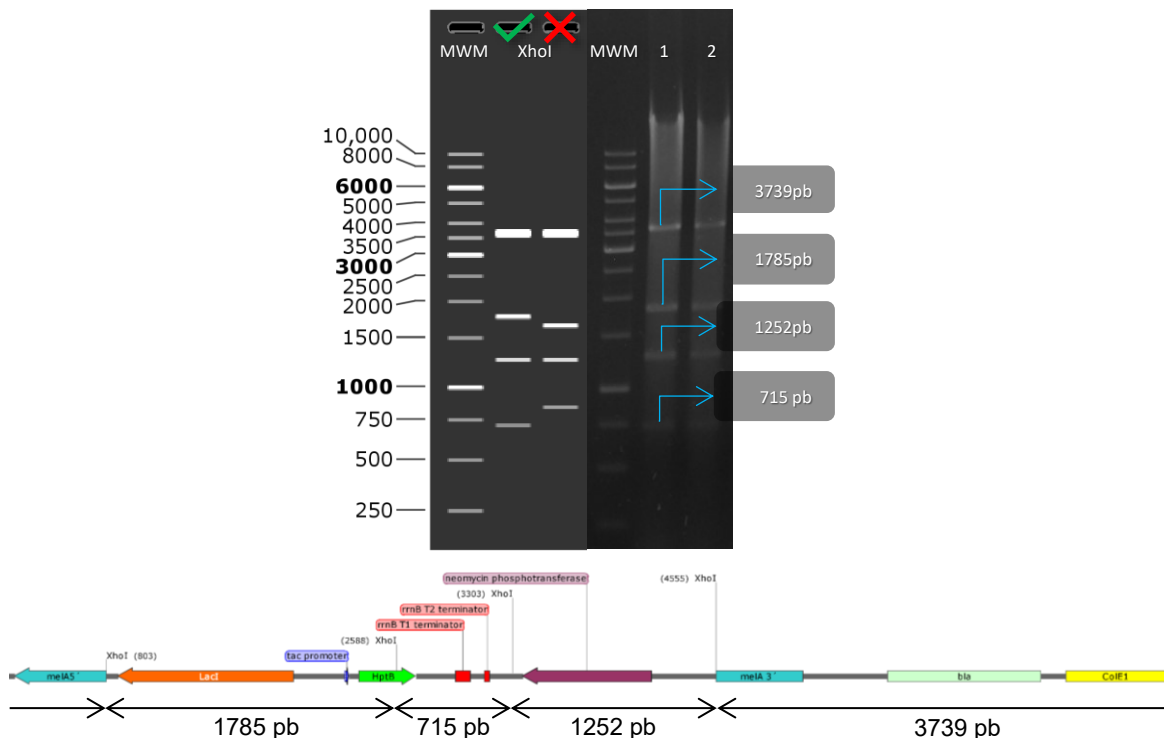


Fotografía 9.- Gel de electroforesis, Carril 1: Marcador de peso molecular, pGEMHptBTH- digerido con Carril 2: *SacI*, Carril 3: *SmaI*, Carril 4: *EcoRI*.





Además de ser verificado mediante PCR [442 pb], se revisó la orientación del inserto mediante un ensayo de restricción con la endonucleasa *XhoI*: [3739+1785+1252+715pb] confirmando la correcta inserción y generación del vector pUHptBTH+ (ver Fotografía 11).



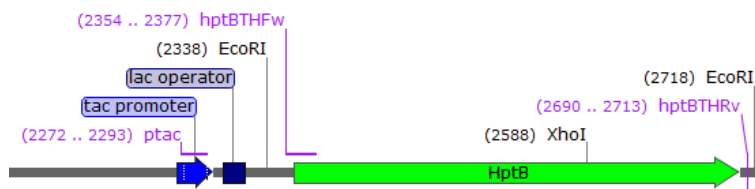
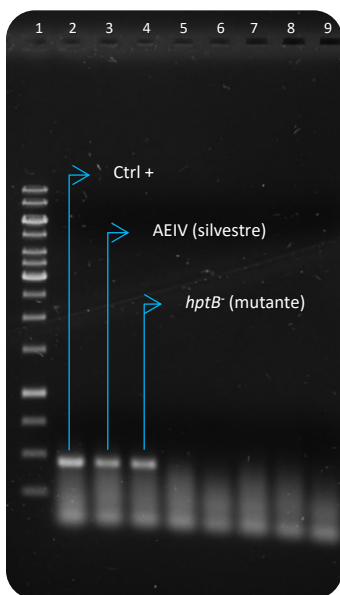
Fotografía 11.-Izquierda: patrón esperado de digestión con *XhoI*; Derecha: Gel de electroforesis, Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: muestra 1, Carril 3: muestra 2.

### 7.2.3. Obtención de las cepas complementada y sobre-expresada.

Se llevó al estado de competencia a las cepas *A. vinelandii hptB<sup>-</sup>* (mutante) y *A. vinelandii* AEIV (silvestre); Siguiendo el método descrito en 6.5.9, se transformó en ambas cepas el plásmido pUHptBTH+ y se seleccionó a las colonias candidatas a transformantes en medio BS adicionado con kanamicina 4 µg/ml.

Ya que el plásmido pUHptBTH+ tiene un origen de replicación *ColE1*, el cual no es funcional en *A. vinelandii*, el intercambio alélico, así como la eliminación posterior del plásmido, fueron determinados mediante la selección de transformantes resistentes a kanamicina en medio BS.

Las candidatas a transformantes fueron verificadas por PCR con los oligonucleótidos ptac y hptBTHRv (ver Fotografía 12), de tal manera que la cepa AEIV (silvestre) transformante resultó la cepa sobre-expresada con genotipo *meIA::hptB<sub>ptac</sub>* y la cepa mutante transformante resultó en la cepa complementada con genotipo *hptB<sup>-</sup>, meIA::hptB<sub>ptac</sub>*.

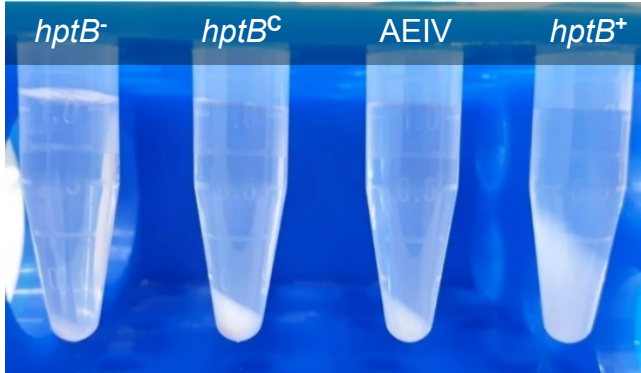


Fotografía 12.- Gel de electroforesis, Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Control positivo (amplicón de plásmido pUHptBTH+), Carril 3: amplicón de candidata a transformante cepa AEIV (silvestre), Carril 4: amplicón de candidata a transformante cepa hptB<sup>-</sup> (mutante), Carriles 5 – 9: Muestras adicionales.

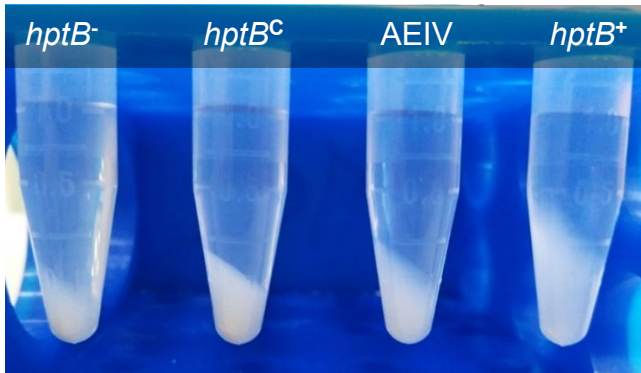
Para observar el fenotipo de las cepas AEIV (silvestre), *hptB<sup>-</sup>* (mutante), *hptB<sup>C</sup>* (complementada) y *hptB<sup>+</sup>* (sobre-expresada), se incubó cada cepa en medio BS sólido a 30°C por 48 h, posteriormente las células fueron lavadas con MgSO<sub>4</sub> 10mM y se estandarizaron a una DO<sub>625</sub> de 0.5, a partir de dicha estandarización se

inocularon 100µl de cada cepa en tubos Falcon® de 10ml con 5ml de medio BS líquido adicionado con IPTG 1mM y sin antibióticos; se incubaron los tubos a 30°C en agitación a 110 rpm.

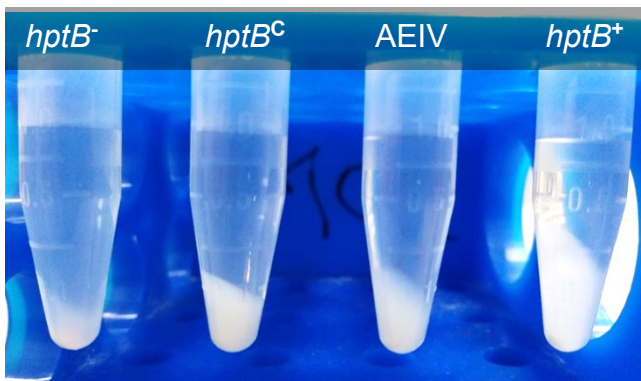
Se foto-documentó el crecimiento de las cuatro cepas a las 24, 48 y 72 hrs, para esto se transfirió 1 ml de cada tubo Falcon® a tubos Eppendorf® y se centrifugó a 1200 rpm por 2 minutos (ver Fotografía 15, Fotografía 13 y Fotografía 14).



Fotografía 14.- Comparación a las 24 hrs del crecimiento de las cepas mutante, complementada, silvestre y sobre-expresada (de izquierda a derecha); en color blanco opalescente se aprecia el alginato, en color beige la masa celular.



Fotografía 13.- Comparación a las 48 hrs del crecimiento de las cepas mutante, complementada, silvestre y sobre-expresada (de izquierda a derecha); en color blanco opalescente se aprecia el alginato, en color beige la masa celular.



Fotografía 15.- Comparación a las 72 hrs del crecimiento de las cepas mutante, complementada, silvestre y sobre-expresada (de izquierda a derecha); en color blanco opalescente se aprecia el alginato, en color beige la masa celular.

Se puede observar que la cepa *hptB*<sup>-</sup> tiene una capacidad de biosíntesis de alginato disminuída, las cepas AEIV y *hptB*<sup>C</sup> tienen una capacidad nominal y la cepa *hptB*<sup>+</sup> tiene una capacidad aumentada.

### 7.3. Relación de HptB con *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY*

Con el propósito de caracterizar el perfil de expresión de los pequeños ARN del sistema Rsm en *A. vinelandii hptB<sup>-</sup>*, se optó por emplear los vectores integrativos: pUMA *rsmY-gusA*, pUMA *rsmZ1-gusA* y pUMA *rsmZ2-gusA*; estos vectores, concebidos previamente en el seno del laboratorio (López-Pliego et al., 2018), portan un marcador de resistencia a tetraciclina, ostentan un origen de replicación ColE1, y albergan una fusión entre la región reguladora de los pequeños ARN de interés y el gen reportero *gusA*, dicha fusión se encuentra insertada en el gen *meIA* obtenido a partir de *A. vinelandii* (ver Fig. 14).

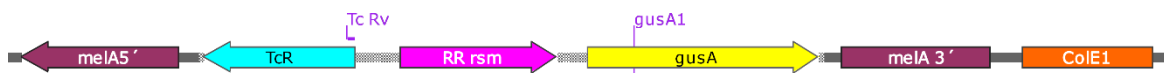
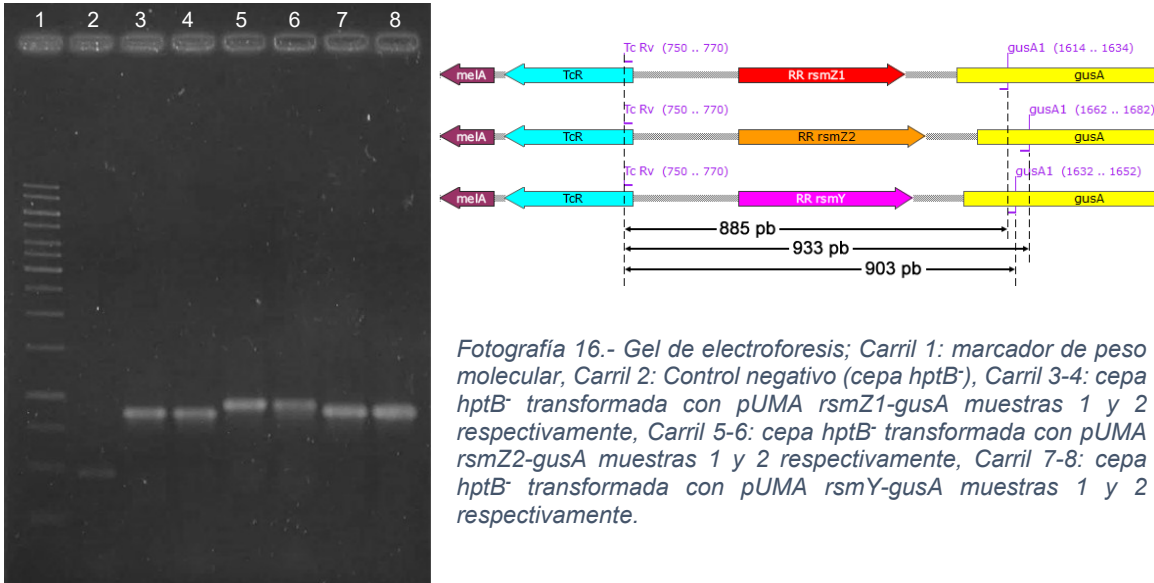


Fig. 14.- Esquema de la estructura de los vectores pUMA *rsmZ1-gusA*, pUMA *rsmZ2-gusA* y pUMA *rsmY-gusA*, en texto color violeta se aprecia el sitio de reconocimiento de los oligonucleótidos relevantes para este estudio..

Ya que la fusión *rsm-gusA* liga la región reguladora de los sRNA del sistema rsm, con el gen reportero *gusA*, es factible establecer una relación directa entre los niveles de expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa con el sRNA correspondiente, de esta manera, al cuantificar la actividad enzimática del reportero *gusA* en la cepa mutante *hptB<sup>-</sup>* y contrastarla con los niveles presentes en la cepa silvestre AEIV, es posible caracterizar el nivel de expresión de los sRNA del sistema RSM.

#### 7.3.1. Obtención de las mutantes con la fusión *rsm-gusA*

Se llevó al estado de competencia a la cepa *hptB<sup>-</sup>* (mutante) y mediante el método descrito en el punto 6.5.9, se transformaron los vectores pUMA *rsmY-gusA*, pUMA *rsmZ1-gusA* y pUMA *rsmZ2-gusA*, las candidatas a transformantes fueron seleccionadas en agar BS adicionado con tetraciclina 40  $\mu$ g/ml, posteriormente se verificó el intercambio alélico mediante PCR del ADN total de las candidatas a transformantes usando Taq ADN polimerasa con los oligonucleótidos *gusA1* y Tc Rv con las siguientes condiciones de PCR: temperatura de hibridación 59°C, tiempo de extensión 2 min y 25 de ciclos de amplificación (ver Fotografía 16).



Fotografía 16.- Gel de electroforesis; Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Control negativo (cepa *hptB*<sup>-</sup>), Carril 3-4: cepa *hptB*<sup>-</sup> transformada con *pUMA rsmZ1-gusA* muestras 1 y 2 respectivamente, Carril 5-6: cepa *hptB*<sup>-</sup> transformada con *pUMA rsmZ2-gusA* muestras 1 y 2 respectivamente, Carril 7-8: cepa *hptB*<sup>-</sup> transformada con *pUMA rsmY-gusA* muestras 1 y 2 respectivamente.

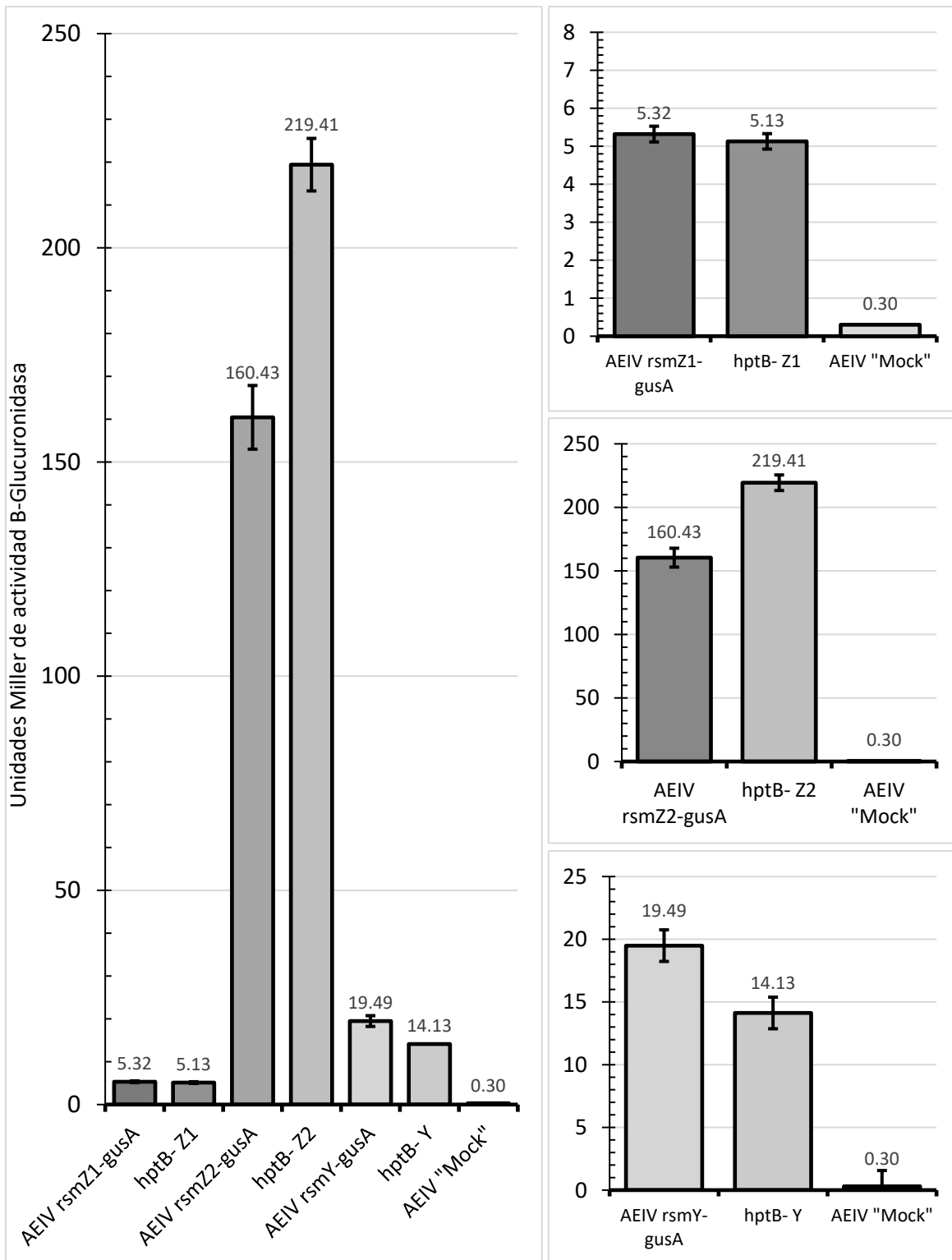
Al comprobar la PCR y verificar que la transformación fue exitosa, se obtuvieron las cepas *hptB*<sup>-</sup>Z1, *hptB*<sup>-</sup>Z2 y *hptB*<sup>-</sup>Y las cuales, además de ser mutantes en *hptB*, portan las fusiones transcripcionales *rsmZ1-gusA*, *rsmZ2-gusA* y *rsmY-gusA*,

### 7.3.2. Cuantificación de la expresión de los sRNA del sistema Rsm.

Para cuantificar la actividad del reportero GusA, se realizó la cuantificación de proteína con el reactivo de folín fenol (Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall, 1951), descrita en 6.5.11; con los datos obtenidos, se realizó la cuantificación de actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa, como se describe en 6.5.12.

La cuantificación se ejecutó en un solo ensayo, con tres muestras de cada cepa, las muestras usadas fueron: *hptB*<sup>-</sup>Z1, *hptB*<sup>-</sup>Z2 y *hptB*<sup>-</sup>Y; como controles se usaron: AEIV *rsmZ1-gusA*, AEIV *rsmZ2-gusA*, AEIV *rsmY-gusA*; para normalizar resultados y eliminar actividad residual se usó a la cepa AEIV como “mock”.

Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Gráfica 1 a continuación; Las tablas, datos crudos y fórmulas se pueden encontrar en el Anexo 1 – Resultados de la cuantificación de la  $\beta$ -glucuronidasa.



Gráfica 1.- Niveles de expresión de sRNA rsmZ1, Z2 y Y en la mutante contra la cepa silvestre, Izquierda: datos normalizados contra "mock"; Derecha arriba: resultados aislados de rsmZ1, estadísticamente no significativos; Derecha en medio: resultados aislados de rsmZ2, estadísticamente significativos, la mutante en hptB aumenta la expresión de rsmZ2; Derecha abajo: resultados aislados de rsmY, estadísticamente significativos; la mutante en hptB disminuye la expresión de rsmY.

## 7.4. Relación de HptB con las HK's GacS2, RetS y LadS.

Ya que existe una alta probabilidad de que alguna de las HK's truncas relacionadas con la producción de alginato (GacS2, LadS, RetS) interactúen con HptB para transmitir la señal de fosfato, se decidió llevar a cabo un ensayo de interacción proteína-proteína.

### 7.4.1. Ensayo de doble híbrido, el sistema LexA.

Para el ensayo de interacción proteína-proteína se decidió emplear el sistema LexA (Daines et al., 2002) el cual es un tipo de ensayo de doble híbrido que presenta la ventaja de probar la hetero-dimerización de las proteínas problema en sistemas *in vivo*.

El sistema LexA consta de la proteína de mismo nombre y su operador, la proteína se une a su operador como un homo-dímero y sólo como dímero reprime la traducción del gen reportero que se encuentre río abajo (ver Fig. 15).

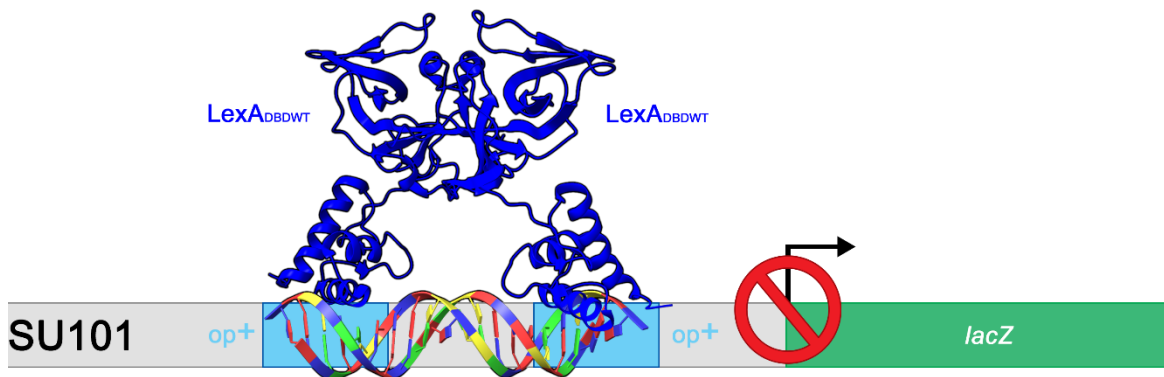


Fig. 15.- El homo-dímero reprime al operador silvestre en SU101, modificado de (Daines et al., 2002).

Para que LexA sea usado en ensayos de hetero-dimerización, se requiere de la proteína silvestre (LexA<sub>DBDWT</sub>) y la misma proteína, pero con su DBD (dominio de unión a ADN) mutante (LexA<sub>DBDmut</sub>), a su vez, se requiere de un sistema de expresión donde el operador sea híbrido (op<sup>+</sup>/op<sup>408</sup>), con la mitad capaz de reconocer a LexA<sub>DBDWT</sub> (op<sup>+</sup>) y la otra mitad capaz de reconocer a LexA<sub>DBDmut</sub> (op<sup>408</sup>), de tal que únicamente si ambas proteínas se dimerizan (interactúan) el gen reportero será reprimido (ver Fig. 16).

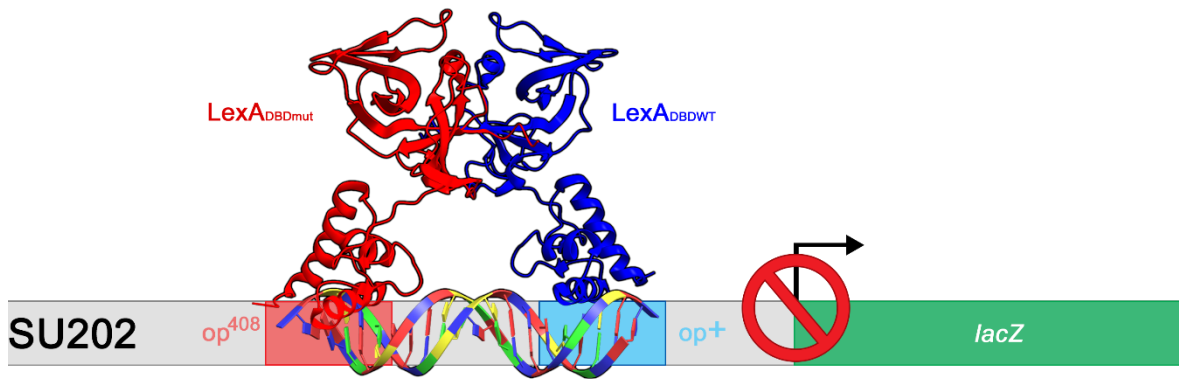
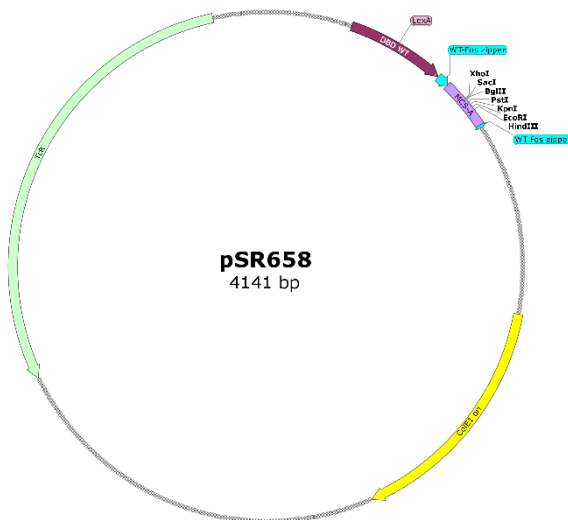
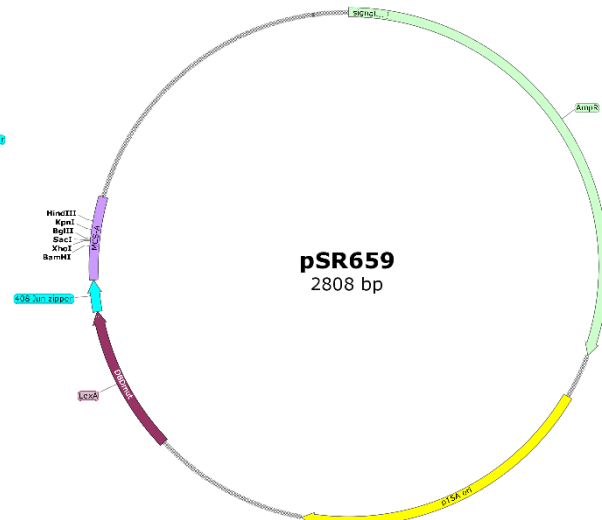


Fig. 16.- El hetero-dímero reprime al operador híbrido en la cepa SU202, modificado de (Daines et al., 2002).

El sistema LexA para hetero-dimerización que utilizamos ocupa dos vectores: el vector pSR658, o vector “cebo”, que codifica la región DBD de la proteína LexA<sub>DBDWT</sub>, y en vez de codificar el dominio de dimerización de esta, fusiona una de las proteínas de interés, tiene un casete de resistencia a tetraciclina y origen de replicación ColE1 (ver Mapa 9). El segundo vector, o el vector “presa”, codifica la región DBD de LexA<sub>DBDmut</sub> e igual que el vector cebo, en vez de codificar el dominio de dimerización de esta, fusiona la segunda proteína de interés, ostenta un casete de resistencia a ampicilina y origen de replicación p15A (ver Mapa 8). El sistema de expresión es la cepa SU202 de *E. coli* el cual cuenta con un operador op<sup>408</sup>/op<sup>+</sup> rio arriba de *lacZ*.



Mapa 9.- Vector pSR658, en amarillo: origen de replicación colE1, en verde: casete de resistencia a tetraciclina, en morado DBD<sub>WT</sub> lexA, en lila: sitio de multiclonación.

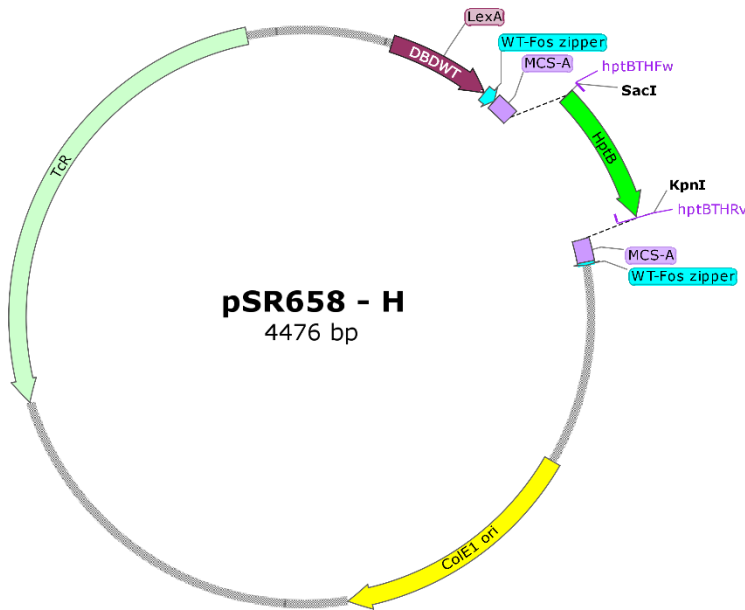


Mapa 8.- Vector pSR659, en amarillo: origen de replicación p15A, en verde: casete de resistencia a ampicilina, en morado DBD<sub>mut</sub> lexA, en lila: sitio de multiclonación.

### 7.4.2. Generación del vector “cebo”.

Se extrajeron los vectores pSR658 y pGEMhptBTH- (ver Mapa 6) usando el método descrito en el punto 6.5.1.1, posteriormente se sometieron a digestión doble con las endonucleasas *SacI* y *KpnI* usando buffer tango a 37°C por 15 min; Posterior a la digestión se purificaron ambos fragmentos usando la metodología descrita en 6.5.5.2.

Al tener los fragmentos purificados, se realizó la ligación usando la metodología descrita en 6.5.7, resultando así en el vector pSR658-H (ver Mapa 10); cabe mencionar que los oligonucleótidos usados para clonar la región estructural de *hptB* fueron diseñados para quedar en marco de lectura con *lexA* (ver Fig. 17).



Mapa 10.- Vector pSR658-H, se puede apreciar el sitio de inserción de la región estructural del gen *hptB* en los sitios *SacI* y *KpnI*

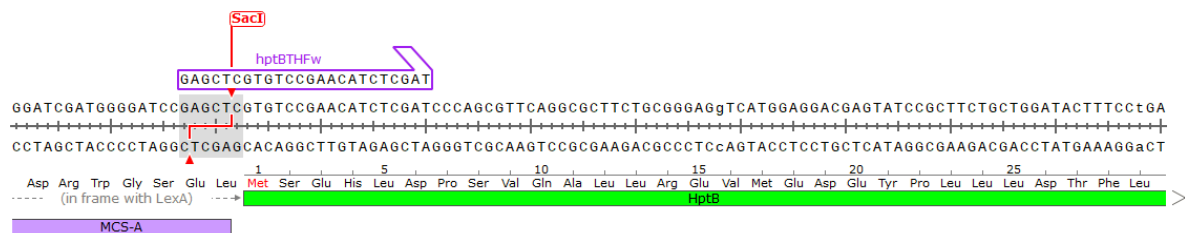


Fig. 17.- Acercamiento del sitio *SacI* en donde se insertó el gen *hptB* en el vector pSR658, se puede apreciar en la secuencia de aminoácidos que el gen *hptB* está en marco de lectura con el gen *lexA* y su sitio de multiclonación según lo descrito por Daines et al., 2002.

Las candidatas a transformantes fueron seleccionadas en medio LB adicionado con tetraciclina 40 µg/ml, y posteriormente fueron verificadas mediante ensayo de restricción utilizando las endonucleasas *Sma*I: [4476pb], y *Sac*I+*Kpn*I: [4122+352pb] (ver Fotografía 17).



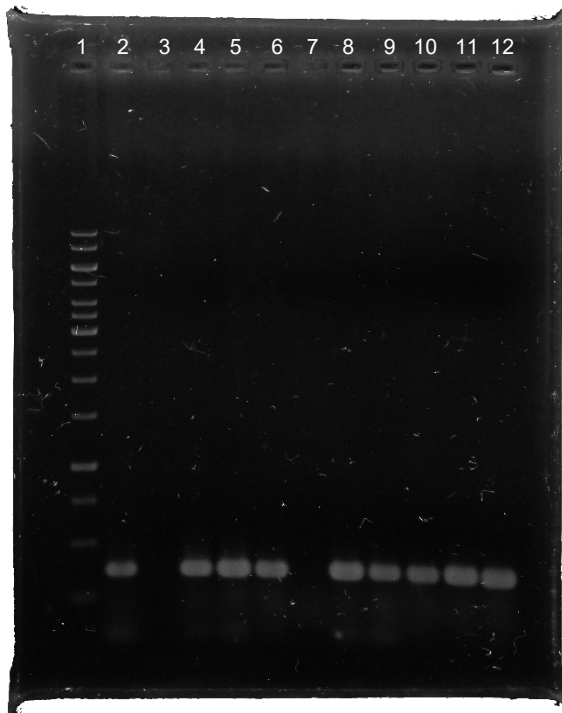
Fotografía 17.- Gel de electroforesis, ensayo de restricción, Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Vector pSR658-H circular, Carril 3: Vector pSR658-H digerido con *Sma*I, Carril 4: Vector pSR658-H digerido con *Sac*I+*Kpn*I.

#### 7.4.3. Obtención de las cepas doble híbrido.

Mediante el método descrito en 6.5.8 se transformó a las cepas SU202–G (González, V. datos no publicados), SU202–L, SU202–R, (Sánchez Cuapio, 2012), con el vector pSR658-H (ver Mapa 10).

La candidatas a transformantes fueron seleccionadas en medio LB adicionado con ampicilina 100 µg/ml y tetraciclina 40 µg/ml, posteriormente se verificó la transformación mediante PCR, usando los oligonucleótidos hptBTHFw y hptBTHRv con una TM de 61°C, tiempo de extensión de 1 min y 25 ciclos de amplificación; esperando amplificar al gen *hptB* del vector pSR658-H [360 pb] (ver Fotografía 18).

Al verificar el éxito de la transformación se obtuvieron las cepas SU202-GH, SU202-LH y SU202-RH las cuales servirían para probar la interacción entre GacS2-HptB, LadS-HptB y RetS-HptB, respectivamente.



Fotografía 18.- Gel de electroforesis; Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: Control positivo, PCR de vector pSR658-H; Carril 3: Control negativo, PCR de ADN plasmídico de cepas SU202-G, SU202-L y SU202-R; Carriles 4-6: PCR de SU202-G candidata a transformante con pSR658-H; Carriles 7-9: PCR de SU202-L candidata a transformante con pSR658-H; Carriles 10-12: PCR de SU202-R candidata a transformante con pSR658-H. Todas las PCR usaron los oligonucleótidos hptBTHFw y hptBTHRv.

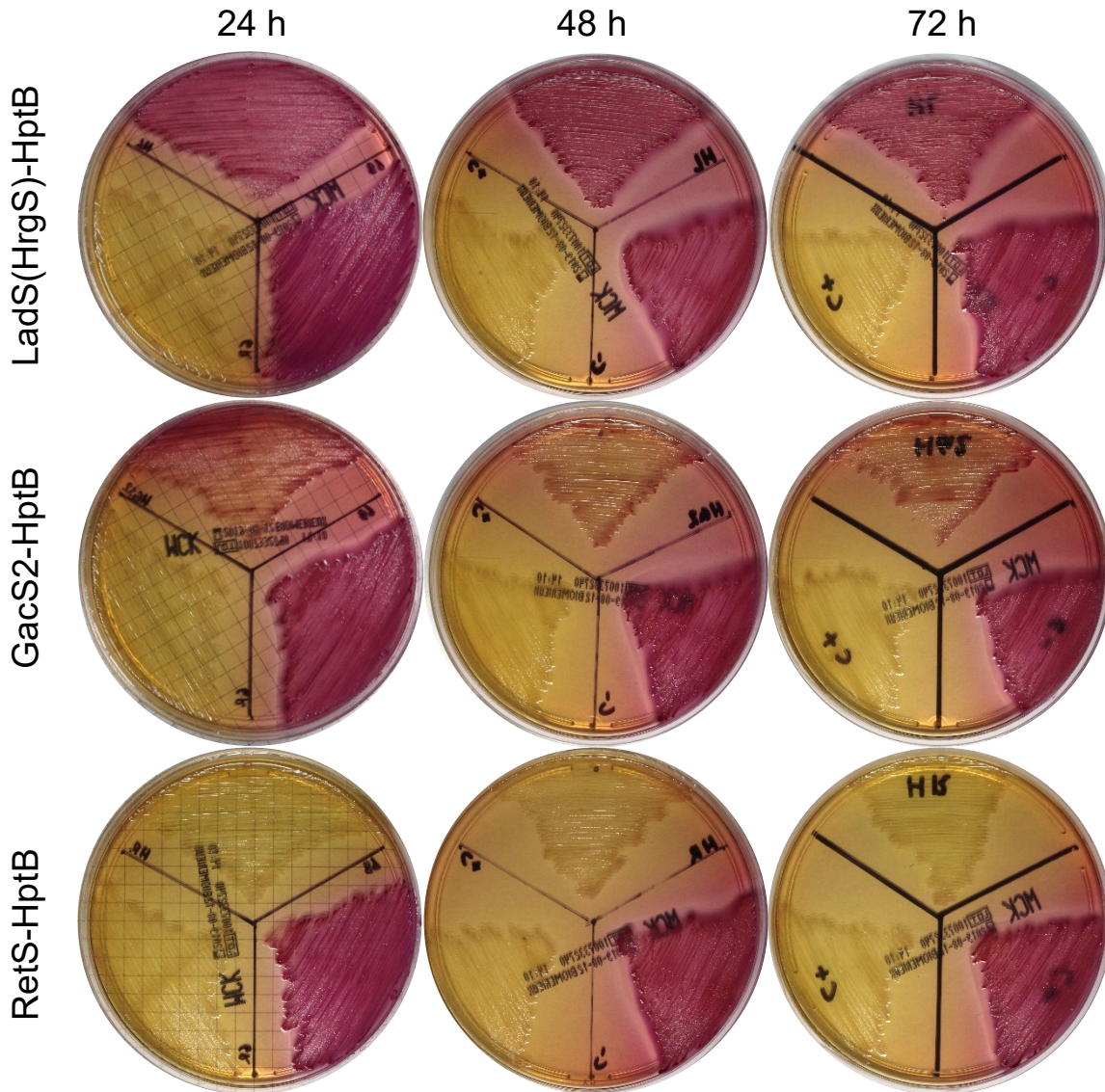
#### 7.4.4. Resultados de la interacción.

Ya que la interacción positiva reprime la transcripción de *lacZ*, las cepas que interactúen en este sistema tendrán fenotipo lactosa negativo y las cepas que no interactúen por consecuencia, tendrán fenotipo lactosa positivo.

Para determinar la interacción, se inocularon las cepas SU202-GH, SU202-LH y SU202-RH en medio MacConkey agar, Las placas fueron incubadas a 37°C, se fotodocumentaron los resultados a las 24, 48 y 72 h (ver Fotografía 19).

Las placas fueron divididas en 3 segmentos, en cada segmento se inocularon:

- Control positivo, el cual consta de la cepa SU202-GR (GacS-RetS) cuya interacción ha sido comprobada (Sánchez Cuapio, 2012).
- Control negativo, el cual consta de la cepa SU202-89 con los vectores pSR658 y pSR659 sin fusiones.
- Cepa prueba.



Fotografía 19.- Resultado del ensayo de interacción doble híbrido LexA, Las placas corresponden a medio MacConkey. Cada placa está dividida en tres partes, en la parte superior se encuentra la cepa prueba, en la inferior izquierda el control positivo y en la parte inferior derecha se encuentra el control negativo. Las columnas corresponden a la interacción en prueba, las filas al tiempo de incubación a la hora de la fotodocumentación información publicada en (López-Pliego et al., 2022).

Según los resultados obtenidos con este ensayo genético, existe interacción entre las proteínas RetS y HptB, pero no entre LadS(HrgS) y HptB (López-Pliego et al., 2022).

En el caso particular de la interacción entre GacS2 y HptB, se puede apreciar que hay un fenotipo parcial (lactosa +/-), lo que es poco concluyente para determinar dicha interacción.

## 8. Discusión y conclusiones.

### 8.1. HptB y la biosíntesis de alginato

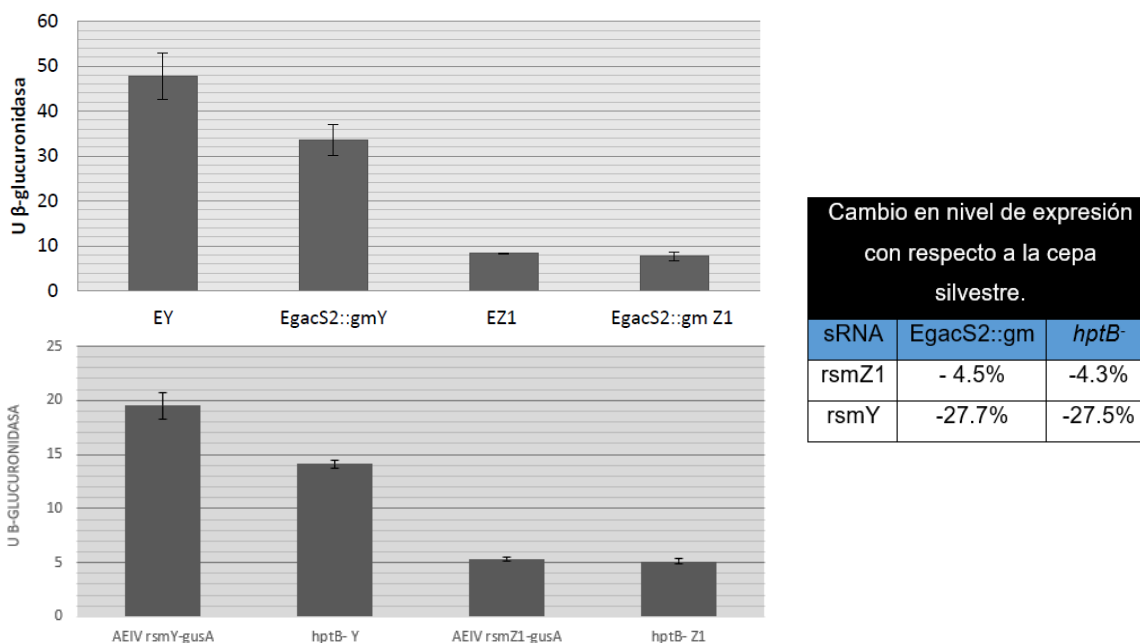
Tal como se exhibe en las imágenes 13-15, HptB desempeña un rol fundamental en el proceso de biosíntesis del alginato en calidad de un regulador positivo, sin que ello conlleve a una abolición íntegra de la producción del polímero.

Una observación de interés radica en que la cepa sobreexpresada no solamente reinstaura los niveles de alginato, sino que los acrecienta, sugiriendo que la biodisponibilidad de HptB guarda una correlación directamente proporcional con la transducción de una señal positiva.

### 8.2. HptB y el sistema RSM

Según los resultados obtenidos, HptB regula negativamente a *rsmZ2*, a la alta a *rsmY*, y no regula a *rsmZ1*.

Al comparar el perfil Rsm de la mutante *hptB*<sup>-</sup> con el de diversas histidín cinasas relacionadas se ha encontrado que la cepa mutante en GacS2 (Hernández, 2019) comparte un perfil muy similar (ver Gráfica 2).



Gráfica 2.- Arriba, perfil rsm de mutante *EgacS2::gm*, tomado de (Hernández, 2019), abajo perfil rsm de mutante *hptB*<sup>-</sup>, (este trabajo).

Asimismo, es posible apreciar que las mutantes que manifiestan el fenotipo de disminución en la producción de alginato (GacS, RetS, GacS2, HptB) reducen de manera simultánea la transcripción de *rsmY* (ver Tabla 5), lo que sugiere que *rsmY* representa el principal regulador de índole positiva para la síntesis de alginato y posiblemente el sRNA con mayor afinidad hacia GacA, lo cual concuerda con lo consignado por (Rosales Cruz, 2018) en la mutante *rsmY*.

Diferencia fenotípica con respecto a la cepa silvestre				
Mutante	Alginato	<i>rsmZ1</i>	<i>rsmZ2</i>	<i>rsmY</i>
LadS	∧	∧	∧	∧
GacS	∨	∨	∨	∨
RetS	∨	∨	∨	∨
GacS2	∨	=	N/D	∨
HptB	∨	=	∧	∨
GacS/LadS	∨	∨	∨	∨

∨: Disminuído  
 ∧: Aumentado  
 =: Sin Cambio  
 N/D: Sin datos

Tabla 5.- perfil RSM de las mutantes trabajadas en el laboratorio con respecto a la cepa silvestre, en borde grueso los parámetros con efecto similar a *hptB* (Acocal-Gonzalez, 2020; Hernandez, 2019; López-Pliego et al., 2018; Reyes-Nicolau, 2018; Rosales Cruz, 2018).

Dentro del grupo de mutantes que exhiben fenotipo de disminución en la síntesis de alginato, tanto GacS como RetS reducen la transcripción de *rsmZ1*, mientras que GacS2 y HptB no lo hacen, este resultado es importante para soportar la hipótesis de que la vía GacS2/HptB de regulación es una vía alternativa a la vía GacS/GacA que al igual que esta, resulta en la regulación positiva de RsmY y la biosíntesis de alginato, pero mediante otros efectores no relacionados podría modular algunos sRNA de manera diferente, como es en el caso de *rsmZ2*. Esta vía alternativa ha sido propuesta en otras ocasiones en el modelo de *P. aeruginosa* (Bordi et al., 2010; Francis et al., 2018).

### 8.3. Interacción entre HptB y las histidín cinasas.

En el ensayo de doble híbrido LexA se constató que HptB establece una interacción con RetS mientras que no se evidenció tal conexión con LadS(HrgS), lo cual fortalece el carácter de regulador negativo de LadS(HrgS) y la separa a esta histidín cinasa de la vía de señalización alternativa dependiente de HptB.

Adicionalmente se observó que HptB podría estar interactuando con GacS2, y a pesar de que el ensayo de doble híbrido no demostró una interacción clara, la congruencia entre el perfil de expresión de los genes *rsm* de HptB y el de GacS2, así como la vía de señalización establecida en *P. aeruginosa*, son indicios sólidos de que existe una interacción.

Gracias a los trabajos de (Acocal-Gonzalez, 2020; Sánchez Cuapio, 2012) se sabe que GacS interactúa con RetS pero no con LadS(HrgS), y con la información generada en este trabajo el esquema de señalización en *A. vinelandii* quedaría de la siguiente manera:

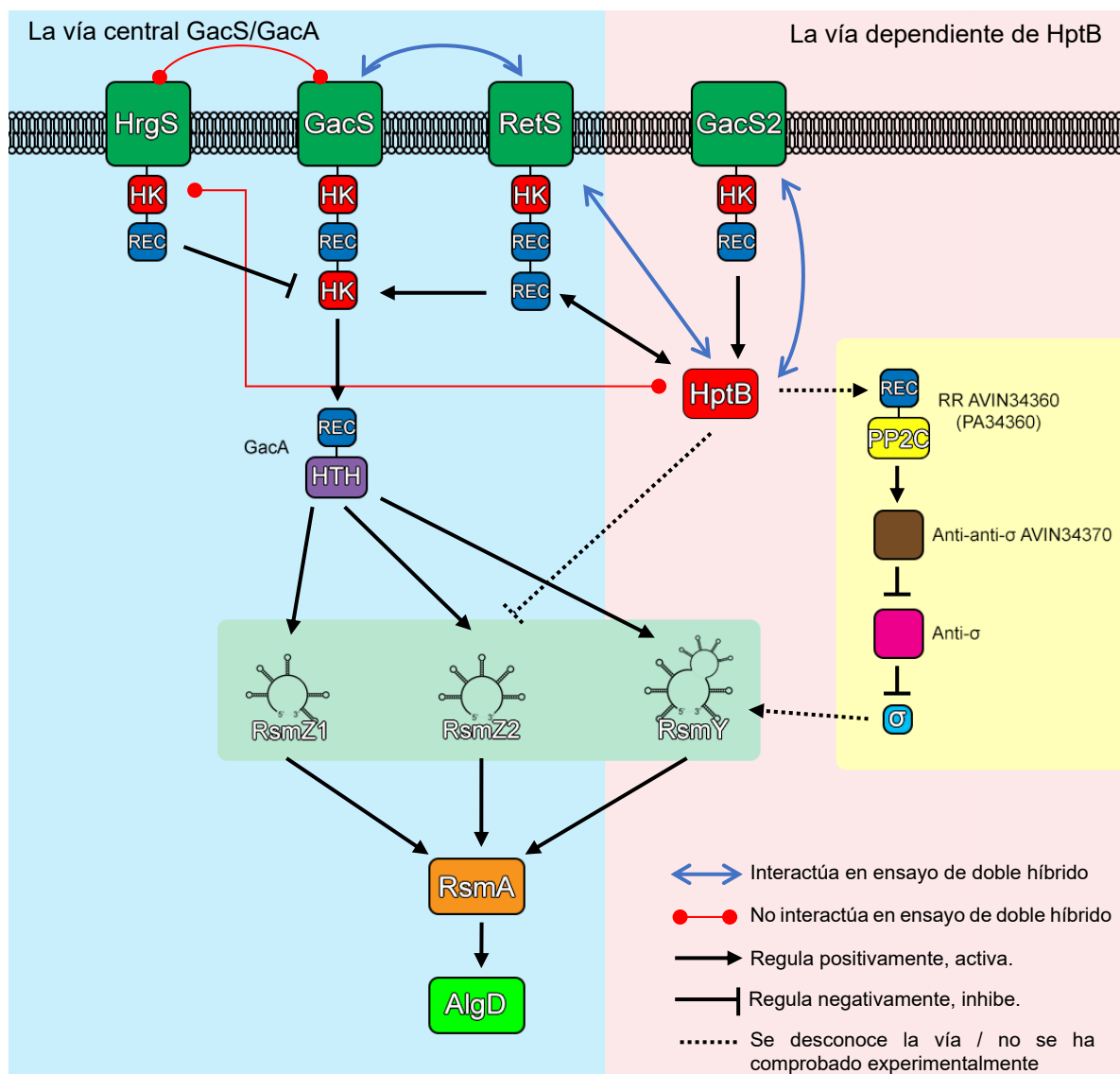


Fig. 18.- Esquema propuesto de regulación de la biosíntesis de alginato, con enfoque en la vía dependiente de HptB, la región en amarillo no se ha comprobado experimentalmente y corresponde a *P. aeruginosa*, modificado de Francis et al, 2018, con base en los hallazgos del laboratorio.

## 9. Perspectivas

Vale la pena cuantificar la cantidad de alginato en la mutante *hptB*<sup>-</sup> para tener datos comparables con otras mutantes, de la misma forma, realizar la cuantificación de los dobles híbridos generados en este trabajo resultaría en información valiosa.

Se propone realizar una doble mutante HptB-GacA para determinar la jerarquía entre la vía GacS/GacA y la vía HptB en el sistema de biosíntesis de alginato.

De igual manera, se propone realizar ensayos de *pull-down* entre RetS-HptB lo cual solidificaría la interacción, y aclararía el punto de inflexión entre las vías GacS/GacA y la dependiente de HptB, asimismo, se producirían datos importantes en esta interacción al obtener una mutante AVIN\_34360.

Para seguir aclarando la vía de señalización dependiente de HptB se sugiere realizar ensayos de interacción entre HptB y AVIN\_34360.

## 10. Bioética

Debido a que todas las cepas trabajadas en el laboratorio son de nivel BSL-1, no existe alguna norma especial que sea aplicable.

Al finalizar cada procedimiento, se dispondrá de los desechos biológicos mediante técnicas de esterilización con calor húmedo, posteriormente el Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas se hará cargo de los residuos ya esterilizados de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-010-SCT2/2009.

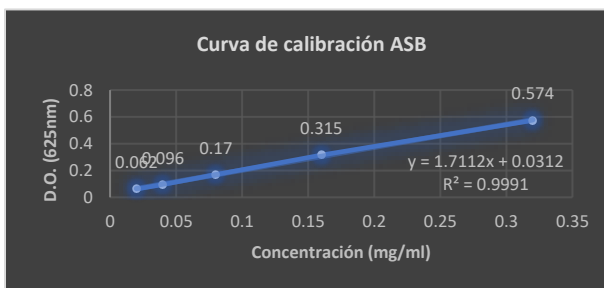
## 11. Anexos

### 11.1. Anexo 1 – Resultados de la cuantificación de la $\beta$ -glucuronidasa.

#### 11.1.1. Curva de calibración albúmina sérica bovina (ASM):

Curva de calibración			
V Estándar ASB (ul)	V H <sub>2</sub> O (ul)	Conc. Final (μg/ul)	D.O. <sub>625nm</sub>
2	198	0.02	0.062
4	196	0.04	0.096
8	192	0.08	0.17
16	184	0.16	0.315
32	168	0.32	0.574

Concentración del estándar ASB = 2 μg/ul



#### 11.1.2. Cuantificación de proteína por método de Lowry.

Resultados cuantificación de proteína			
Muestra	D.O. <sub>(625nm)</sub>	V (ul)	Proteína (μg/ul)
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i> - 1	0.098	20	0.039036933
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i> - 2	0.101	20	0.040790089
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i> - 3	0.152	20	0.070593735
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Z1 - 1	0.159	20	0.074684432
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Z1 - 2	0.164	20	0.077606358
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Z1 - 3	0.194	20	0.095137915
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i> - 1	0.091	5	0.034946237
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i> - 2	0.069	5	0.022089762
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i> - 3	0.070	5	0.022674147
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Z2 - 1	0.092	5	0.035530622
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Z2 - 2	0.095	5	0.037283777
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Z2 - 3	0.092	5	0.035530622
AEIV <i>rsmY-gusA</i> - 1	0.142	20	0.064749883
AEIV <i>rsmY-gusA</i> - 2	0.193	20	0.09455353
AEIV <i>rsmY-gusA</i> - 3	0.218	20	0.10916316
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Y - 1	0.207	20	0.102734923
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Y - 2	0.185	20	0.089878448
<i>hptB</i> <sup>-</sup> Y - 3	0.217	20	0.108578775
Mock-1	0.221	20	0.110916316
Mock-2	0.231	20	0.116760168
Mock-3	0.227	20	0.114422627

$$Proteína = \frac{D.O._{625} - b}{m}$$

Dónde:

$b$  = intersección de concentración con D.O.

$m$  = pendiente de la recta

### 11.1.3. Cuantificación de la actividad β-glucuronidasa

Resultados actividad β-glucuronidasa						
Muestra	V Rx (ul)	t Rx (min)	t Rx (base 10)	D.O. (405nm)	Proteína (μg/ml)	Actividad (U miller)
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i> - 1	20	6.29	6.48	0.487	39.036933146	5.3478075
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i> - 2	20	6.29	6.48	0.539	40.790088827	5.6644351
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i> - 3	20	6.29	6.48	0.815	70.593735390	4.9489600
<i>hptB</i> Z1 - 1	20	6.29	6.48	0.926	74.684431978	5.3150016
<i>hptB</i> Z1 - 2	20	6.29	6.48	0.855	77.606358111	4.7227103
<i>hptB</i> Z1 - 3	20	6.29	6.48	1.187	95.137914914	5.3483471
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i> - 1	5	2.51	2.85	1.46	34.946236559	162.8789924
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i> - 2	5	2.51	2.85	0.974	22.089761571	171.9018534
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i> - 3	5	2.51	2.85	0.852	22.674146798	146.4944836
<i>hptB</i> Z2 - 1	5	2.51	2.85	1.907	35.530621786	209.2476147
<i>hptB</i> Z2 - 2	5	2.51	2.85	2.09	37.283777466	218.5440613
<i>hptB</i> Z2 - 3	5	2.51	2.85	2.1	35.530621786	230.4247461
AEIV <i>rsmY-gusA</i> - 1	20	3.10	3.16	1.59	64.749883123	21.5858200
AEIV <i>rsmY-gusA</i> - 2	20	3.10	3.16	2.114	94.553529687	19.6533982
AEIV <i>rsmY-gusA</i> - 3	20	3.10	3.16	2.14	109.163160355	17.2324922
<i>hptB</i> Y - 1	20	3.10	3.16	1.583	102.734922861	13.5448198
<i>hptB</i> Y - 2	20	3.10	3.16	1.433	89.878447873	14.0152563
<i>hptB</i> Y - 3	20	3.10	3.16	1.83	108.578775129	14.8155087
Mock-1	20	15.00	15.00	0.191	110.916316036	0.3188924
Mock-2	20	15.00	15.00	0.185	116.760168303	0.2934156
Mock-3	20	15.00	15.00	0.181	114.422627396	0.2929361

$$Actividad \beta glucuronidasa_{U \text{ miller}} = \frac{D. O_{.405} \times 1000}{0.018 \times t Rx_{min} \times V Rx_{ul} \times Proteína_{\mu g/ml}}$$

### 11.1.4. Pruebas estadísticas

#### 11.1.4.1. Barras de error:

Muestra	$\bar{X}$	$\sigma$	n	$\sigma_M$
AEIV <i>rsmZ1-gusA</i>	5.320400851	0.35852409	3	0.20699398
<i>hptB</i> Z1	5.128686316	0.35198066	3	0.20321613
AEIV <i>rsmZ2-gusA</i>	160.4251098	12.8802082	3	7.4363917
<i>hptB</i> Z2	219.405474	10.6148127	3	6.12846494
AEIV <i>rsmY-gusA</i>	19.49057014	2.18122687	3	1.25933192
<i>hptB</i> Y	14.12519493	0.64243867	3	0.37091214
AEIV "Mock"	0.301748047	0.01484938	3	0.00857329

### 11.1.4.2. Prueba ANOVA de una vía:

Hipótesis nula ( $H_0$ ) = La media de todos los grupos es igual.

Hipótesis alternativa ( $H_1$ ) = La media de uno de los grupos es diferente

Presunciones:

- Las varianzas entre cada grupo deben ser aproximadamente iguales.
- Los datos entre cada grupo deben ser aproximadamente distribuidos normalmente.

Parámetros de la prueba:

- Nivel de significancia ( $\alpha$ ) = 0.05 (5%)
- Tipo de efecto = distribución F

Fusión	Z1		Z2		Y	
Grupo	AEIV	HptB	AEIV	HptB	AEIV	HptB
Actividad	5.3478	5.3150	162.8790	209.2476	21.5858	13.5448
	5.6644	4.7227	171.9019	218.5441	19.6534	14.0153
	4.9490	5.3483	146.4945	230.4247	17.2325	14.8155
Sesgo	-0.3420	-1.7146	-0.8262	0.3628	-0.3341	0.7475
Normalidad	1.0000	0.2068	0.9973	1.0000	1.0000	0.9992
Promedio	5.3204	5.1287	160.4251	219.4055	19.4906	14.1252
F statistic	0.4368		37.4624		16.7028	
p-value	0.5448		0.0036		0.0150	
p-value / $\alpha$	p-value > $\alpha$		p-value < $\alpha$		p-value < $\alpha$	
Resultado	Se acepta $H_0$		Se rechaza $H_0$		Se rechaza $H_0$	
Interpretación	No estadísticamente significativo		Es estadísticamente significativo		Es estadísticamente significativo	
Riesgo error tipo 1	Alto 54.48%		Bajo 0.36%		Bajo 1.5%	

R Code:

```
run_anova <- function(value, group) {
  my.dataframe <- data.frame(value = value, group1 = rep(group, each = 3))
  res.aov <- aov(value ~ group1, data = my.dataframe)
  summary(res.aov)
}
value1 <- c(4.94896, 5.34781, 5.66444, 4.72271, 5.31500, 5.34835)
group1 <- c("AEIV Z1", "HptB- Z1")
run_anova(value1, group1)
value2 <- c(146.49448, 162.87899, 171.90185, 209.24761, 218.54406, 230.42475)
group2 <- c("AEIV Z2", "HptB- Z2")
run_anova(value2, group2)
value3 <- c(17.23249, 19.65340, 21.58582, 13.54482, 14.01526, 14.81551)
group3 <- c("AEIV Y", "HptB- Y")
run_anova(value3, group3)
```

## 12. Índice de figuras, tablas y fotografías.

Fig. 1.- Micrografía electrónica de barrido de <i>Azotobacter vinelandii</i> . ....	5
Fig. 2.- Estructura química del alginato .....	6
Fig. 3.- Modelo de la estructura clásica de los SDC .....	8
Fig. 4.- Modelo de la estructura de fosforelevo. ....	9
Fig. 5.- Esquema general de la biosíntesis microbiana de alginato.....	10
Fig. 6.- Esquema de la regulación que ejerce GacS/GacA sobre la transcripción de los pequeños RNA del sistema Rsm en <i>A. vinelandii</i> .....	11
Fig. 7.- Mecanismo de des-represión de <i>algD</i> mRNA por el sistema Rsm.....	12
Fig. 8.- Estructuras de tallo y asa de los pequeños RNA de la familia RSM .....	13
Fig. 9.- Esquema de la vía de regulación de RsmY alterna a GacS/GacA.....	14
Fig. 10.- Esquema de proteínas en <i>A. vinelandii</i> y homólogos en <i>P. aeruginosa</i> ..	15
Fig. 11.- Esquema del operón putativo donde se encuentra <i>hptB</i> .....	16
Fig. 12.- Histidín cinasas que no poseen dominio transmisor final.....	17
Fig. 13.- Esquema del mecanismo de escisión del casete de gentamicina y mapa del gen <i>hptB</i> cromosomal de la cepa <i>hptB::FRT</i> pre y post escisión. ....	41
Fig. 14.- Esquema de la estructura de los vectores pUMA rsm.....	49
Fig. 15.- El homo-dímero reprime al operador silvestre en SU101.....	52
Fig. 16.- El hetero-dímero reprime al operador híbrido en la cepa SU202 .....	53
Fig. 17.- Acercamiento del sitio Sacl en donde se insertó <i>hptB</i> en pSR658 .....	54
Tabla 1.- Lista de vectores utilizados. ....	21
Tabla 2.- Lista de material biológico utilizado.....	22
Tabla 3.- Lista de oligonucleótidos utilizados. ....	23
Tabla 4.- Lista de medio de cultivo utilizados .....	23
Tabla 5.- perfil RSM de las mutantes trabajadas en el laboratorio .....	59
Fotografía 1.- Verificación del amplicón <i>hptB</i> PCR y restricción .....	34
Fotografía 2.- Verificación de pJET1.2- <i>hptB</i> ensayo de restricción.....	35
Fotografía 3.- Verificación de pJET- <i>hptB::FRT</i> ensayo de restricción.....	38

Fotografía 4.- Verificación de la cepa hptB::FRT .....	39
Fotografía 5.- Comparación de fenotipo AEIV y hptB::FRT .....	39
Fotografía 6.- Verificación de transconjugantes hptB::FRT con pFLPe4 .....	41
Fotografía 7.- Ensayo de contra-selección, escisión del casete de GEN. ....	42
Fotografía 8.- Verificación de la cepa hptB- después de la escisión por PCR. ....	43
Fotografía 9.- Verificación de pGEMHptBTH- por ensayo de restricción .....	44
Fotografía 10.- Verificación de pUHptBTH+ por PCR .....	46
Fotografía 11.- Verificación de pUHptBTH+ por ensayo de restricción. ....	46
Fotografía 12.- Verificación de la transformación cepas hptB <sup>C</sup> y hptB <sup>+</sup> .....	47
Fotografía 13.- Comparación 24hrs, cepas AEIV, hptB <sup>-</sup> , hptB <sup>C</sup> y hptB <sup>+</sup> . ....	48
Fotografía 14.- Comparación 48hrs, cepas AEIV, hptB <sup>-</sup> , hptBC y hptB <sup>+</sup> . ....	48
Fotografía 15.- Comparación 72hrs, cepas AEIV, hptB <sup>-</sup> , hptBC y hptB <sup>+</sup> . ....	48
Fotografía 16.- Verificación cepas hptB-Z1, hptB-Z2 y hptB-Y por PCR .....	50
Fotografía 17.- Verificación pSR658-H por ensayo de restricción.....	55
Fotografía 18.- Verificación de cepas SU202-GH, SU202-LH y SU202-RH.....	56
Fotografía 19.- Resultado del ensayo de interacción doble híbrido LexA .....	57
Mapa 1.- Vector pJET1.2-hptB .....	35
Mapa 2.- Vector pFZEGm .....	36
Mapa 3.- Vector pJET-hptB::FRT .....	37
<i>Mapa 4.- Vector pFLPe4 .....</i>	<i>40</i>
Mapa 5.- Vector pUMAtac Km .....	43
Mapa 6.- Vector pGEMHptBTH-.....	44
Mapa 7.- Vector pUHptBTH+ .....	45
Mapa 8.- Vector pSR659 .....	53
Mapa 9.- Vector pSR658 .....	53
Mapa 10.- Vector pSR658-H .....	54

## 13. Bibliografía

- Acocal-Gonzalez, V. (2020). *Estudio genético funcional de la interacción de las cinasas GacS y LadS en Azotobacter vinelandii*. Benemémrita Universidad Autónoma de Puebla.
- Barba-Ostria, C. A. (2014). Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP*, 17(1), 62–76. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70320-1](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70320-1)
- Beale, J. M., & Foster, J. L. (1996). Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry*, 35(14), 4492–4501. <https://doi.org/10.1021/bi951922v>
- Bhuwan, M., Lees, H. J., Pengs, H. L., & Chang, H. Y. (2012). Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1903–1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.256586>
- Bordi, C., Lamy, M. C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., ... Filloux, A. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 76(6), 1427–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x>
- Boyer, H. W., & Roulland-dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 41(3), 459–472. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90288-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90288-5)
- Buschiazzo, A., & Trajtenberg, F. (2019, September 8). Two-component sensing and regulation: How do histidine kinases talk with response regulators at the molecular level? *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091018-054627>
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and  $\sigma$ S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6787–6793. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001>
- Castañeda, Miguel, Espín, G., & López-Pliego, L. (2016). *Azotobacter vinelandii* small RNAs: Their roles in the formation of cysts and other processes. In *Non-coding RNAs and Inter-kingdom Communication* (pp. 67–82). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39496-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39496-1_4)

- Castañeda, Miguel, Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2624–2628. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2624-2628.2000>
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., ... Bordi, C. (2016). The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genetics*, 12(5), e1006032. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006032>
- Choi, K. H., Mima, T., Casart, Y., Rholl, D., Kumar, A., Beacham, I. R., & Schweizer, H. P. (2008). Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1064–1075. <https://doi.org/10.1128/AEM.02430-07>
- Coxca - Isidro, M. I. (2015). *Estudio del efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato en Azotobacter vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 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.
- Daines, D. A., Granger-Schnarr, M., Dimitrova, M., & Silver, R. P. (2002). Use of LexA-based system to identify protein-protein interactions in vivo. *Methods in Enzymology*, 358, 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)58087-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)58087-3)
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(1), 21–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.21>
- Dmitrova, M., Younès-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., & Granger-Schnarr, M. (1998). A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 257(2), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s004380050640>
- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2002). Alginates from Algae. In E. J. Vandamme, S. De Baets, & A. Steinbüchel (Eds.), *Biopolymers Online*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol6008>
- Eberhart, L. J., Knutson, C. M., & Barney, B. M. (2016). A methodology for markerless genetic modifications in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1595–1604. <https://doi.org/10.1111/jam.13091>
- Francis, V. I., Waters, E. M., Finton-James, S. E., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A. R., & Porter, S. L. (2018). Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence

- in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04640-8>
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007, February 16). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- George, M., & Abraham, T. E. (2006, August 10). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>
- Groisman, E. A. (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095331>
- Haas, D., & Défago, G. (2005, April). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. *Nat Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rehm, B. H. A. (2013, November). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>
- Heeb, S., Kuehne, S. A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M. D., Haas, D., ... Williams, P. (2006). Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *Journal of Molecular Biology*, 355(5), 1026–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.045>
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0>
- Hernandez, L. (2019). *ESTUDIO DEL PAPEL DEL GEN AVIN\_15460 (gacS2) INVOLUCRADO EN LA SÍNTESIS DE ALGINATOS EN A. VINELANDII*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Hsu, Jye L., Chen, H. C., Peng, H. L., & Chang, H. Y. (2008). Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9933–9944.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M708836200>

- Hsu, Jye Lin, Chen, H. C., Peng, H. L., & Chang, H. Y. (2008). Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9933–9944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708836200>
- Jean-Pierre, F., Tremblay, J., & Déziel, E. (2017). Broth versus surface-grown cells: Differential regulation of RsmY/Z small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB System. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02168>
- JENSEN, H. L. (1954). The Azotobacteriaceae. *Bacteriological Reviews*, 18(4), 195–214. <https://doi.org/10.1128/membr.18.4.195-214.1954>
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T., & Haas, D. (2008, November 30). Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x>
- Larsen, B., & Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydrate Research*, 17(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82536-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82536-7)
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., ... Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*, 60(9), 670–680. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>
- López-Pliego, L., González-Acocal, V., García-González, D. L., Reyes-Nicolau, J. I., Sánchez-Cuapio, Z., Meneses-Carbajal, A. S., ... Castañeda, M. (2022). HrgS (Avin\_34990), a novel histidine-kinase related to GacS, regulates alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 369(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac024>
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Ma, C. H., Kwiatek, A., Bolusani, S., Voziyanov, Y., & Jayaram, M. (2007). Unveiling hidden catalytic contributions of the conserved His/Trp-III in tyrosine recombinases: assembly of a novel active site in Flp recombinase harboring alanine at this position. *Journal of Molecular Biology*, 368(1),

183. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.02.022>

- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., ... Castañeda, M. (2012a). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000334244>
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., ... Castañeda, M. (2012b). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000334244>
- Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018, April 1). *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology (United Kingdom)*. Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>
- Page, W. J., & Sadoff, H. L. (1976). Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 125(3), 1080–1087. <https://doi.org/10.1128/jb.125.3.1080-1087.1976>
- Page, W. J., & Von Tigerstrom, M. (1979). Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 139(3), 1058–1061. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/479104>
- Rehm, B. H. A. (2010, August). Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. Nat Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006, September 25). Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x>
- Reyes-Nicolau, J. (2018). *Estudio del efecto regulador de las cinasas RetS y LadS sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm en Azotobacter vinelandii*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rosales Cruz, A. (2018). *Estudio del efecto de la mutación múltiple de los RNAs reguladores del sistema Rsm en la producción de alginato y PHB en Azotobacter vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Sánchez Cuapio, Z. (2012). *Estudio de la cascada de regulación GacS/RetS/LadS/GacA-rsmZ en Azotobacter vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla Puebla.
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019, January 18). To fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. (I. Cann, Ed.), *Applied and*

*Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>

Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>

Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017, November 7). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., & Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>

Valentini, M., Laventie, B. J., Moscoso, J., Jenal, U., & Filloux, A. (2016). The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility. *PLoS Genetics*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006354>

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., Decruz, E., Noyer-Weidner, M., ... Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3469. <https://doi.org/10.1093/NAR/17.9.3469>

Xu, L., Venkataramani, P., Ding, Y., Liu, Y., Deng, Y., Yong, G. L., ... Liang, Z. X. (2016). A cyclic di-GMP-binding adaptor protein interacts with histidine kinase to regulate two-component signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 291(31), 16112–16123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.730887>

Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016, September 25). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>