



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Lic. En Biomedicina

Eje terminal: Microbiología

Laboratorio de Genética Molecular  
Microbiana



## TESIS

“Estudio del efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato en *Azotobacter vinelandii*”

Tesis para obtener el título de:  
LICENCIADA EN BIOMEDICINA

Presenta  
MARÍA INÉS ISIDRO COXCA

Bajo la dirección de:  
D. en C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO

Puebla, Puebla

Junio 2015

Esta tesis fue realizada con el apoyo de Conacyt, dentro del proyecto CB-2009/129525 a cargo del D. C. Miguel Castañeda Lucio, en el periodo de enero -junio 2014. Y con el apoyo de la SEP con la beca de Titulación.

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas.*

*Mario Benedetti*

## **Agradecimientos:**

*A mis padres, gracias por apoyarme y por creer siempre en mí, por la confianza y por dejarme intentar hacer cosas nuevas. A mi hermanito, quiero que hagas cosas grandes, jamás digas que no puedes y nunca dejes de hacer lo que te gusta. Los amo.*

*A mi inseparable Aldo, gracias por ser mi apoyo, mi confidente, y por siempre estar ahí cuando te necesito, siguiendo mis locuras y escuchando todo aquello que me preocupa.*

*Al doctor Miguel, por todo lo que me ha enseñado, tanto en el laboratorio como en la vida, gracias por impulsarnos a ser mejores, a buscar nuevos caminos, y ahora por acompañarme en esta nueva aventura que estoy emprendiendo. Es usted un gran tutor.*

*A los Miguelandii's, gracias por todos los momentos compartidos, por las charlas ñoñas y las de la vida personal. No tengo palabras para describir lo bien que es trabajar con ustedes. Lili, muchas gracias por ser una amiga, por todo lo que me enseñaste en el lab y en la vida, te admiro mucho. A Vale, (el mejor equipo) y a Flor, gracias por todos los momentos compartidos, son chicas muy listas, las extraño. A Lau, por todos los momentos llenos de risa, hacías el trabajo diario muy agradable, siempre sé así, te echo de menos. A Gis y Chucho, por todas las ocurrencias, los extraño. También a Pau, Gama, Thaly, Gabi y Vicky. Y cómo olvidar a Jean, gracias por todo lo que me enseñaste.*

*A las biomes 2009, Chely, Almita, Angie y Sarita, gracias por hacer amenas las clases diarias, las extraño.*

*A mis amigos Cynthia, Kap y Ricardo, mis tres fisiólogos favoritos, gracias por todas las aventuras y experiencias compartidas desde que iniciamos la universidad, los extraño mucho.*

*A los doctores Ricardo Carreño y Luis Ernesto Fuentes por sus aportaciones a este escrito.*

*Espero no estar olvidando a alguien, si fuera así, me disculpo, muchas gracias por hacer de estos años una hermosa experiencia.*

# Índice

Resumen.....	1
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>4</b>
2.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	4
2.2 Ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	5
2.3 Alginato .....	6
2.4 Biosíntesis del alginato en <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	6
2.5 Genética de la biosíntesis del alginato.....	9
2.6 Sistemas de dos componentes .....	10
2.7 Sistema de Doble Componente GacS/GacA.....	11
2.8 Sistema de Regulación Post-transcripcional Rsm.....	12
2.9 RgsA .....	13
2.10 Promotor <i>tac</i> .....	14
2.11 Transducción de señales vía Gac/Rsm en <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	16
<b>3. Antecedentes directos.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Planteamiento del problema.....</b>	<b>22</b>
<b>5. Hipótesis .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>23</b>
6.1 General.....	23
6.2 Particulares.....	23
6.3 Específicos.....	23
<b>7. Metodología.....</b>	<b>24</b>
8.1 Tipo de estudio.....	24
8.2 Esquema de trabajo.....	24
8.3 Metodología.....	25

<b>8. Desarrollo experimental y resultados .....</b>	<b>26</b>
<b>9. Discusión de Resultados .....</b>	<b>38</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>11. Perspectivas del trabajo .....</b>	<b>45</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>46</b>
Cepas y plásmidos.....	46
Técnicas y medios de cultivo .....	49
Figuras .....	60
<b>13. Referencias.....</b>	<b>63</b>

## Resumen:

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria de interés industrial, entre otras cosas porque produce alginato, un polímero utilizado en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica por sus propiedades como agente emulsificante, espesante y formador de geles, por estas razones, el estudio de su biosíntesis y regulación es de gran interés actualmente. La síntesis del polímero está regulada a nivel post-transcripcional por un sistema de dos componentes GacS/GacA y un sistema Rsm, los cuales actúan en conjunto para permitir la síntesis del polímero. Dentro del sistema Rsm participan una serie de pequeños RNAs reguladores (ocho de la subfamilia RsmZ y uno solo de la familia RsmY), que tienen un papel de regulación positivo en la síntesis del alginato. De estos, se ha encontrado a través del análisis de sus respectivas cepas mutantes, que RsmZ1 y RsmZ2 actúan claramente en la síntesis, sin embargo, falta dilucidar el papel del resto de los pequeños RNAs reguladores Rsm, el cual no es claro con el análisis de las mutantes respectivas. Con el propósito de estudiar el efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores sobre la síntesis de alginato, se utilizó el sistema de expresión *melA::tacKm* recientemente creado en el laboratorio, a la vez que se probó su funcionamiento. Los genes que codifican para los pequeños RNAs Rsm fueron clonados delante del promotor *tac* en el plásmido pUMA*tacKm*, estos fueron integrados en el genoma de la cepa WT, y después estas cepas fueron mutadas en el gen *gacA*, se indujo la expresión de los pequeños RNAs reguladores usando IPTG, y se analizó por *Northern blot*, también se analizó el funcionamiento del sistema mediante la introducción de un gen reportero *gus* clonado en el sistema y el análisis de su actividad  $\beta$ -glucuronidasa. La transcripción dirigida por el promotor *tac* del sistema *melA::tacKm* en *A. vinelandii* no fue suficiente para “sobre-expresar” los genes clonados bajo su promotor por lo que no fue posible observar el efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato utilizando el sistema *melA::tacKm*.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria de vida libre perteneciente a las gammaproteobacterias, es Gram negativa, en forma de coco o bacilo y es capaz de fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas en un medio libre de nitrógeno y con una fuente orgánica de carbono. Para conciliar su estilo de vida aeróbico con los procesos sensibles al oxígeno, *A. vinelandii* está especializada en su complemento de proteínas respiratorias. Es capaz de producir alginato, un polímero que entre otras cosas, la protege del exceso de oxígeno exógeno (Setubal *et al.*, 2009). Los alginatos son un grupo de polisacáridos naturales compuestos por ácido manurónico y su epímero el ácido gulurónico unidos por enlaces  $\beta$  (1-4). Los alginatos tienen un gran interés comercial porque presentan un amplio rango de aplicaciones en industrias como la alimenticia, la cosmética y la farmacéutica, como estabilizantes, espesantes y agentes formadores de geles (Clementi, 1997), debido a estas aplicaciones potenciales, el estudio de los mecanismos involucrados en la síntesis de este polímero así como su regulación son de gran interés. El grupo de genes de la biosíntesis de alginato está organizado en al menos cuatro unidades transcripcionales, *PalgD*, *Palg8-alg44-algK*, *PalgG-X-L-V-I-F-A* y *PalgC* (Muhammadi, 2007). El gen *algD* que codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, proteína clave para la síntesis del polímero, se encuentra altamente regulado, con los datos que se han obtenido hasta ahora se sabe que la regulación del gen *algD* está controlada al nivel post-transcripcional por el sistema Gac-Rsm (el sistema de dos componentes GacS/GacA y el sistema de regulación post-transcripcional Rsm). Los miembros de este sistema actúan de manera que reprimen o promueven la síntesis del polisacárido. Por una parte se encuentra la proteína RsmA, una proteína que actúa en forma dimérica y que es capaz de unirse a los transcritos del gen *algD*, secuestrándolos y promoviendo su degradación, y por lo tanto impidiendo la formación de alginato. Su contraparte son los pequeños RNAs reguladores, los cuales son capaces de secuestrar a la proteína RsmA e impedir que actúe uniéndose a los transcritos del gen *algD*, como resultado, hay producción de alginato. Para que se transcriban los pequeños RNAs reguladores se necesita del sistema GacS/GacA. GacS es la cinasa histidínica que ante un estímulo del ambiente se activa y fosforila a su regulador de respuesta GacA, este se une a una secuencia consenso río arriba de los genes que codifican para los pequeños RNAs reguladores en el genoma de la bacteria, la secuencia consenso es llamada caja GacA, al unirse promueve la transcripción de los pequeños RNAs reguladores los cuales tienden a formar estructuras de tallo y asa, en cuyas asas se encuentran secuencias consenso con motivos GGA, a estos motivos se une la proteína RsmA con afinidad por RNAs (Lapouge, *et al.*, 2008).

En *A. vinelandii*, como en otras bacterias, se ha encontrado una redundancia de pequeños RNAs reguladores, ocho de la subfamilia RsmZ y uno solo de la familia

RsmY, cuyas estructuras secundarias poseen motivos consenso putativos para la unión de RsmA (Castañeda-Lucio, datos no publicados). Sin embargo, se ha visto en sus respectivas cepas mutantes, que no todas dejan de producir el polímero de manera significativa (Manzo, *et al.*, 2011). Se ha pensado que la gama de pequeños RNAs podría servirle para responder a diferentes ambientes, sin embargo, todos estos genes se expresan en las mismas condiciones de crecimiento. Estos hechos hacen que surja la interrogación de que si todos los pequeños RNAs reguladores Rsm encontrados a la fecha en *A. vinelandii* participan o no en la cascada de regulación de la biosíntesis de alginato tal como lo hacen RsmZ1 y RsmZ2 en los cuáles se ve una disminución cerca del 80% de la producción del polímero en sus mutantes respectivas; y que quizá el método de cuantificación de alginato no alcance a detectar las diferencias en la producción de alginato en las mutantes del resto de pequeños RNAs reguladores. Una manera de abordar esta interrogación es sobre-expresando cada pequeño RNA regulador de manera separada en una cepa en la cual no exista ningún otro que pudiera enmascarar el efecto de la sobre-expresión, como en una mutante *gacA*, la cual no expresa ningún RNA regulador.

Desafortunadamente, los plásmidos en *A. vinelandii* son inestables, y los ensayos no son reproducibles, por esta razón, el grupo de trabajo anteriormente decidió generar una familia de vectores integrativos que permiten integrar en un locus neutro material genético diverso, uno de estos es el plásmido pUMAtacKm, que se inserta el gen *melA*, y que contiene un promotor *tac* delante del cual se puede clonar aquella secuencia que sea de interés estudiar. Para este trabajo, se utilizó el plásmido pUMAtacKm para sobre-expresar cada pequeño RNA regulador por separado en una cepa  $\Delta gacA$ , esperando que nos ayudara a conocer a *grosso modo* si todos los pequeños RNAs reguladores Rsm de *A. vinelandii* se encontraban involucrados en la síntesis del alginato y al mismo tiempo verificar el sistema para la expresión.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria de vida libre perteneciente a las gammaproteobacterias, es encontrada en suelos de todo el mundo y por sus características acerca del metabolismo energético y de nitrógeno es relevante para la agricultura. Es una bacteria Gram negativa, en forma de coco o bacilo y capaz de fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas en un medio libre de nitrógeno y con una fuente orgánica de carbono. Las células de *A. vinelandii* miden aproximadamente 2 x 5 µm (Figura 1). Este microorganismo es aerobio obligado y crece con un tiempo de generación de 2.5 a 3 horas en medio Burk libre de Nitrógeno a 30°C. *A. vinelandii* puede utilizar como fuentes de carbono azúcares, ácidos orgánicos y ciertos alcoholes. El género *Azotobacter* se distingue por la habilidad de sus miembros para formar quistes que son resistentes a la desecación, a fármacos o a otros agentes físicos o químicos (Sadoff *et al.*, 1975, Setubal *et al.*, 2009).

*A. vinelandii* es una bacteria poliploide, es decir, contiene cerca de 80 copias de su cromosoma en un cultivo en fase estacionaria, y tiene una de las más altas tasas respiratorias conocidas (Nagpal *et al.*, 1989). El genoma circular completo de la cepa *A. vinelandii* DJ es de 5,365,318 bp (Setubal *et al.*, 2009).

Para conciliar su estilo de vida aeróbico con los procesos sensibles al oxígeno, *A. vinelandii* está especializada en su complemento de proteínas respiratorias. Es capaz de producir alginato, un polímero que además la protege del exceso de oxígeno exógeno y tiene múltiples copias de los genes de modificación de este polímero los cuales pueden alterar su composición en respuesta a la disponibilidad de oxígeno (Setubal *et al.*, 2009).

Las células de *A. vinelandii* acumulan poli-beta-hidroxibutirato (PHB) como una reserva de carbono y fuente de energía (Setubal *et al.*, 2009).



Figura 1. Células vegetativas de *Azotobacter vinelandii*. Tomado de: <http://genome.jgi-psf.org/azovi/azovi.home.html>.

## 2.2 Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*

El ciclo de vida comprende dos fases, la primera denominada “de crecimiento vegetativo”, en donde la célula realiza sus funciones fisiológicas de manera normal y la segunda que es llamada “de vida latente”, en donde la células entran en un estado metabólicamente “durmiente”.

Las células vegetativas (Figura 2A) son móviles por flagelos peritricos, bajo la inducción del enquistamiento, las células pierden su movilidad y se vuelven bastante esféricas, sus paredes comienzan a engrosarse en el periodo de unas horas y se desarrolla el quiste ópticamente refractante (Figura 2B). El proceso morfogenético produce una célula en reposo, el cuerpo central, el cual está revestido por una capa interna, llamada intina y una capa externa, llamada exina, ambas compuestas de alginato. Las acumulaciones de lípidos en el cuerpo central consisten en PHB. Los quistes son casi esféricos y miden 1.5 y 2  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, aproximadamente la mitad del volumen de una célula vegetativa. En condiciones favorables, el quiste comienza un proceso de germinación con el hinchamiento del cuerpo central que culmina en la ruptura de la exina, emergiendo dos células móviles nuevamente (Sadoff *et al.*, 1975).

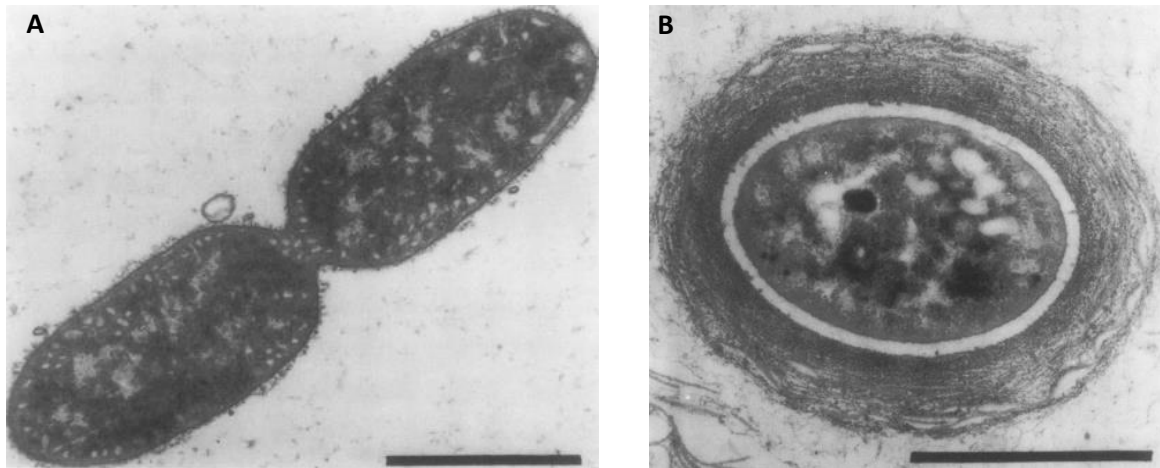


Figura 2. A. Célula vegetativa de *A. vinelandii* cerca de completar su división. B. Quiste maduro. (Tomado de Sadoff *et al.*, 1975).

## 2.3 Alginato

Los alginatos son un grupo de polisacáridos naturales compuestos por ácido manurónico y su epímero el ácido gulurónico unidos por enlaces  $\beta$  (1-4). Es en la actualidad extraído de las algas marinas cafés pero puede también ser producido biológicamente por bacterias como *Azotobacter vinelandii* (Sabra *et al.*, 2001; Clementi, 1997).

Los alginatos tienen un gran interés comercial porque presentan un amplio rango de aplicaciones en industrias como la alimenticia, la cosmética y la farmacéutica, como estabilizantes, espesantes y agentes formadores de geles; también se han utilizado en la inmovilización de células y enzimas. En el campo de la medicina, se ha utilizado el alginato para obtener impresiones dentales y de los tejidos blandos adyacentes, y en la elaboración de prótesis, así como en el recubrimiento y la protección de heridas. Un uso del alginato muy importante es su utilización como componente activo en productos farmacéuticos contra desordenes gastroesofageales (Clementi, 1997).

En la actualidad, la producción de alginato a gran escala a partir de algas es más económica, sin embargo, la producción de alginato microbiano podría traer grandes ventajas como la composición constante del polímero y el alto rendimiento.

Las aplicaciones de este polímero en el campo de la industria se van incrementando, y con ello el interés en entender las vías metabólicas, la función fisiológica y biológica de este polímero, la regulación de su formación y composición y optimizar el proceso de producción microbiano (Sabra *et al.*, 2001).

## 2.4 Biosíntesis del alginato en *Azotobacter vinelandii*

El alginato es producido en las células de *A. vinelandii* como una capsula y un polisacárido extracelular cuando la síntesis ocurre en células vegetativas metabólicamente activas, o como un componente de la cubierta del quiste en el proceso de enquistamiento. En este último caso, juega un papel protector porque sirve para preservar a las células durmientes del estrés mecánico y la desecación, mientras que el polisacárido secretado por las células vegetativas probablemente juega un papel diferente dependiendo de las condiciones ambientales. Puede ser responsable de la adhesión a superficies o actuar como una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados al interior de la célula (Clementi, 1997).

La vía de la biosíntesis del alginato puede dividirse en cuatro etapas: 1) síntesis de sustratos precursores en el citoplasma, 2) polimerización y transferencia a través de la membrana, 3) modificación en el periplasma, 4) exporte a través de la membrana

externa. La síntesis de precursores comienza del metabolito central fructosa-6-fosfato el cual es convertido a su precursor activo GDP-ácido manurónico a través de una serie de 4 pasos enzimáticos que involucran a las proteínas codificadas por los genes *algD*, *algA* y *algC*. La fructosa-6-fosfato es primero isomerizada a manosa-6-fosfato por la fosfomanosa isomerasa codificada por el gen *algA*. La manosa-6-fosfato es entonces convertida a manosa-1-fosfato por la fosfomanosamutasa codificada por *algC*. Entonces la GDP-manosa es formada por la acción de la GDP-manosa pirofosforilasa codificada por el gen *algA* (AlgA tiene una doble función). Finalmente la GDP-manosa es oxidada a ácido GDP-manurónico por la GDP-manosa deshidrogenasa codificada por el gen *algD* (Figura 3). Este último paso es no reversible y se piensa que es específico para la síntesis de alginato. Aunque los pasos de la polimerización no están bien caracterizados, se ha encontrado que los genes estructurales *alg8* y *alg44* codifican para las subunidades catalíticas de la polimerasa de alginato localizada en la membrana interna. El proceso de polimerización ocurre en el periplasma, el producto inicial polimérico es el ácido polimanurónico y se ha propuesto que la polimerización y la secreción a través de la membrana interna están acopladas simultáneamente. Para producir finalmente la estructura activa biológica, las cadenas de ácido polimanurónico sufren una serie de modificaciones post-polimerización, pasos que son llevados a cabo por un número de proteínas periplásmicas. El alginato es escindido enzimáticamente del complejo biosintético por la alginato liasa producto del gen *algL*. Los tres genes estructurales *algI*, *algJ*, y *algF* codifican para una proteína con siete dominios transmembranales, una proteína tipo II y una proteína periplásmica respectivamente las cuales forman un complejo enzimático (acetilasa) que cataliza la parcial O-acetilación de los residuos de ácido manurónico poliméricos. *algG* codifica para una epimerasa la cual es requerida para la epimerización de algunos ácidos manurónicos poliméricos a residuos de ácidos gulurónicos en el periplasma. Recientes avances indican que el complejo proteico periplásmico llamado como proteína de andamiaje, está formado por la C5-epimerasa con el producto de los genes *algK* y *algX*. Esta proteína rodea y protege a los nuevos polímeros formados de la degradación por la alginato liasa. *algE* codifica para una proteína aniónica selectiva de membrana externa parecida a una porina la cual forma un canal de membrana externa específico para alginato (Figura 4) (Pindar *et al.*, 1975, Muhammadi, 2007).

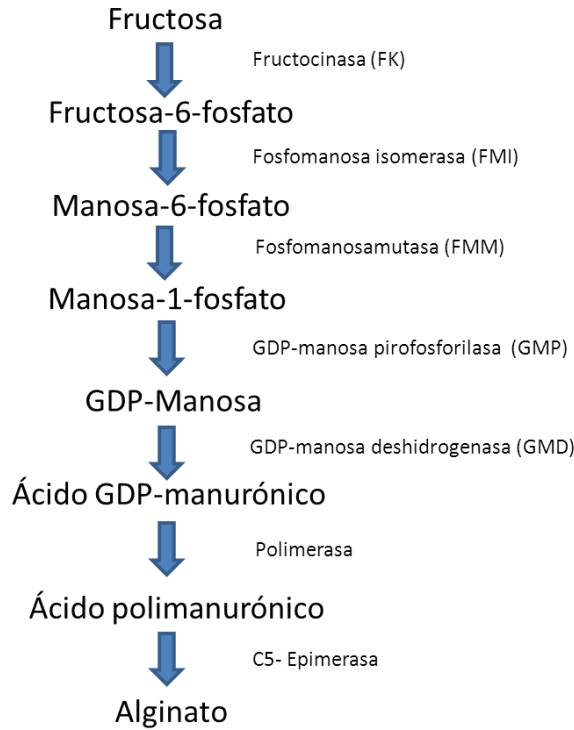


Figura 3. Ruta biosintética desde la fructosa hasta alginato. Modificado de Clementi, 1997.

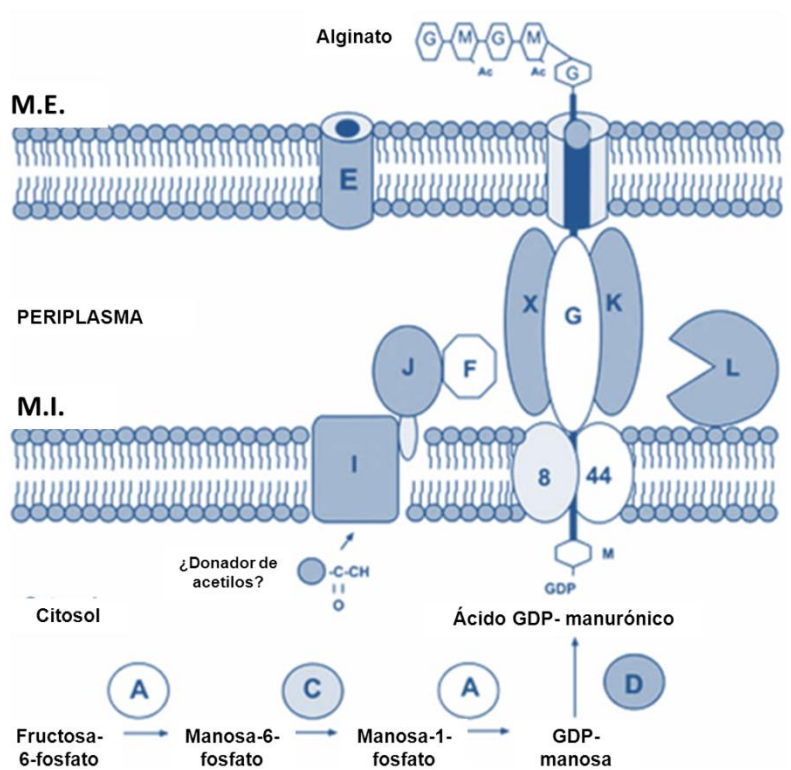


Figura 4. Modelo de la biosíntesis y ensamble del alginato en *P. aeruginosa*. Modificado de Mohammadi, 2007.

## 2.5 Genética de la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*

En *A. vinelandii* la organización de los genes para la producción de alginato identificados y el control de la biosíntesis de alginato son similares a sus homólogos en *P. aeruginosa* pero algunos de los genes difieren ligeramente en su organización transcripcional, regulación y función. Esto es muy probable porque *A. vinelandii* produce alginato en ambos estados, como cápsula en el estado vegetativo y como parte del estado de quiste. El grupo de genes de la biosíntesis de alginato es similar al descrito en *P. aeruginosa*, está organizado en al menos cuatro unidades transcripcionales, *PalgD*, *Palg8-alg44-algK*, *PalgG-X-L-V-I-F-A* y *PalgC* (Muhammadi, 2007). *algD* que codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa (Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996) es transcrito a partir de tres promotores, P1 (dependiente de  $\sigma^E$ ), P2 (dependiente de  $\sigma^S$ ) y P3 (aún se desconoce), un segundo operón *alg8-alg44-algK-algE* (cuyo promotor es del tipo  $\sigma^S$ ) se localiza inmediatamente debajo del *algD* y sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato (Mejía *et al.*, 1997), el tercer operón es *algG-X-L-V-I-F-A* y *algA*, *algG* codifica para una epimerasa, *algL* para una liasa y los productos de los genes *algX-V-I-F* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos en el periplasma (Vázquez *et al.*, 1999). *AlgC* es por si solo un operón que codifica para la fosfomanosa mutasa, sin embargo, no se encuentra en el mismo grupo (Figura 5).

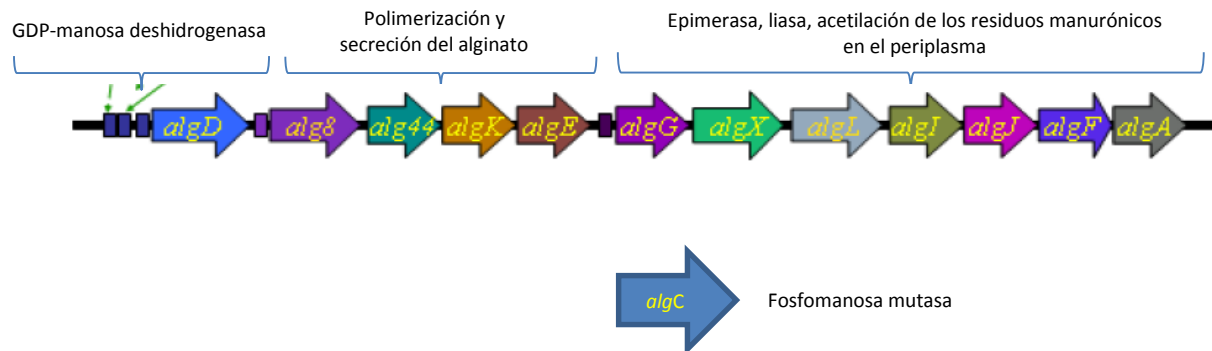


Figura. 5. Organización de los genes implicados en la biosíntesis del alginato.

## 2.6 Sistemas de dos componentes

Las bacterias son bombardeadas por todo tipo de moléculas que se originan en su ambiente o que son producidas por su metabolismo ante las cuáles ellas pueden montar una respuesta apropiada. En la mayoría de los casos la respuesta es la activación transcripcional de genes cuyos productos hacen frente con una molécula señal dada. La esencia de una señal transducida es la conversión de una señal reconocida a la activación génica o a otras respuestas celulares. Los principales medios por los cuales esto se lleva a cabo en bacterias, es a través de sistemas de dos componentes y fosforrelvo para la transducción de la señal (Hoch, 2000).

El básico sistema de doble componente involucra una cinasa histidínica o (HPK) y un regulador de respuesta (RR) (Chang *et al*, 1998). El papel de la cinasa histidínica es directamente la fosforilación de su RR afín en respuesta a una específica señal ambiental, esta fosforilación regula la actividad del regulador de respuesta. (Hoch, 2000; Heeb y Hass, 2001). Las señales pueden ser abióticas (como pH, temperatura y osmolaridad) o bióticas (como señales producidas por el hospedero o producidas por las mismas bacterias), para un número de sistemas de doble componente, las señales todavía son desconocidas (Heeb y Hass, 2001).

La cinasa histidínica consiste en un dominio de reconocimiento de la señal (también llamado “dominio de entrada”, el cual en muchas de ellas es transmembranal) con especificidad única unido a un dominio de autocinasa. La unión de la señal causa la activación de la autocinasa resultando en la hidrólisis de ATP y la fosforilación de una histidina en un subdominio fosfotransferasa de la autocinasa. El dominio fosfotransferasa se acopla con un dominio regulador (también llamado dominio receptor) del regulador de respuesta al cual transfiere su grupo fosforilo en un residuo de aspartato. El dominio regulador normalmente inhibe el dominio de salida del regulador de respuesta y la fosforilación alivia esta inhibición para que el dominio de salida pueda llevar a cabo su función (Figura 6). Esta función normalmente es la activación de la transcripción aunque algunas enzimas y otros tipos de dominios pueden ser controlados de esta manera (Hoch, 2000).

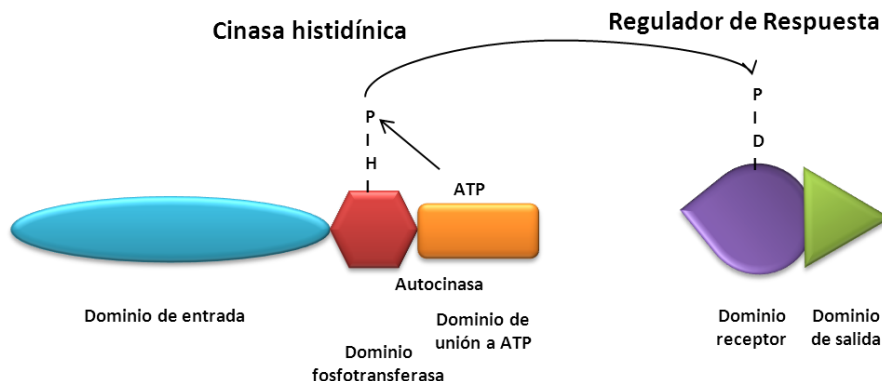


Figura 6. Modelo de un sistema de dos componentes.

Algunas bacterias hacen uso extensivo de estos sistemas, como *E. coli*, en la que operan más de 30 sistemas HPK-RR, sin embargo en *Mycoplasma genitalum* no se han encontrado homólogos a HPK, lo que sugiere que no todos los procariotes utilizan sistemas de doble componente extensivamente como *E. coli*. (Chang *et al.*, 1998).

## 2.7 Sistema de doble componente GacS/GacA

En algunos patógenos de humanos y plantas, un conservado sistema de dos componentes regula una amplia gama de genes de virulencia y respuesta al estrés (Lapouge *et al.*, 2008). Esta familia de sistemas reguladores es referida como GacS/GacA en *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Erwinia* y especies de *Vibrio fischerii*, VarS/VarA en *Vibrio cholerae*, BarA/UvrY en *Escherichia coli* y BarA/SirA en *Salmonella*, y LetS/LetA en *Legionella*. Estos sistemas regulan la producción de una amplia variedad de fenotipos incluyendo la producción de enzimas extracelulares, toxinas secretadas, moléculas de *quorum sensing*, varias funciones metabólicas y movilidad. En *P. aeruginosa* el sistema de dos componentes GacS/GacA controla la expresión de determinantes de virulencia agudos y crónicos (Brencic *et al.*, 2009).

GacS corresponde a la cinasa histidínica, GacA es el regulador de respuesta. El regulador de respuesta activa o reprime la expresión de genes regulatorios, probablemente a nivel transcripcional. Este sistema juega papeles importantes en varias bacterias gram negativas. En patógenos de animales o plantas, puede ser requerido para virulencia. En bacterias benéficas de plantas, este sistema controla la expresión de factores de biocontrol que protegen a las plantas de hongos patógenos (Heeb y Hass, 2001).

Cerca de 20 homólogos a GacS y GacA han sido encontrados en bacterias como *E. coli*, *Salmonella entérica*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter*. En general, estos homólogos han sido encontrados porque las mutaciones nulas en los genes correspondientes, causan fenotipos marcados. Dos principales características de las mutantes *gacS/gacA* son: parcial o completa pérdida de la capacidad de biocontrol en un grupo de *Pseudomonas* benéficas de plantas y la marcada reducción de la virulencia en bacterias patógenas de plantas y animales. Un denominador común de los fenotipos *gacS/gacA* es la síntesis de productos extracelulares, por ejemplo enzimas y metabolitos secundarios (Heeb y Hass, 2001).

Los sistemas de dos componentes a menudo participan en complejas redes donde controlan la expresión de otros factores regulatorios, incluyendo reguladores transcripcionales y pequeños RNAs reguladores (Brencic *et al.*, 2009).

## 2.8 Sistema de Regulación post-transcripcional Rsm

Como ya se ha mencionado antes, las bacterias usan una amplia variedad de mecanismos para adaptarse y responder a cambios ambientales. Redes globales regulatorias muy complejas han sido identificadas como aquellas que controlan los cambios en numerosos procesos celulares. Moléculas de RNA regulatorias no codificantes (ncRNAs) también llamadas pequeños RNAs reguladores (sRNAs), participan en varias de estas redes regulatorias globales. Aunque la mayoría de estos parecen funcionar por apareamiento de bases con los mRNAs, el descubrimiento de CsrB (carbón storage regulador) de *E. coli* introdujo un ejemplo de como un sRNA puede actuar secuestrando a una proteína reguladora de unión a RNA. Los miembros de la familia CsrB participan en circuitos globales regulatorios que controlan el metabolismo del carbono, la producción de productos extracelulares, movilidad celular, formación de *biofilm*, *quorum sensing* y patogénesis. El componente central del sistema Csr y su homólogo Rsm (Represor del metabolismo secundario), es una proteína homodimérica de unión a RNA (CsrA o RsmA), la cual se encarga de reprimir o activar la expresión de mRNAs blanco de manera post-transcripcional. La represión mediada por CsrA en *E. coli* involucra la unión de CsrA al Sitio de unión al ribosoma de los transcritos blancos, por lo tanto bloquea el acceso del ribosoma al mRNA. La reducida traducción probablemente contribuye a la rápida degradación del mRNA blanco. Los detalles del mecanismo por el cual CsrA media la activación, no están bien dilucidados, se cree que CsrA puede conferir estabilidad al mRNA. En adición a la proteína CsrA, al menos un pequeño RNA CsrB (RsmZ, Y, X) participa en el circuito regulatorio global antagonizando la actividad de CsrA (RsmA). En todos los casos conocidos, el pequeño RNA contiene múltiples sitios de unión a la proteína CsrA (RsmA) y es capaz de secuestrar varios dímeros de la proteína. Estos pequeños RNAs en su extremo 5', muestran considerable variación en su secuencia, sin embargo tienen un elemento GGA conservado. Una proteína RsmA se une a secuencia consenso (RUACARGGAUGU, donde R representa un ribonucleótido A o G). Los motivos GGA forman parte de un asa colocada en tallos cortos y variables. Estos sistemas se activan por la participación de los sistemas de dos componentes (GacS/GacA), los cuales activan la transcripción de los pequeños RNAs reguladores en respuesta a una señal (Figura 7) (Babitzke y Romeo, 2007; Kay *et al.*, 2006).

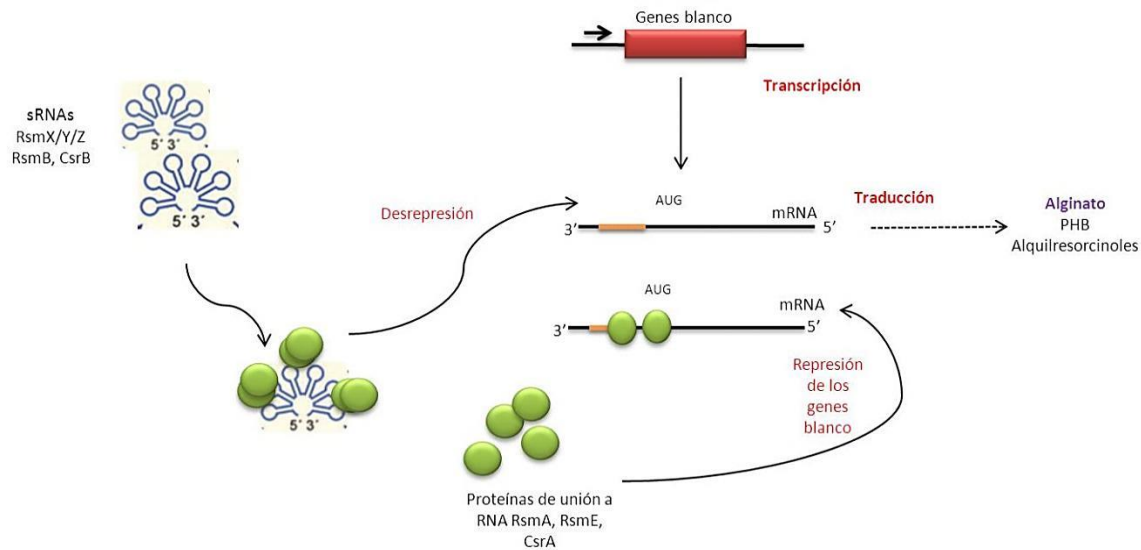


Figura. 7. Modelo del sistema de regulación post-transcripcional Rsm (Csr). Modificado de Lapouge *et al.*, 2008).

## 2.9 RgsA

Gonzales *et al.* (2008) realizaron una búsqueda bioinformática en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* en busca de pequeños RNAs no codificantes. Después compararon sus resultados con 5 cepas diferentes de *Pseudomonas*. Finalmente encontraron un pequeño RNA no codificante al que llamaron RgsA (Regulated by GacA and Stress).

Sus estudios con este pequeño RNA revelaron que está bajo regulación positiva de GacA y de RpoS en fase estacionaria. La determinación de su estructura secundaria predijo un único motivo presuntamente de unión a RsmA. Estos datos llevaron a hipotetizar que RgsA podría estar participando en la cascada de regulación Gac-Rsm. Sin embargo, en el modelo de *Pseudomonas*, la sobre-expresión de RgsA no fue capaz de aumentar la expresión del gen *hncA* que se encuentra bajo el control de este sistema, lo que llevó a la conclusión de que no participaba en la cascada de regulación. Sin embargo, la mutante en el gen *rgsA* mostró una reducida habilidad para sobrevivir al estrés por  $H_2O_2$ , lo que dio pauta para pensar que tenía un papel diferente aún desconocido.

En *A. vinelandii* se buscaron homólogos de *rgsA*, hallando una secuencia de 121 bp, con una identidad del 68% y una estructura secundaria de tallos y asas sumamente parecida. Se encontró la caja -35 y -10 correspondiente a elementos RpoS, y no se

observó una caja de reconocimiento para GacA, lo que sugirió que la regulación pudiera ser indirecta (Aguilar, 2011).

En estudios recientes del grupo de trabajo, se ha observado que en *A. vinelandii*, la mutante en *rgsA* no disminuye su producción de alginato, de PHB, ni de alquilresorcinoles; todos estos fenotipos, ya se han caracterizado estar bajo la regulación del sistema Gac-Rsm. Por lo que se sugiere que la participación de RgsA no es como la de los pequeños RNAs reguladores Rsm. Sin embargo, la mutante disminuye su crecimiento en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y aumenta su crecimiento cuando se crece a temperaturas de 48°C. Esto sugiere que RgsA pudiera estar involucrada en la regulación de la respuesta al estrés en una cascada de regulación paralela a la Gac-Rsm. La expresión de RgsA se encuentra regulada por RpoS e indirectamente por GacA (Huerta, 2015).

## 2.10 Promotor *tac*

Muchas proteínas son expresadas a bajos niveles *in vivo*. Para producir altos niveles de una proteína, a menudo se utiliza clonar el gen de interés río abajo de un promotor regulado bien caracterizado. Induciendo la transcripción de un promotor regulado, resulta en la expresión elevada de los productos génicos río abajo del promotor. Si el promotor regulado se puede apagar con fuerza, esto provee un método para hacer que la célula deje de producir un producto génico según convenga. Una variedad de promotores regulados pueden ser utilizados para este propósito como P<sub>lac</sub>, P<sub>BAD</sub>, promotores de fagos y P<sub>tac</sub>.

El promotor *tac* y su operador son uno de los sistemas de expresión más ampliamente utilizados. P<sub>tac</sub> es un promotor híbrido fuerte, compuesto de la región -35 del promotor *trp* y la región -10 del promotor/operador *lacUV5* (Boer *et al.*, 1983). El promotor *lacUV5* es un derivado del promotor *lac*, pero tiene una mutación que lo hace insensible a la represión en respuesta a altos niveles de glucosa y permite que sean utilizados medios ricos para el crecimiento de las cepas. El promotor *tac* puede ser desreprimido con isopropil β-D-thiogalactosido (IPTG) y reprimido por el represor LacI (Boer *et al.*, 1983). El alelo *lacI<sup>q</sup>* es una mutación que incrementa la concentración intracelular del represor LacI, resultando en la fuerte represión del P<sub>tac</sub>.

El IPTG inactiva al represor, entonces, la cantidad de expresión del P<sub>tac</sub> es proporcional a la concentración de IPTG agregado; bajas concentraciones de IPTG resultan en relativamente baja expresión del promotor, y altas concentraciones de IPTG resultan en alta expresión del promotor *tac*. El promotor *tac* es más eficiente para direccionar la transcripción, de 7 a 11 veces más que el P<sub>lac</sub> y de 2 a 3 veces más que el P<sub>trp</sub>.



Las diferencias entre los promotores híbridos y cada uno de los promotores parenterales se atribuyen a la incrementada actividad de un aspecto particular de la secuencia del promotor híbrido. El promotor *lacUV5* tiene una secuencia consenso -10 (5'TATAAT) y una secuencia consenso -35 (5'TTTACA), las del promotor *trp* son -10 (5'TTAACT) Y -35 (5'TTGACA). Para construir el promotor *tac* se utilizó la secuencia consenso -10 del  $P_{lac}$  y la -35 del  $P_{trp}$ . Todas las mutaciones que afectan la actividad del promotor híbrido de manera adversa, es decir, disminuyen su actividad, tienen menor grado de homología con la secuencia consenso, en cambio aquellas mutaciones que aumentan la actividad del promotor, tienen mayor grado de homología con la secuencia consenso (Boer *et al.*, 1983).

## 2.11 Transducción de señales vía Gac/Rsm en *Azotobacter vinelandii*

El sistema de dos componentes GacS/GacA se encuentra conservado en gran cantidad de bacterias Gram-negativas y controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo secundario (Heeb y Hass, 2001).

Lapouge *et al.* (2008) propusieron que el sistema Gac y el sistema Rsm forman parte de una vía de transducción de señales en  $\gamma$ -proteobacterias. GacA presumiblemente se une directamente a una secuencia llamada caja GacA (TGTAAGNNATNNCTTACA), presente río arriba de los homólogos de los pequeños RNAs reguladores Rsm (Kay *et al.*, 2006).

En *Azotobacter vinelandii* el sistema GacS/GacA controla la producción de alginato al nivel de los mRNAs del gen *algD* transcritos desde sus tres promotores (P1 que es dependiente de  $\sigma^E$ , P2 dependiente de  $\sigma^S$  y P3), estos transcritos se ven disminuidos en las mutantes *gacS* o *gacA* (Castañeda *et al.*, 2000; Castañeda *et al.*, 2001). Por lo que el sistema GacS/GacA es esencial para la activación de los tres promotores de *algD* durante la fase estacionaria, y el control de la síntesis de alginato es hasta cierto punto dependiente de la fase de crecimiento (Castañeda *et al.*, 2001).

En *Azotobacter vinelandii* con el propósito de caracterizar la vía por la cual el sistema de doble componente GacS/GacA regula la síntesis de alginato, fueron identificados los genes que codifican para los componentes del sistema Rsm. Fue identificado un solo gen *rsmA* y nueve genes de las subfamilias *rsmY/rsmZ* (el más alto número reportado). En varias especies bacterianas, GacA activa la transcripción de homólogos *rsmZ/Y* presumiblemente por unión a la caja GacA presente en la región promotora de estos genes. Se han identificado cajas GacA en todos los pequeños RNAs *rsm* excepto en *rsmY2* y *rgsA* que pertenece a otra familia, sugiriendo que la expresión de los genes *rsmZ1-Z7* y *rsmY1* está bajo el control directo de GacA (Manzo *et al.*, 2011).

En *A. vinelandii* una mutante GacA es incapaz de producir alginato (Castañeda *et al.*, 2001). Y la inactivación de *rsmZ1* y *rsmZ2* o ambos reduce significativamente la producción de alginato en un 80%. La expresión del gen *rsmZ1* con un promotor constitutivo restaura la biosíntesis de alginato en la mutante *gacA*. Estos datos indican que GacA, RsmZ1 y RsmZ2 son parte de una cascada que controla la síntesis de alginato (Figura 8) (Manzo *et al.*, 2011).

Con los datos que se han obtenido hasta ahora se sabe que el gen *algD* es clave en la síntesis del alginato y que su regulación está controlada al nivel post-transcripcional por el sistema Gac-Rsm. Los miembros de este sistema actúan de manera que reprimen o promueven la síntesis del polisacárido. Por una parte se encuentra la proteína RsmA,

una proteína que actúa en forma dimérica y que es capaz de unirse a los transcritos del gen *algD*, secuestrándolos y promoviendo su degradación, y por lo tanto impidiendo la formación de alginato. Su contraparte son los pequeños RNAs reguladores, los cuales son capaces de secuestrar a la proteína RsmA e impedir que actúe uniéndose a los transcritos del gen *algD*, como resultado, hay producción de alginato (Figura 8). Para que se transcriban los pequeños RNAs reguladores se necesita del sistema GacS/GacA. GacS es la cinasa histidínica que ante un estímulo del ambiente se activa y fosforila a su regulador de respuesta GacA, este se une a una secuencia consenso río arriba de los genes que codifican para los pequeños RNAs reguladores en el genoma de la bacteria, la secuencia consenso es llamada caja GacA, al unirse promueve la transcripción de los pequeños RNAs reguladores los cuales tienden a formar estructuras de tallo y asa, en cuyas asas se encuentran secuencias consenso con motivos GGA, a estos motivos se une la proteína RsmA con afinidad por RNAs.

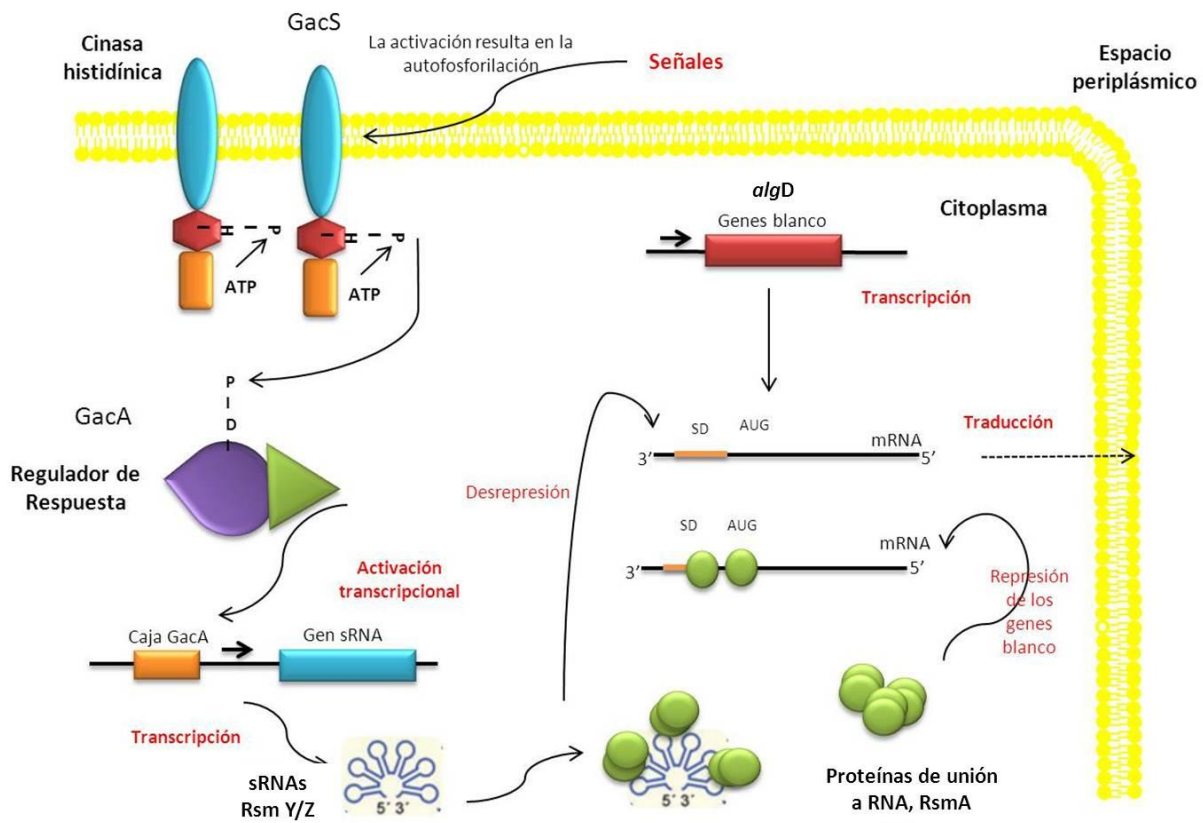


Fig. 8. Modelo de la cascada de regulación Gac-Rsm en *Azotobacter vinelandii*. Modificado de Lapouge *et al.*, 2008.

En contraste a la mutante *gacA* que es incapaz de producir alginato, las mutantes *rsmZ1* y *rsmZ2* o las dobles mutantes *rsmZ1Z2* producen bajos niveles de este polímero. Esto puede deberse a la presencia de siete genes adicionales pertenecientes a la familia *rsmZ/Y*. Las contribuciones de estas copias de pequeños RNAs



reguladores al control de la síntesis de alginato, también como su interacción con la proteína RsmA, queda por ser determinada (Manzo *et al.*, 2011).

Manzo *et al.* (2011) proponen que en *A. vinelandii* esta redundancia de genes podría estar involucrada en la respuesta a una amplia variedad de condiciones ambientales como la inducción del enquistamiento, un proceso que no está presente en otras bacterias que poseen el sistema Gac-Rsm. También la presencia de varios pequeños RNAs reguladores puede permitir la expresión diferencial por diversos elementos regulatorios.

### 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

---

En apoyo a la propuesta para la vía de transducción de señales Gac-Rsm, se ha demostrado que la sobre-expresión de homólogos a RsmZ a partir de un promotor *tac* en *P. fluorescens* suprime los efectos de las mutaciones en *gacS* y *gacA*, (Aarons *et al.*, 2000; Heeb *et al.*, 2002).

En *Azotobacter vinelandii*, una mutante *gacA* es defectiva en la producción de alginato. Y para probar si la expresión de *rsmZ1* se encontraba bajo la regulación de GacA Manzo *et al.* (2011) utilizaron el plásmido pMM2 que poseía un promotor independiente de GacA, en este se puso al gen *rsmZ1* bajo el control del promotor *lac*. Cuando este plásmido fue introducido en la mutante *gacA*, restauró la biosíntesis de alginato, indicando que GacA controla la síntesis de alginato a través de la activación de los pequeños RNAs Rsm (Manzo *et al.*, 2011).

Aarons *et al.* (2000) observaron que una mutante en el gen que codifica para el pequeño RNA regulador *prdB* reducía la síntesis de 2,4-diacetylphloroglucinol pero no tenía efecto detectable sobre la producción de HCN y de la exoproteasa. En *P. fluorescens* CHA0, la mutante en el gen *rsmZ*, causa una pequeña pérdida de la expresión de *hcnA* y *aprA* (Heeb *et al.*, 2002). En *A. vinelandii*, las mutantes en los genes *rsmZ1* y *rsmZ2* redujeron su producción de alginato cerca de cinco veces comparado con la cepa silvestre (Manzo *et al.*, 2011). El que en mutantes *gacS* o *gacA*, el efecto sobre algún fenotipo sea total y que por el contrario el efecto de una mutación en *prdB* o *RsmZ* tenga un efecto parcial sobre algún fenotipo, desde hace ya algún tiempo se ha relacionado con el hecho de que existan más RNAs reguladores en el genoma de una bacteria (Heeb *et al.*, 2002).

En *P. fluorescens* CHA0, un RsmZ, un RsmY y un RsmX están presentes; *P. aeruginosa* tiene un RsmZ y un RsmY (Heeb *et al.*, 2002, Kay *et al.*, 2006). *Azotobacter vinelandii* posee nueve genes de la familia Rsm. Hasta el 2011 se habían reportado siete genes pertenecientes a la subfamilia Z y dos pertenecientes a la subfamilia Y (Manzo *et al.*, 2011); sin embargo, recientemente en el grupo de trabajo, se encontró uno más perteneciente a la subfamilia Z, y se llegó a la conclusión de que los dos RNAs de la subfamilia Y, en realidad son uno solo de mayor tamaño, por lo que ahora se sabe que *A. vinelandii* posee ocho pequeños RNAs de la subfamilia RsmZ y uno solo de la familia RsmY, (datos no publicados).

Todos estos genes en *A. vinelandii* poseen una caja de pegado a GacA en su región reguladora y sus respectivos RNAs adquieren una estructura secundaria con tallos y asas (predicha por el programa MFOLD), en las cuales se encuentran diversos motivos GGA donde presuntamente se une RsmA. RsmZ1 tiene una longitud de 131 bp con 5

motivos presuntamente de unión a RsmA, RsmZ2 tiene una longitud de 167 bp con 4 motivos de unión, RsmZ3 es de 164 bp con 5 motivos de unión, RsmZ4 tiene una longitud de 164 bp con 4 motivos de unión a RsmA, RsmZ5 es de 162 bp con 4 motivos de unión, RsmZ6 es de 164 bp con 4 motivos de unión, la longitud de RsmZ7 es de 128 con 5 motivos, la de RsmZ8 es de 139 con 5, la de RsmY es de aproximadamente 313 bp con 7 motivos (Las estructuras secundarias de estos pequeños RNAs se encuentran en el Anexo 3).

Por su parte, RgsA tiene una longitud de 143 bp con un solo motivo presuntamente de unión a RsmA (Anexo 3).

Esta redundancia de genes con su estructura secundaria sumamente parecida, se ha pensado estar involucrada en que *A. vinelandii* produce el alginato tanto en su fase vegetativa como en la fase de quiste.

Cuando se mide el efecto de la mutación en cada pequeño RNA regulador sobre la producción de alginato, se observa que mutantes individuales tanto en *rsmZ1* o en *rsmZ2* disminuyen su producción (cerca del 80%). Por su parte una mutante doble en ambos RNAs reguladores conserva la reducción de cerca del 80%, tal como en las mutantes simples. Las mutaciones individuales en los otros pequeños RNAs (del *rsmZ3-rsmZ7*, el *rsmY* y el *rgsA*) no tienen un efecto drástico sobre la producción del polímero.

Podría pensarse que en las condiciones en las que la producción de alginato fue medido, RsmZ3-RsmZ7, y el RsmY no se encontraban activos, sin embargo, se ha observado a través de fusiones transcripcionales la expresión de todos estos genes en las mismas condiciones en que RsmZ1 y RsmZ2 están activos (datos de este laboratorio, no publicados).

Si a RsmZ1 y RsmZ2 se les confiere el 80% del fenotipo, al resto de los pequeños RNAs reguladores les tocaría contribuir con una pequeña parte del 20% restante de la producción de alginato (quizá atribuible a una menor afinidad por la proteína RsmA), que podría pasar desapercibida para el análisis estadístico aunado al error producido por el método de cuantificación de alginato que se utiliza.

Si todos los pequeños RNAs estuvieran participando en la regulación de la producción del alginato, en una mutante nonuple, se esperaría un fenotipo similar al *gacA*<sup>-</sup>. Sin embargo, la obtención de una mutante como está puede ser hasta cierto punto inviable.

Una manera de superar estos inconvenientes y estudiar si RsmZ3-Z8, RsmY y RgsA están implicados también en la producción de alginato como RsmZ1 y RsmZ2, podría



ser sobre-expresando cada pequeño RNA regulador de manera separada, en una cepa en la cual ningún otro pequeño RNA se esté expresando, como en una mutante *gacA*. De esta manera el fenotipo obtenido sería debido únicamente al alto número de copias del pequeño RNA regulador que se esté sobre-expresando en esa cepa y con la sobre-expresión podría superarse la baja afinidad por la proteína RsmA si estuviera ocurriendo. Con cepas que sobre-expresen a *rsmZ1* o *rsmZ2* como control, el efecto de los demás pequeños RNAs reguladores sobre-expresados puede ser comparable en un mismo sistema.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Los alginatos son polímeros con aplicaciones en el sector industrial; en la industria farmacéutica, se utilizan para hacer vendajes bioactivos, moldes dentales, como componente activo en productos farmacéuticos contra desordenes gastroesofageales, etc. Sin embargo, la cantidad y pureza del alginato obtenido de algas depende de condiciones como la edad de las algas y el proceso de extracción, entre otras. El campo de aplicaciones para el alginato va en aumento, por lo que la obtención de este polímero a través de fuentes microbianas es una opción económicamente más viable pues se podría controlar la producción y no se tendrían factores perjudiciales como la estación del año o la ubicación geográfica para la obtención del polímero, también se podría controlar la composición del mismo variando las condiciones de crecimiento de las bacterias o alterándolas genéticamente.

Comprender el proceso de la síntesis de alginato en *A. vinelandii*, así también como el mecanismo de regulación de su síntesis, será la base para aplicar estos conocimientos y así para mejorar su composición, la cantidad y las propiedades del mismo.

Hasta el momento se ha dilucidado poco al respecto, se ha reportado que el gen *algD* es clave en la síntesis del alginato, y que este se encuentra regulado por un sistema de doble componente GacS/GacA acoplado a un sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZ que regula de manera positiva su síntesis. El hecho de que *A. vinelandii* posea varios pequeños RNAs reguladores y que al mutar cada uno por separado no se observen efectos claros sobre la producción de alginato, aun cuando todos se expresan bajo las mismas condiciones de crecimiento, hace que surja la pregunta: ¿Todos los pequeños RNAs reguladores Rsm encontrados a la fecha en *A. vinelandii* participan en la cascada de regulación de la biosíntesis de alginato como lo hacen RsmZ1 y RsmZ2?

Una manera de abordar esta interrogación es sobre-expresando cada pequeño RNA de manera separada en una cepa en la cual no exista ningún otro que pudiera enmascarar el efecto de la sobre-expresión, como en una mutante *gacA* (en esta cepa al estar mutado este regulador de respuesta, ningún pequeño RNA del sistema Rsm se transcribirá). Quizá los pequeños RNAs tienen diferentes afinidades por la proteína RsmA, su funcionalidad se ve comprometida por factores ambientales o no todos están implicados en la regulación de la síntesis de alginato.

---

## 5. HIPÓTESIS

---

La sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores utilizando el plásmido integrativo pUMA*tac*Km en mutantes *gacA* de *Azotobacter vinelandii* restaurará la producción de alginato.

---

## 6. OBJETIVOS

---

### 7.1 GENERALES:

Estudiar el efecto regulador de los pequeños RNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato en mutantes *gacA* de *Azotobacter vinelandii*.

### 7.2 PARTICULAR:

1. Estudiar la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm en mutantes *gacA* en relación a la producción de alginato.

### 7.3 ESPECÍFICOS:

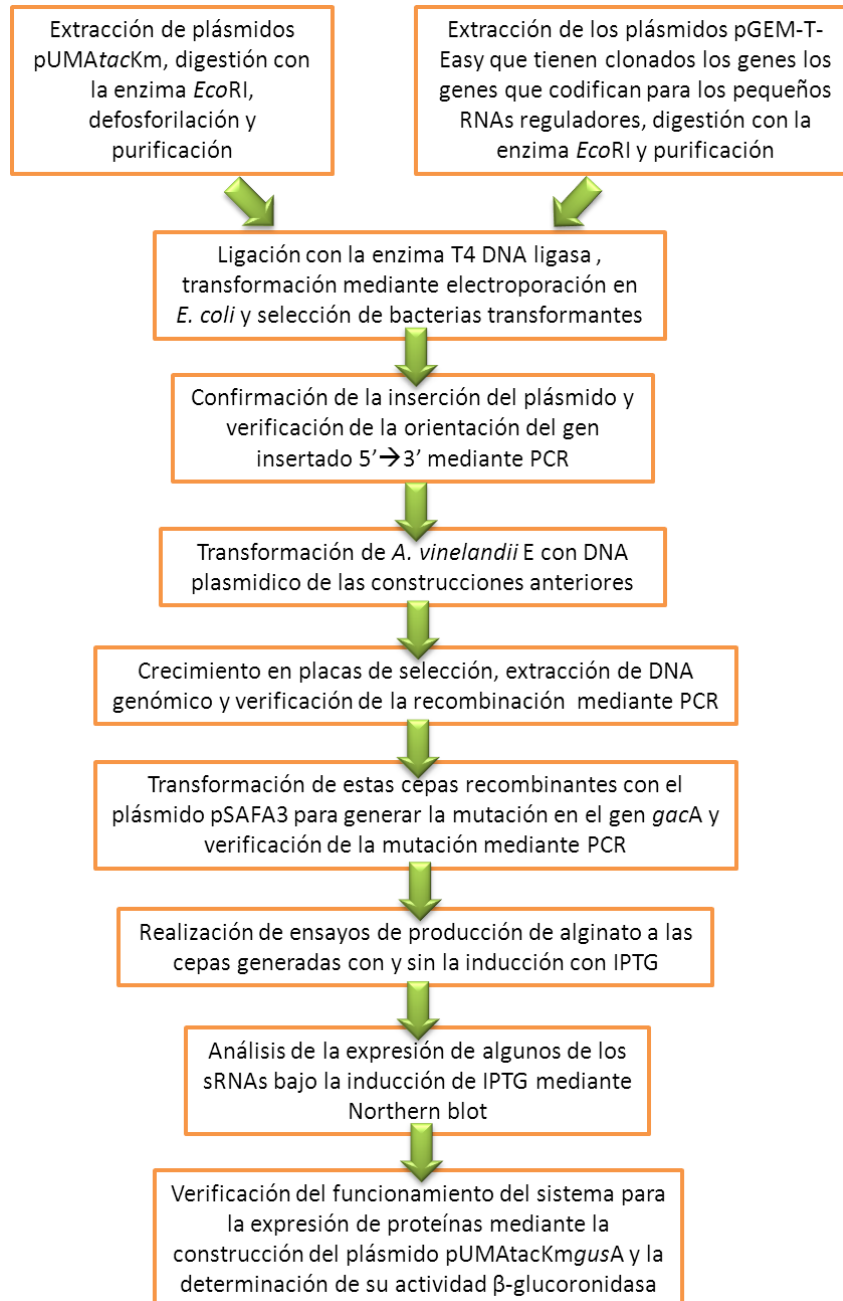
1. Clonar los genes que codifican para los pequeños RNAs reguladores Rsm y RgsA bajo el control del promotor *tac* en el plásmido integrativo pUMA*tac*Km.
2. Generar las cepas recombinantes de *Azotobacter vinelandii* que porten alelos de los genes que codifican para los pequeños RNAs Rsm y RgsA controlados por el promotor *tac*.
3. Obtener las mutantes *gacA* de cada cepa recombinante generada.
4. Comparar la producción de alginato en cada cepa.
5. Analizar la expresión de algunos de los pequeños RNAs reguladores en las cepas generadas.
6. Verificar el funcionamiento del sistema de expresión *meIA::tac*Km.

## 7. METODOLOGÍA

### Tipo de estudio.

Experimental.

### Estrategia de trabajo.



## Metodología

Se extrajeron los plásmidos pUMAtackKm y pGEM-T-Easy mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), a estos plásmidos se les realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (Thermo scientific). El vector (pUMAtackKm) se linearizó con un único corte, y cada gen codificante para cada pequeño RNA regulador se escindió del plásmido pGEM-T-Easy en el que se encontraba clonado. Estos fragmentos se purificaron desde el gel de agarosa al 1% por medio del Kit GeneClean®. Posteriormente se defosforiló el vector con la enzima Fosfatasa Alcalina (Invitrogen) y los fragmentos (el vector ya defosforilado y los genes de los pequeños RNAs reguladores) se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La ligación se precipitó con glucógeno e Isopropanol. Posteriormente se transformaron células *E. coli* DH5- $\alpha$  electrocompetentes con esta ligación, y se sembraron en placas de selección en medio Lb con Ap (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) y Km (0.02  $\mu\text{g/ml}$ ). Las colonias resultantes se sembraron para extraer los nuevos plásmidos pUMAtackKm $rsm$  y verificar la inserción y orientación de cada gen clonado mediante patrón de restricción con la enzima *EcoRI* y PCR (Sambrook *et al.*, 1989). Se extrajeron estos plásmidos mediante “Maxi-Prep” (Sambrook *et al.*, 1989) y se procedió a transformar con ellos a células competentes de *Azotobacter vinelandii* cepa E. La transformación se verificó mediante PCR. Las cepas recombinantes obtenidas se prepararon para transformarlas con el plásmido pSAFA3 (Castañeda *et al.*, 2001), buscando generar la mutación del gen *gacA* mediante la inserción de un gen de resistencia a Gentamicina. La mutación se verificó mediante PCR, y después se procedió a realizar los ensayos de inducción con y sin IPTG a cada cepa generada que sobre-expresaba un pequeño RNA diferente cuyo efecto se esperaba fuera reflejado sobre el fenotipo de la producción de alginato.

Por otra parte, utilizando el plásmido pUMAtackKmgusA se transformaron células de *A. vinelandii* E y en las células transformantes resultantes se verificó que la recombinación se haya llevado a cabo mediante PCR. A esta cepa se le determinó la actividad  $\beta$ -glucuronidasa con y sin la inducción por IPTG para analizar la expresión de la proteína  $\beta$ -glucuronidasa y verificar la funcionalidad del sistema.

Mediante un análisis de hibridación tipo *Northern blot* (utilizando el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II de Roche de acuerdo a las instrucciones del fabricante) se verificó y comparó la expresión de RsmZ2 en estas cepas generadas con el RsmZ2 de la cepa silvestre.



Figura 9. Esquema de los plásmidos pGEM-T Easyrsm y pUMAtackMrsm.

El fragmento del gen codificante para cada pequeño RNA regulador se ligó con el vector pUMAtackM. Con estas construcciones se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5- $\alpha$  por medio de electroporación. Las colonias transformantes fueron recuperadas en placas de selección a las que se les extrajeron plásmidos y se verificó por patrón de restricción (también con *EcoRI*) que hubieran adquirido el inserto. De esta manera se obtuvieron colonias candidatas que contenían insertado el gen *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ3*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6*, *rsmY1*, *rsmY2* y *rgsA* (Figura 10). Es importante señalar que al inicio del proyecto no se sabía todavía que *rsmY1* y *rsmY2* en realidad eran uno solo hoy llamado solo *rsmY1*, por lo cual se trabajó con *rsmY1* y *rsmY2* por separado y juntos.

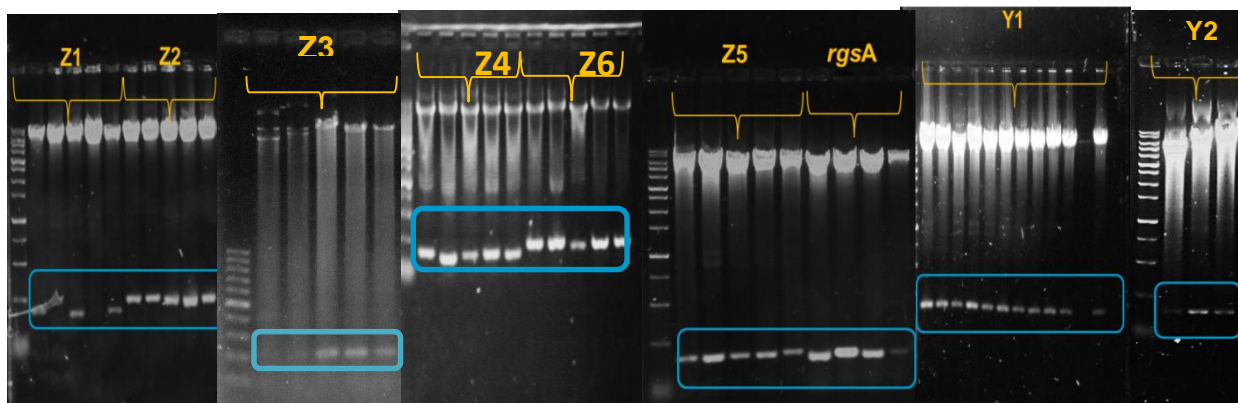


Figura 10. Digestiones con la enzima *EcoRI* a los plásmidos pUMAtackMrsm de las bacterias transformantes. Se observa en la parte inferior del gel, una banda de peso molecular menor a 250 pb que corresponde a los genes codificantes para un pequeño RNA regulador que se liberan del vector pUMAtackM.

En el caso de las colonias recuperadas con el plásmido pUMAtackMrsmY1Y2, la inserción del gen *rsmY1Y2* fue verificado por PCR utilizando un oligonucleótido que se alinea a la altura del promotor *tac* (PTac) como delantero y otro que se alinea a la altura

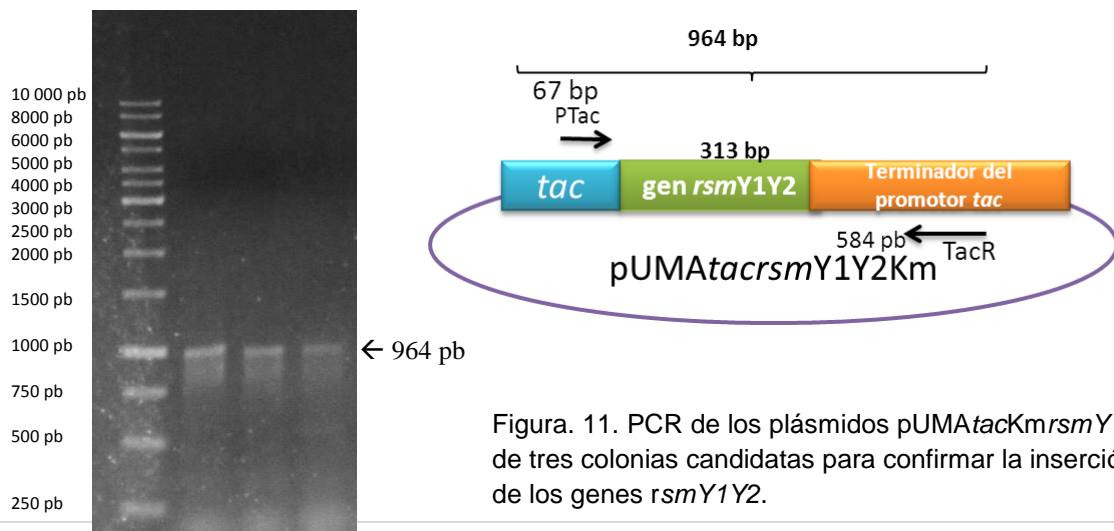


Figura 11. PCR de los plásmidos pUMAtackMrsmY1Y2 de tres colonias candidatas para confirmar la inserción de los genes *rsmY1Y2*.

del terminador (TacR), si se encontraba el gen clonado, la banda esperada era de 964 bp (Figura 11).

Posteriormente se seleccionaron algunas clonas para verificar la orientación 5'→3' de la inserción de cada gen en el vector pUMAtackKm mediante PCR. Para ello se utilizó para cada construcción, un oligonucleótido diferente (ver el anexo 2), diseñado para que alinee al inicio de cada gen estructural como Delantero; como Reverso, se utilizó un oligonucleótido (TacR) que se alinea en la secuencia correspondiente al terminador *tac* (Figura 12), este oligonucleótido se alinea a 584 pb del final de cada gen estructural insertado, por lo que el peso esperado en las PCRs corresponde al peso del gen estructural de cada pequeño RNA regulador más 584 pb.

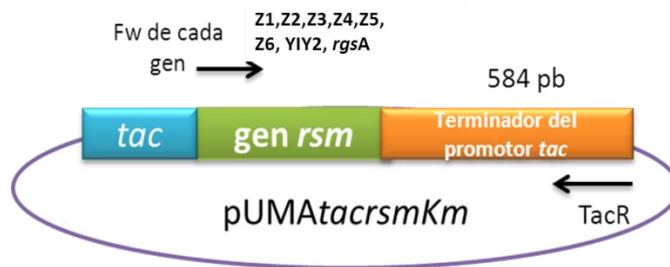


Figura 12. Esquema del alineamiento de los oligonucleótidos Delantero de cada gen estructural y TacR en el plásmido pUMAtackKmrsm. Los Oligonucleótidos utilizados y las condiciones se describen en el anexo 2).

En la figura 13 se muestra la PCR que confirma la orientación de los insertos *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rgsA* en el plásmido pUMAtackKm. Para *rsmZ1* el peso del amplicón fue de 744 bp, para *rsmZ2* 808 bp, para *rsmZ4* 736 bp, para *rsmZ6* 795 bp y para *rgsA* 727 bp.

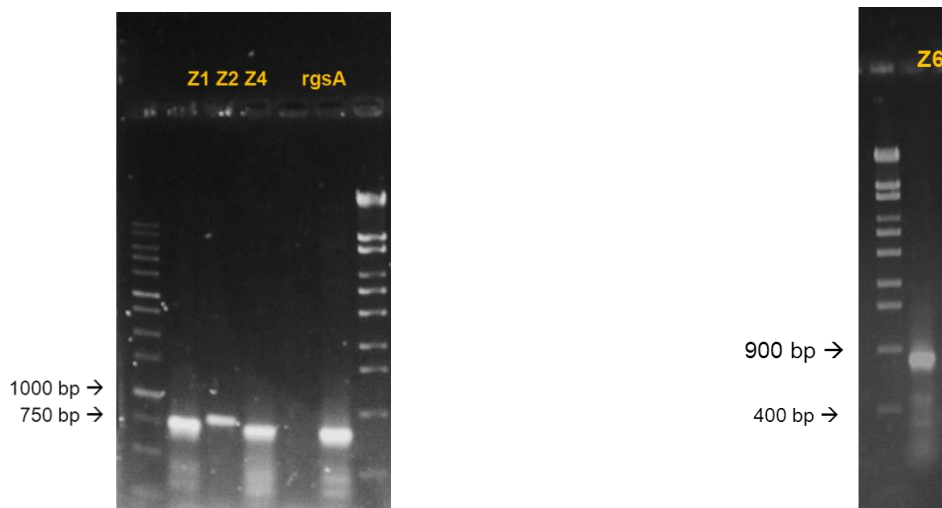


Figura. 13. PCR para confirmar la orientación 5'→3' de los genes *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ6* y *rgsA* insertados en el plásmido pUMAtacKm utilizando el oligonucleótido TacR y el oligonucleótido Delantero de cada gen *rsm*.

Para comprobar la orientación 5'→3' del gen *rsmZ3* insertado, se utilizó el oligonucleótido delantero del gen y el oligonucleótido TacR, el amplificado esperado fue de 774 pb, el tamaño del gen *rsmZ3* es de 190 bp. Para asegurar el resultado, se realizó PCR utilizando un oligonucleótido que se alineaba al final del gen *rsmZ3* y el TacR, y si el gen insertado estaba clonado en sentido correcto, no debía a parecer banda (Figura 14).

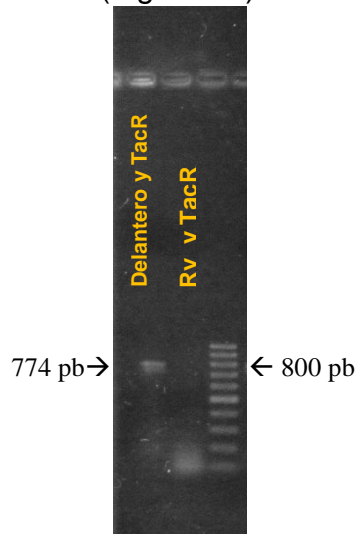


Figura 14. PCR para confirmar la orientación 5'→3' del gen *rsmZ3* insertado en el plásmido pUMAtacKm. Carril 1: utilizando el oligonucleótido TacR y el oligonucleótido Delantero correspondiente para *rsmZ3*.

Para revisar la orientación del gen *rsmZ5*, se amplificó primero con los oligonucleótidos PTac que se alinea a 67 pb del final del promotor *tac* en sentido 5' → 3', y el oligonucleótido TacR que como ya se mencionó anteriormente se alinea a 584 pb en la secuencia correspondiente a un terminador *tac*. El amplificado tiene un peso de 803 pb aproximadamente cuando contiene al gen *rsmZ5* insertado. Cuando se amplificó con el oligonucleótido TacR y el delantero del gen, el peso esperado fue de 736 pb que correspondería al peso correcto cuando su orientación fuera 5' → 3' (Figura 15).

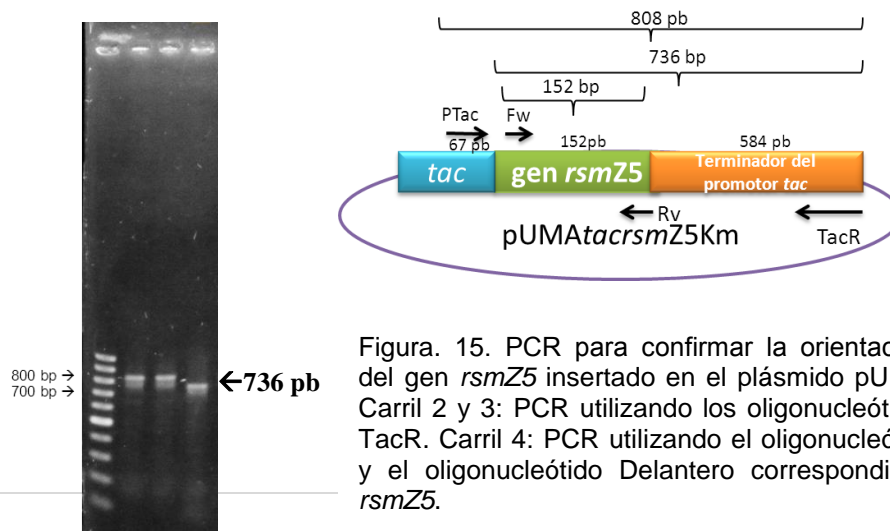


Figura. 15. PCR para confirmar la orientación 5'→3' del gen *rsmZ5* insertado en el plásmido pUMAtacKm. Carril 2 y 3: PCR utilizando los oligonucleótido Ptac y TacR. Carril 4: PCR utilizando el oligonucleótido TacR y el oligonucleótido Delantero correspondiente para *rsmZ5*.

Para el caso de la construcción Y1Y2, también se utilizó un oligonucleótido que se alinea específicamente en el inicio del gen como Delantero y el TacR. El amplificado fue de 867 bp aproximadamente (Figura 16).

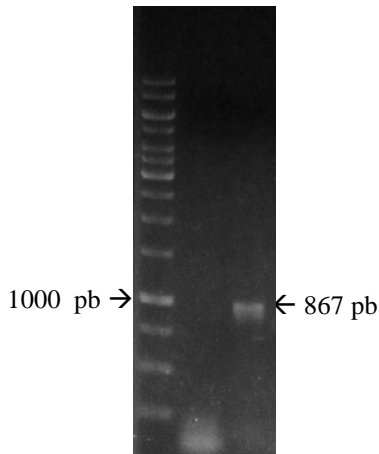


Figura 16. PCR para confirmar la orientación 5'→3' del gen *rsmY1Y2* insertado en el plásmido pUMAtacKm. Carril 2: utilizando el oligonucleótido TacR y el oligonucleótido reverso para *rsmY1Y2*, Carril 3: utilizando el oligonucleótido TacR y el oligonucleótido delantero para *rsmY1Y2*.

Para confirmar la orientación de los genes *rsmY1* y *rsmY2* clonados, se utilizó un oligonucleótido al que llamamos PTac como delantero que se alinea en el promotor *tac* a 67 pb de donde se encuentra el sitio *EcoRI* donde se clonaron los genes, y como reverso, un oligonucleótido específico para *rsmY1* y *rsmY2* (Figura 17). Los amplificados son de 150 bp para *rsmY1* y de 217 bp para *rsmY2*.

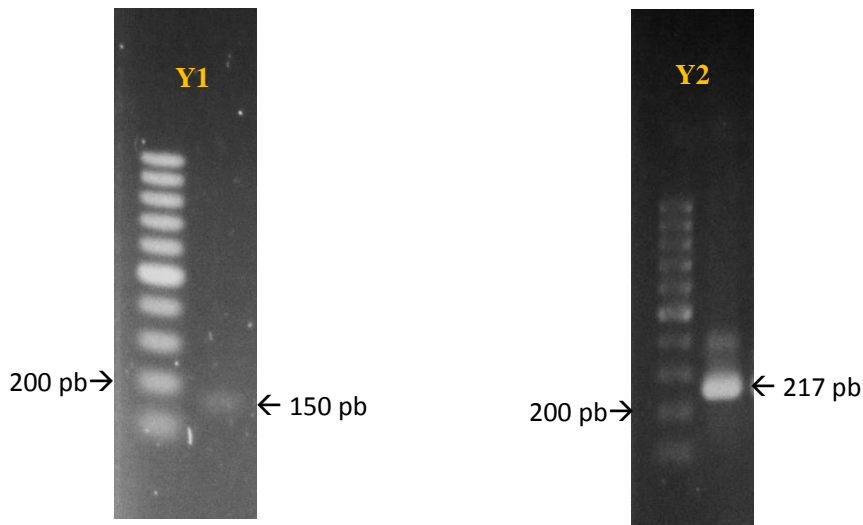
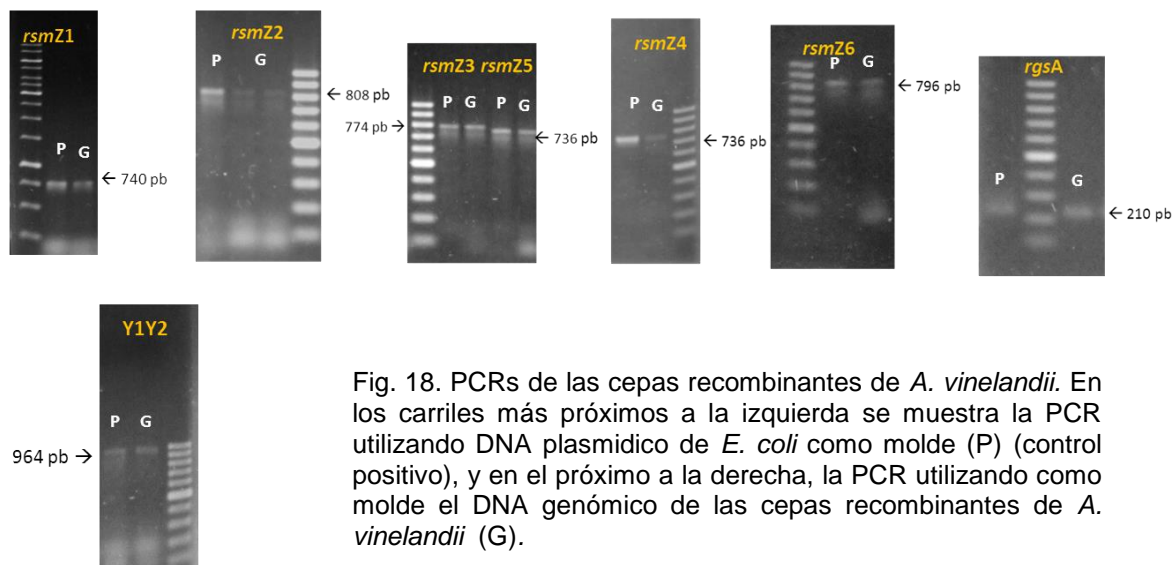


Figura. 17. PCR para confirmar la orientación 5'→3' de los genes *rsmY1* y *rsmY2* insertado en el plásmido pUMAtacKm utilizando el oligonucleótido PTac como delantero y un oligonucleótido específico como reverso para cada uno.

## Generación de las cepas recombinantes de *Azotobacter vinelandii* que porten alelos de los genes que codifican para los pequeños RNAs Rsm y RgsA controlados por el promotor *tac*.

Para generar las cepas recombinantes que porten las construcciones *tac-rsm* se extrajeron estos plásmidos descritos anteriormente mediante “Maxi-Prep” (Sambrook *et al.*, 1989) y se procedió a transformar con ellos a células competentes de *Azotobacter vinelandii* cepa AEIV (E). La verificación de que la recombinación hubiera sido exitosa fue mediante PCR (Figura 18) utilizando los mismos oligonucleótidos que para verificar la orientación del gen clonado en el plásmido como se describió anteriormente, como control positivo se utilizó como molde el plásmido construido para cada pequeño RNA regulador.

### PCRs de las cepas recombinantes



## Obtención de las mutantes *gacA* de cada cepa recombinante generada.

Posteriormente a las cepas anteriores se les mutó el gen *gacA* para determinar si la sobre-expresión del pequeño RNA revertía los efectos de la mutación de *gacA*.

Las cepas recombinantes obtenidas se prepararon para transformarlas con el plásmido pSAFA3 (Castañeda *et al.*, 2001, este plásmido lo tenemos en el laboratorio), buscando generar una mutación del gen *gacA* mediante la inserción de un gen de resistencia a Gentamicina.

Se obtuvieron las mutantes en el gen *gacA* de las cepas de *A. vinelandii* *melA::pUMAtackMrsmZ(1-6)* y de la cepa *melA::pUMAtackMrsgsA*. La verificación de la mutación en el gen *gacA* se llevó a cabo por PCR, para lo cual se utilizó un par de oligonucleótidos que se alineaban en este mismo gen, dándonos un amplificado de 773 bp en la cepa silvestre (AEIV). Cuando se generaba la mutación por medio de la interrupción del gen por un *cassette* de resistencia a Gentamicina (plásmido pSAFA3), el amplificado aumentaba a 1573 bp aproximadamente (Figuras 19, 20, 21, 22, 23).

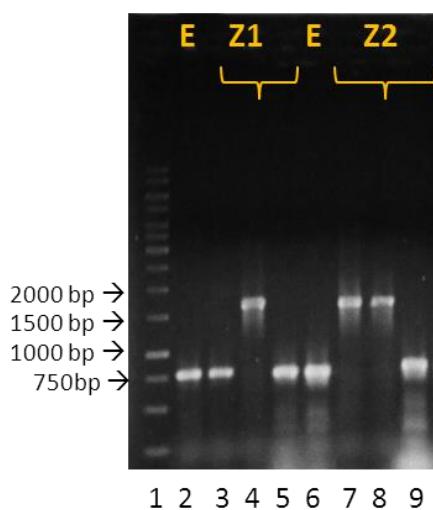


Fig. 19. PCRs de las mutantes *gacA melA::pUMAtackMrsmZ1* y *Z2*.  
 Carril 2: PCR con los oligonucleótidos *wtgacAD* y *wtgacAR* a la cepa silvestre AEIV (773 bp).  
 Carril 3: PCR con los oligonucleótidos *wtgacAD* y *wtgacAR* a la candidata A *gacA Z1* (se esperaba un amplificado de 1573 bp, quedó descartada).  
 Carril 4: PCR con los oligonucleótidos *wtgacAD* y *wtgacAR* a la candidata B *gacA Z1* (1573 bp).  
 Carril 5 y 6: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el *pUMAtackMrsmZ1* (744 bp).  
 Carril 7 y 8: PCR con los oligonucleótidos *wtgacAD* y *wtgacAR* a las candidatas A y B *gacA Z2* (1573 bp).  
 Carril 9: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el *pUMAtackMrsmZ2* (808 bp).

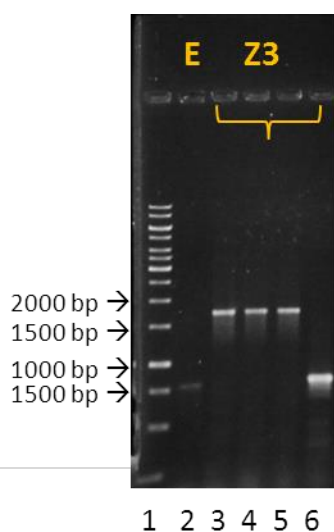


Fig. 20. PCRs de las mutantes *gacA melA::pUMAtackMrsmZ3*.  
 Carril 2: PCR con los oligonucleótidos *wtgacAD* y *wtgacAR* a la cepa silvestre AEIV (773 bp).  
 Carril 3, 4 y 5: PCRs con los oligonucleótidos *wtgacAD* y *wtgacAR* a las candidatas A, B y C *gacA Z3* (1573 bp).  
 Carril 6: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el *pUMAtackMrsmZ3* (774 bp).

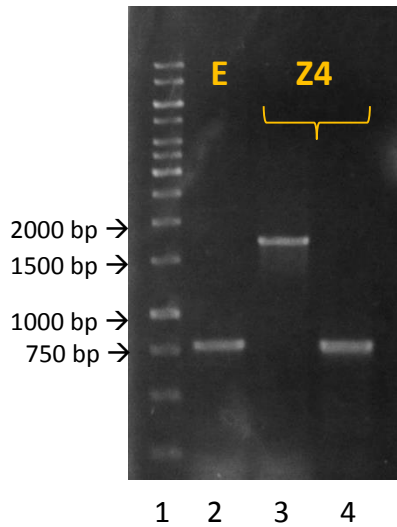


Fig. 21. PCRs de las mutantes *gacA melA::pUMAtacKmrsmZ4*  
 Carril 2: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la cepa silvestre E (773 bp).  
 Carril 3: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la candidata *gacA Z4* (1573 bp).  
 Carril 5: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el pUMAtacKmrsmZ4 (736 bp).

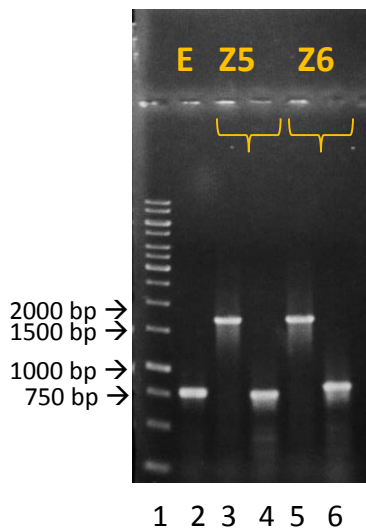


Fig. 22. PCRs de las mutantes *gacA melA::pUMAtacKmrsmZ5* y *Z6*.  
 Carril 2: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la cepa silvestre E (773 bp).  
 Carril 3: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la candidata *gacA Z5* (1573 bp).  
 Carril 4: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el pUMAtacKmrsmZ5 (736 bp).  
 Carril 5: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la candidata *gacA Z6* (1573 bp).  
 Carril 6: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el pUMAtacKmrsmZ6 (795 bp).

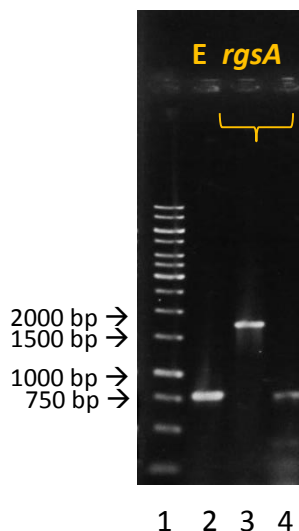


Fig. 23. PCRs de las mutantes *gacA melA::pUMAtacKmrsgA*.  
 Carril 2: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la cepa silvestre E (773 bp).  
 Carril 3: PCR con los oligonucleótidos wtgacAD y wtgacAR a la candidata *gacA rgsA* (1573 bp).  
 Carril 4: PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (para verificar orientación), para asegurar que fuera la cepa con el pUMAtacKmrsgA (727 bp).

El fenotipo *gacA*<sup>-</sup> en *A. vinelandii* puede observarse en la Figura 24. La figura de la derecha muestra el típico fenotipo del crecimiento de células WT de *A. vinelandii* que tiene un aspecto blanquecino, refractante y mucoso por la presencia del alginato, en cambio, las imágenes de la izquierda muestran un crecimiento totalmente carente de alginato, en donde su apariencia es café, opaca y seca.

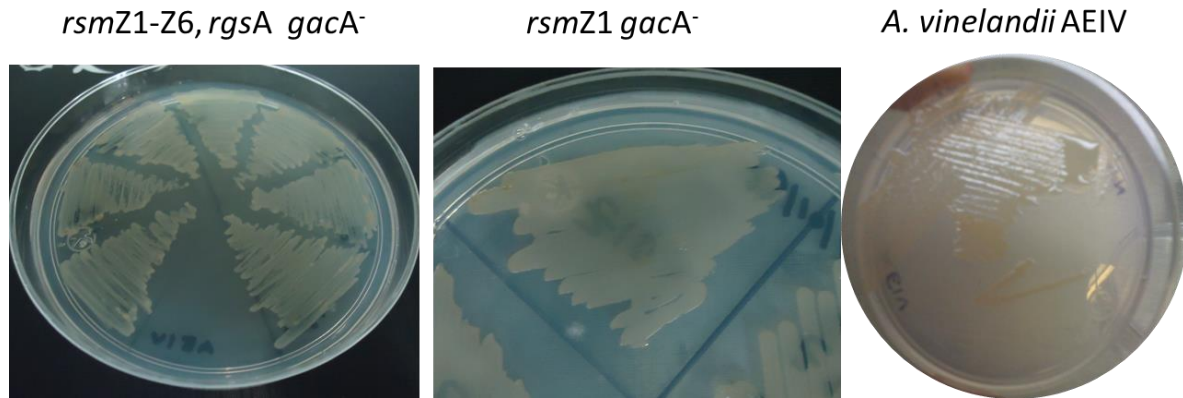


Figura 24. Fenotipo de las mutantes *gacA* en *A. vinelandii* AEIV.

### Comparación de la producción de alginato en cada cepa.

Después se procedió a realizar los experimentos de inducción para sobre-expresar los pequeños RNAs reguladores (de manera individual) que se encontraban clonados bajo el promotor *tac* en cada cepa mutante en el gen *gacA*. La inducción se realizó a las 0 y a las 12 horas de crecimiento en medio Burk-Sacarosa, con 500  $\mu$ M de IPTG, 1 mM, 1,5 mM y 2 mM de IPTG, y se recolectaron células a las 24, 36 y 48 horas de crecimiento.

La sobre-expresión de manera individual de cada pequeño RNA regulador usando el promotor *tac*, al parecer, no restauró el fenotipo de la producción de alginato en las cepas *gacA*<sup>-</sup> de *A. vinelandii* (Figura 25).

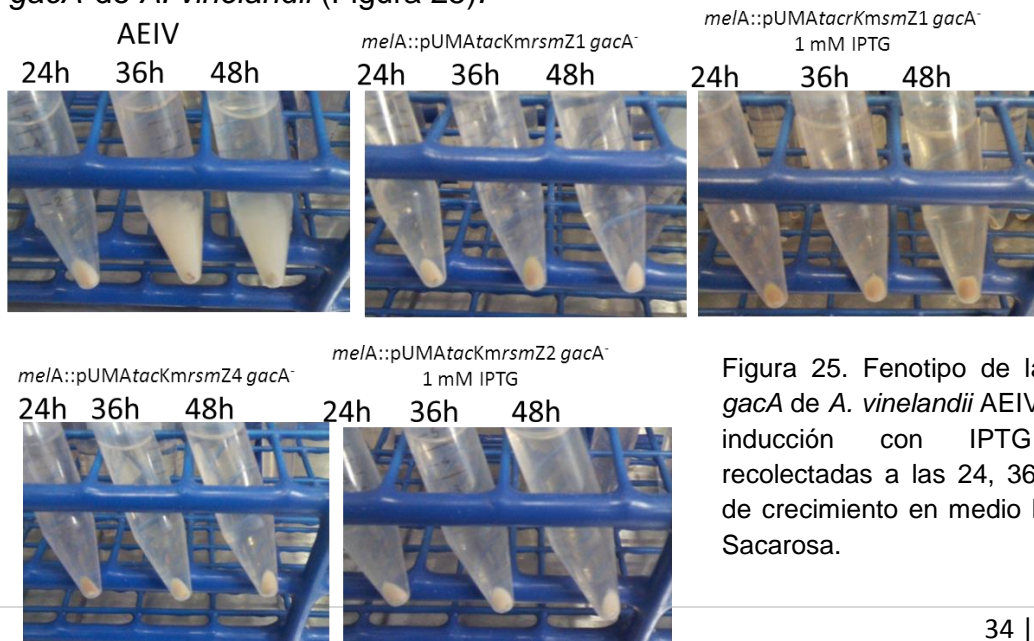


Figura 25. Fenotipo de las mutantes *gacA* de *A. vinelandii* AEIV con y sin la inducción con IPTG 1 mM recolectadas a las 24, 36 y 48 horas de crecimiento en medio líquido Burk-Sacarosa.

## Análisis de la expresión de algunos de los pequeños RNAs reguladores en las cepas generadas.

Para analizar si se estaban transcribiendo los pequeños RNAs y comparar su expresión respecto a la cepa silvestre AEIV, se realizó una hibridación tipo *Northern blot* en donde se comparó la expresión de RsmZ2.

Se extrajo RNA total de la cepa silvestre AEIV de células en fase estacionaria, así como de la mutante en *rsmZ2* ( $E\Delta C1$ ) y de la cepa *melA::pUMAtackKm<sub>rsmZ2</sub> gacA* (la cepa que sobre-expresa a RsmZ2 y es mutante en *gacA*) y en seguida, las muestras (~600 ng) se corrieron en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes y este gel fue utilizado para llevar a cabo la transferencias.

Posteriormente se realizó una hibridación tipo *Northern blot*. Como sondas se utilizó el gen estructural *rsmZ2*. La expresión de RsmZ2 en la cepa silvestre AEIV fue mucho mayor que la encontrada en la cepa que sobre-expresaba el gen *rsmZ2* bajo el control del promotor *tac* (Figura 26). La cepa AEIV  $E\Delta C1$  fue utilizada como control negativo.

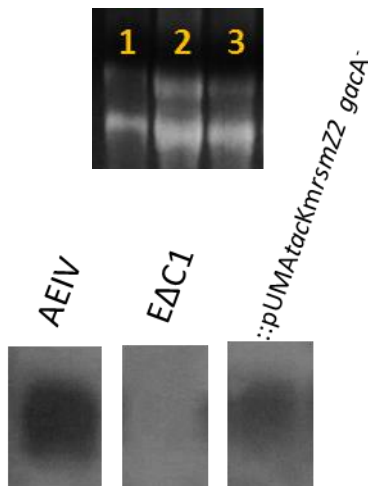


Fig. 26. *Northern blot* para revelar la expresión de RsmZ2. Carril 1: RsmZ2 de la cepa silvestre AEIV. Carril 2: Ausencia de RsmZ2 de la cepa  $E\Delta C1$ . Carril 3: RsmZ2 transcrito a partir del promotor *tac* en la cepa *melA::pUMAtackKm<sub>rsmZ2</sub> gacA* con 1 mM de IPTG.

## Verificación del funcionamiento del sistema de expresión *melA::tacKm*.

Por otra parte, como experimento control para determinar los niveles de inducción del promotor *tac* se utilizaron los plásmidos *pUMAtackKmgusA* 62 y 82. El vector *pUMAtackKmgusA* es el *pUMAtackKm* en el que se le clonó el gen reportero *gusA* que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. La diferencia entre el *pUMAtackKmgusA* 62 y 82, es solo la posición en la que fue clonado el gen de resistencia a Kanamicina dentro del vector. Estos plásmidos fueron utilizados para transformar células competentes de *A. vinelandii* AEIV.

La recombinación exitosa fue verificada por PCR utilizando los oligonucleótidos PTac y TacR de los cuales ya se habló anteriormente, el amplificado esperado fue de 2541 bp, (el gen *gusA* es de aproximadamente 1800 bp) (Figura 27).

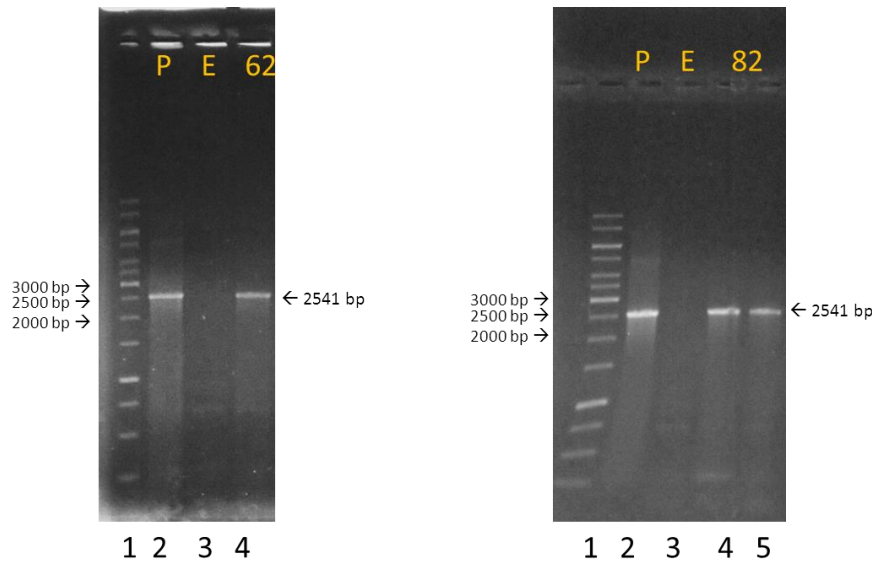
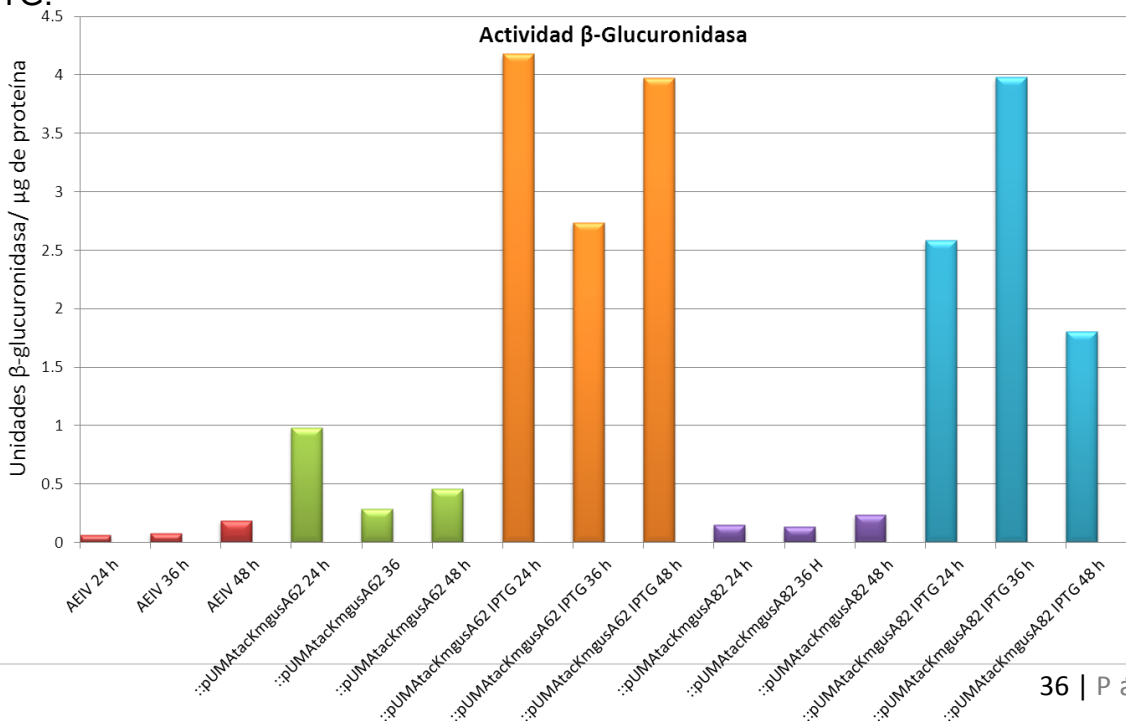


Figura 27. PCRs a las cepas *melA*::pUMAtackmgusA 62 y 82 utilizando los oligonucleótidos PTac y TacR. Carril 2: Utilizando el plásmido pUMAtackmgusA 62 y 82 como DNA molde. Carril 3: Utilizando el DNA genómico de la cepa AEIV de *A. vinelandii* como control negativo. Carriles 4 y 5: Utilizando DNA genómico de las cepas *melA*::pUMAtackmgusA 62 y 82, se obtuvo una candidata 62 (gel de la izquierda) y dos 82 (gel de la derecha).

Posteriormente se determinó la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en medio Burk-Sacarosa líquido, inducida a las 12 horas de crecimiento con 500  $\mu$ M de IPTG (Grafica 1). Se colectaron células a las 24, 36 y 48 horas de crecimiento, sin y con la inducción con IPTG.



Grafica 1. Actividad  $\beta$ -glucuronidasa de la cepa *meIA::pUMAtacKmgusA62* y *meIA::pUMAtacKmgusA82* sin y con la inducción de IPTG 500  $\mu$ M comparado con la cepa silvestre AEIV.

Las cepas que contienen clonado el gen que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa presentan actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa con la inducción por IPTG 500  $\mu$ M. En ausencia del inductor, el sistema se encuentra apagado.

Con este resultado se puede afirmar que el promotor *tac* utilizado en el sistema y el sistema en general, funcionan para la expresión de proteínas. Sin embargo, la actividad resultante de las mediciones es muy baja, la expresión media de un gen de *Azotobacter vinelandii* es de 15 a 20 Unidades, la expresión obtenida no se acerca por mucho a una sobre-expresión.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

En *A. vinelandii* la inestabilidad de plásmidos ha orillado en muchos de los casos a integrar por recombinación sencilla (o co-integración) a su cromosoma plásmidos con genes para realizar complementaciones genéticas, o bien generar fusiones génicas cromosomales por recombinación en el locus a estudiar generando mutaciones por inserción con la desventaja inherente de la mutación en el gen a estudiar. Por lo anterior nuestro grupo de trabajo decidió recientemente generar una familia de vectores integrativos que permiten integrar en un locus neutro material genético diverso. El blanco neutro de recombinación elegido fue el gen *melA*, gen que codifica para una  $\alpha$ -galactosidasa involucrada en el metabolismo de la melibiosa.

Para dirigir la transcripción de un gen en los sistemas de expresión, se utilizan promotores constitutivos o promotores inducibles, y para elegir el promotor más adecuado se tomaron en cuenta las características de los candidatos, considerando las ventajas y desventajas de los promotores inducibles o modulables y los constitutivos o no modulables.

En *A. vinelandii* se ha utilizado el promotor constitutivo de la girasa (*girA*) con alta eficiencia para restaurar el fenotipo de la producción de alginato en una cepa *gacA* cuando se sobre-expresa a RsmZ1, este promotor tiene la ventaja de que se produce transcrito en grandes cantidades, sin embargo, este no es modulable y por lo cual cantidad del producto génico no puede ser controlada.

Los promotores inducibles tienen la ventaja de que pueden producir grandes cantidades de proteína o el producto génico deseado pero de manera regulada, por lo que se puede controlar el tiempo en el que la bacteria empiece a producirlo y regular la cantidad. Como promotor inducible tenemos por ejemplo al promotor pBAD, el promotor del operón Arabinosa. La utilización de este promotor resulta en altos niveles del producto inducido en un medio que contenga arabinosa, y *A. vinelandii* es incapaz de asimilar este azúcar por lo que este promotor no sirve en nuestro modelo. El promotor de sacarosa resultaba un buen candidato, sin embargo, todos los experimentos y resultados obtenidos en el laboratorio, se han hecho utilizando como fuente de carbono a la sacarosa, de manera que resulta un inconveniente ahora utilizarla como inductor.

Finalmente se llegó al sistema *tac*, de cuyas características se hablará a continuación y el cual ya se había usado con éxito en la cepa DJ (UW) de *A. vinelandii*, por lo que fue un motivo para la elección de este como promotor en el sistema (Brewin- Drummond, 1999).

Al vector pUMA se le ligó un casete tomado del vector pYanni1 que contiene los elementos necesarios para realizar expresión controlada de genes a partir del promotor híbrido *tac*. Al vector se le llamó pUMAtackM.

El pTac se considera un promotor fuerte, pues es muy afín a la RNA polimerasa al utilizar la secuencia -35 del pTrp y la secuencia -10 del pLac. Posee el operador *lac* y una mutación en la secuencia del represor (*lacI<sup>q</sup>*) que produce mayor cantidad de la proteína represora. Esto le provee de una muy alta regulación, pero cuando el sistema es inducido, empieza a transcribir a un ritmo acelerado.

El promotor *tac* es un sistema de expresión ampliamente utilizado, este promotor híbrido comúnmente es usado para la expresión controlada de genes foráneos a niveles altos en *E. coli*. De acuerdo a lo reportado por Boer *et al.* en 1983, este promotor es más eficiente para direccionar la transcripción, de 7 a 11 veces más que el pLac y de 2 a 3 que el pTrp. Además permite la acumulación del 15-30% de la proteína celular total (Terpe, 2006). La máxima expresión observada primero por Boer *et al.* en 1983 y después por Arfman *et al.* en 1992, fue con 1 mM de IPTG en *E. coli* y *Z. mobilis*, aunque la inducción significativa se vio desde 10 a 100  $\mu$ M de IPTG.

En *Pseudomonas fluorescens*, la bacteria filogenéticamente más cercana a *Azotobacter vinelandii*, se ha utilizado el promotor *lac* y también el promotor *tac* para sobre-expresar pequeños RNAs reguladores de la familia Rsm.

Aarons *et al.* en el 2000, reportan haber utilizado el promotor *lac* en un plásmido en el que sobre-expresaron al pequeño RNA regulador *prxB* en *P. fluorescens* F113. Con la sobre-expresión demuestran que los genes involucrados en la producción de 2,4-diacetilphloroglucinol y Cianuro de Hidrogeno se encuentran bajo la regulación del sistema GacS/GacA a través del intermediario *prxB*. La sobre-expresión fue realizada utilizando el plásmido pBBR1MCS, el cual no contiene la secuencia que codifica para su represor *Lacl*, y no se menciona la concentración de IPTG que se utilizó para la inducción del sistema.

En el 2002, Heeb *et al.* en un estudio parecido en *P. fluorescens* CHA0, hablan más ampliamente de los genes reportados que se encuentran controlados por GacA en esta bacteria, estos genes son: *hcnABC* para la sintasa de HCN, *aprA* para la mayor exoproteasa, y *phiACBDE* para las enzimas involucradas en la biosíntesis del 2,4-diacetilphloroglucinol. El gen *rsmZ* fue puesto bajo el control del promotor *tac* en el plásmido pME6359, un derivado del plásmido pJF118EH (un vector de alto número de copias que si posee el gen que codifica para el represor *Lacl<sup>q</sup>*). La clonación se realizó de tal manera que el sitio +1 del promotor *tac* coincidiera con el primer nucleótido de *rsmZ*1. Para probar el efecto de la sobre-expresión de este gen sobre el

sistema, se obtuvieron cepas con fusiones traduccionales en los genes involucrados en la síntesis de HCN y de la exoproteasa (*hcnA'*-*lacZ* y *aprA'*-*lacZ* respectivamente). En la cepa CHA806 ( $\Delta$ *gacS aprA'*-*lacZ*), aun sin la inducción por IPTG, las actividades  $\beta$ -galactosidasa fueron similares a la cepa CHA805 (*gacS*<sup>+</sup> *aprA'*-*lacZ*), indicando que el exceso de RsmZ puede restaurar la expresión de *aprA* en una mutante *gacS*. Cuando el plásmido pME6359 fue introducido en la cepa CHA89.207 (*gacA*<sup>-</sup> *hcnA'*-*lacZ*), las actividades  $\beta$ -galactosidasa fueron mucho más altas que las de la cepa *gacA*<sup>+</sup>, indicando que RsmZ puede elevar los niveles de expresión de *hcnA* a niveles superiores que en la cepa silvestre. Las inducciones se realizaron con 1 mM de IPTG.

En *A. vinelandii*, se ha utilizado el promotor *tac* en la cepa UW. En 1999, Brewin *et al.* se encontraban investigando la liberación de amonio al medio en mutantes *nifL*. Lo que observaban era que cuando se truncaba el dominio C- terminal por medio de una inserción de un *cassette* de resistencia, o se removía el extremo N-terminal por medio de una deleción, *A. vinelandii* liberaba al medio más de 15 mM de Amonio, en fase estacionaria. Se preguntaron si NifL estaba involucrada en un sistema de transporte de amonio, pero no encontraron evidencias. La otra opción era que como NifL inhibe a NifA en presencia de Amonio, altas concentraciones de oxígeno o reducida carga energética, y a su vez, NifA inhibe la transcripción de los genes *nif*; al estar mutado NifL, NifA se encontraba activo aun en presencia de Amonio, y se mostraba una expresión prolongada de la nitrogenasa, lo que conllevaba a un aumento de la producción de Amonio que se acumulaba en el citoplasma, el cual de manera pasiva tendía a abandonar a la célula. Para obtener conclusiones, sobre-expresaron a NifA a partir de un promotor *tac*, en un vector integrativo que ellos mismos diseñaron, de manera que al recombinar en el cromosoma de *A. vinelandii*, el promotor *tac* quedaba río arriba de un fragmento corto repetido del gen *nifA* (donde recombinó) seguido inmediatamente del gen *nifA* silvestre intacto. El fragmento integrado llevaba consigo el gen que codifica para la proteína represora LacI<sup>q</sup>, por lo que la cantidad de NifA podía ser regulada a nivel transcripcional. Se utilizó 200 mM de IPTG. En ausencia de IPTG, las cepas *ptac-nifA* fueron Nif<sup>-</sup>, pero en su presencia, crecieron diazotroficamente y liberaron Amonio al medio excediendo los 35 mM aunque NifL estuviera intacta o no.

En este trabajo se clonaron delante del promotor *tac* los genes que codifican para los pequeños RNAs reguladores de la familia Rsm y RgsA de *A. vinelandii* en el plásmido integrativo pUMAtacKm. La inducción en las cepas *gacA*<sup>-</sup> se realizó con 500  $\mu$ M, 1 mM, 1.5 mM y 2 mM de IPTG, abarcando las concentraciones óptimas de inductor que se han contemplado en la literatura, se agregó el inductor, en un primer experimento a las 0 hrs de crecimiento y después a las 12 hrs de crecimiento en medio Burk-Sacarosa con el antibiótico correspondiente, las células se recolectaron a las 24, 36 y 48 hrs de crecimiento. Se esperaba en una primera estancia y como control positivo, que la sobre-expresión de RsmZ1 restaurara el fenotipo de la producción de alginato en una

cepa de *A. vinelandii* AEIV *gacA*, lo cual ya está reportado. Con esto confirmaríamos que el sistema funcionaba y se podría hacer comparable el efecto de la sobre-expresión del resto de los pequeños RNAs reguladores de manera individual sobre la producción de alginato. Sin embargo, la expresión de RsmZ1 a partir del promotor *tac* no restauró la producción de alginato en la mutante *gacA*, y lo mismo sucedió con el resto de las cepas.

El funcionamiento del sistema pUMA*tackM* se había probado con anterioridad clonando un gen reportero *gusA* delante del promotor *tac* e induciéndolo con IPTG, y si presentó actividad  $\beta$ -glucuronidasa, sin embargo, esto se realizó en una cepa de *Azotobacter vinelandii* diferente a la utilizada para este estudio, por lo que se volvió a transformar el plásmido ahora en la cepa AEIV y se determinó la actividad  $\beta$ -glucuronidasa inducida con 500  $\mu$ M de IPTG. Los resultados de las dos cepas obtenidas muestran actividades de 2-4 Unidades  $\beta$ -glucuronidasa/ $\mu$ g de proteína, lo que representa una actividad baja.

Para comparar la expresión de los pequeños RNAs reguladores en el sistema, se realizó un *Northern Blot* para RsmZ2. En este se observó que RsmZ2 es transcrito en grandes cantidades en la cepa silvestre, mientras que en la cepa *gacA*<sup>-</sup> a la que se le sobre-expresó el RsmZ2 a partir del promotor *tac*, el nivel de transcrito no es suficiente para alcanzar los niveles producidos por la cepa silvestre.

Estos datos nos dieron indicio de que algo diferente estaba ocurriendo en *A. vinelandii* con el sistema del promotor *tac*. Buscando en el genoma de *A. vinelandii*, a pesar de no metabolizar la lactosa, encontramos ocho proteínas pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales LacI. A diferencia de solamente dos proteínas pertenecientes a la misma familia encontradas en *P. fluorescens* F113.

En 1993, Ezaz-Nikpay *et al.*, sugieren que la disociación del represor Lac está cinética y termodinámicamente acoplada a la formación de un complejo transcripcional abierto. En este modelo, la RNA polimerasa está lista para iniciar la síntesis de los RNAs mensajeros, y la disociación del represor Lac del operador es rápidamente seguida por la iniciación de la transcripción. Bajo condiciones en las cuales, *la concentración intracelular de represor es cercana a la concentración de sitios del operador*, la concentración relativa de RNA polimerasa es alta y el promotor es fuerte, una simple disociación del represor Lac de un complejo transcripcional listo, resultara en un gran número de eventos de transcripción antes de que la represión sea re-estabilizada.

La sobre-expresión de RsmZ1 reportada por Manzo *et al.* (2011) y que restauró la producción de alginato en la mutante *gacA* fue hecha utilizando el plásmido de amplio rango de hospedero pJB3Tc20, en el que el gen *rsmZ1* fue clonado bajo el control del promotor *lac*, y que no contiene la secuencia de la proteína represora LacI en su

secuencia, por lo cual podría ser que la cantidad de operadores y de represores estuvo en niveles aptos para permitir la sobre-expresión del pequeño RNA regulador. Cabe mencionar que este sistema en plásmido no era estable, perdiéndose a veces el fenotipo.

La sobre-expresión de PrrB realizada por Aarons *et al.* (2000) en *P. fluorescens* fue también con el promotor *lac* en un plásmido pBBR1MCS que no contiene la secuencia codificante para la proteína represora. Y la sobre-expresión de RsmZ1 de *P. fluorescens* por Heeb *et al.* (2002), fue hecha a partir de un promotor *tac*, en un derivado del plásmido pJF118EH multicopia que si posee la secuencia para el represor  $\text{Lacl}^{\lambda}$ . El hecho de que en el genoma de esta bacteria solo existan dos proteínas presuntamente de la familia de reguladores *Lacl*, hace que en un plásmido multicopia la transcripción de lo que hay clonado río abajo del promotor, se transcriba sin menor problema.

Para el caso de la sobre-expresión que fue realizada por Brewin *et al.* en 1999 con el promotor *tac* en *A. vinelandii*, hipotetizamos que si la expresión de NifA hubiera sido mayor, se hubieran obtenido concentraciones de Amonio que pudieron haber sido deletéreos para la bacteria, por lo que la expresión utilizando el promotor *tac* no fue tan fuerte y así permitió observar el efecto de la expresión sostenida, controlada y prolongada de NifA sobre la liberación de amonio al medio.

Con estos ejemplos, llegamos a nuestro modelo, en el cual además de los ocho represores putativos de la familia *Lacl* presentes en el genoma de *A. vinelandii*, el vector pUMAtackKm lleva su propio represor  $\text{Lacl}^{\lambda}$ , lo que contrasta con lo descrito por Ezaz-Nikpay *et al.* (1993) y que dice que para que el sistema de expresión funcione correctamente, la concentración intracelular de represor debe ser cercana a la concentración de sitios del operador. En nuestro caso posiblemente tenemos un exceso de represor que supera los sitios del operador, por lo que al inducir con la concentración de IPTG utilizada en otros modelos no alcanza a inactivar el represor y no se permiten niveles de transcripción tan altos como los de la cepa silvestre para restaurar la producción de alginato.

El hecho de que un plásmido no lleve la secuencia codificante para la proteína represora, confiere la desventaja de que puede existir una baja represión del sistema, el cual puede estar activo aun en ausencia de inductor, esto en algunos casos puede ser perjudicial para la bacteria y para los fines de los experimentos, llevando el sistema a lo que se le conoce como “fuga transcripcional”.

Las características de un promotor deseable son: deber ser un promotor fuerte, tener un bajo nivel de expresión basal (es decir, estar altamente regulado), ser fácilmente

transferible a otra cepa y que la inducción pueda ser simple y rentable, además de que sea independiente de los componentes comúnmente utilizados en el medio de cultivo (Terpe, 2006). Para nuestros fines, el sistema pUMAtackM en *A. vinelandii* no posee un promotor deseable, pues quizá necesita una cantidad exacerbada de inductor para permitir la sobre-expresión, lo cual no es económicamente rentable.

Un resultado similar al de este trabajo con la utilización del sistema *tac* para la sobre-expresión, se encontró en el grupo que trabaja con *A. vinelandii* en el Instituto de Biotecnología-UNAM. A la par que nosotros, estuvieron trabajando entre muchas cosas, con la sobre-expresión de un pequeño RNA regulador llamado *crcZ* en una cepa mutante *cbrA*, esta cepa tenía bajos niveles de transcripción de *crcZ* y producía una gran cantidad de alginato que sobrepasaba a la silvestre. Su hipótesis era que al sobre-expresar a *crcZ*, el nivel de alginato producido volvería a los valores normales. Usaron un sistema de expresión con el promotor *tac*, sus cinéticas de actividad  $\beta$ -glucuronidasa aumentaban conforme al tiempo de cultivo y el aumento en la concentración de IPTG, pero como lo que observamos nosotros, la actividad fue baja, ellos utilizaron concentraciones de entre 0 y 500  $\mu$ M de IPTG y encontraron actividad de entre 0 y 1.4 U  $\beta$ -glucuronidasa. No pudieron observar el efecto que esperaban de la disminución de alginato por la sobre-expresión de *crcZ* a partir del promotor *tac*. En un experimento posterior en el que trataban de sobre-expresar a la proteína *crc*, no pudieron concluir utilizando el promotor *tac*, por lo que decidieron utilizar el propio promotor constitutivo de la proteína (Quiroz, 2012).

Un experimento interesante sería eliminar la secuencia del represor  $\text{LacI}^q$  del vector pUMAtackM e inducir por ejemplo, la transcripción del gen *gusA*, esperando que con esta modificación aumente el nivel de expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa.

Para alcanzar el objetivo de observar el efecto de la sobre-expresión de cada pequeño RNA regulador sobre la producción de alginato, se ha pensado en utilizar el mismo sistema integrativo, pero con un promotor constitutivo como el de *gyrA*, de manera que el estudio nos de una visión general de la participación de cada pequeño RNA regulador en la síntesis del polímero, para después ahondar más utilizando otro promotor modulable.

Recientemente, se ha sugerido la utilización del promotor de la síntesis de melibiosa como promotor modulable, para lo cual se tendría que elegir otro blanco neutro de recombinación para los vectores integrativos y además caracterizar el sistema de la metabolización de Melibiosa en *A. vinelandii* del cual se sabe poco en la actualidad, antes de empezar a trabajar con él y utilizar este azúcar como inductor.

Por otra parte, Heeb *et al.*, en su artículo de 2002, que se ha venido mencionando, enfatiza en que clonó el gen de *rsmZ* justamente para que el sitio +1 correspondiera al primer nucleótido de tal gen. Al observar detenidamente la secuencia del promotor *tac* en el plásmido pUMA*tac*Km, se observó que existe una secuencia de 43 bp después del sitio +1 del promotor hasta el sitio *Eco*RI donde fueron clonados los genes que codifican para los pequeños RNAs reguladores. Aunado a estas bp, los genes estructurales escindidos del vector pGEM-T Easy arrastran 15 bp del sitio de múltiple clonación del mismo vector. Juntando estas secuencias, hay 58 bp que posiblemente pudieran estar interviniendo en la formación de la estructura secundaria correcta de tallos y asas de los pequeños RNAs reguladores y por lo tanto estar comprometiendo su actividad, considerando que la longitud de los pequeños RNAs reguladores es de entre 100 y 200 bp. Esto no sucedería en el caso de las proteínas clonadas bajo el promotor en el sistema, al poseer el sitio de unión a ribosoma. Para determinar la estructura de la secuencia completa que tenemos clonada delante del promotor *tac*, se utilizó el programa MFOLD, y el resultado fue la deformación total de las estructuras secundarias de los pequeños RNAs, sin embargo, las asas con los motivos GGA siguen estando presentes en la mayoría de los casos. Las figuras se encuentran en el anexo 3.

Es importante que en los trabajos subsecuentes, se tome en cuenta este aspecto, ya que la formación de la estructura secundaria correcta de los pequeños RNAs es clave para el funcionamiento de estos y que puedan llevar a cabo su papel del secuestro de RsmA.

---

## 10. CONCLUSIONES

---

1. La transcripción dirigida por el promotor *tac* del sistema *melA::tacKm* en *A. vinelandii* no es suficiente para “sobre-expresar” los genes clonados bajo su promotor.
2. La expresión de los pequeños RNAs reguladores a partir del promotor *tac* en el vector integrativo pUMA*tacKm* no restauró la producción de alginato en la cepa AEIV *gacA*<sup>-</sup> de *A. vinelandii*.
3. No fue posible observar el efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm sobre la producción de alginato utilizando el sistema *mel::tacKm*.

---

## 11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

---

Estudiar el efecto de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores sobre la producción de alginato en mutantes *gacA* utilizando para ello al promotor constitutivo *gyrA*.

Ahondar en estudio del sistema de la utilización de la melibiosa por *A. vinelandii* para poder utilizar este azúcar como inductor y posteriormente utilizar su promotor en un vector de integración que sirva para el estudio de la sobre-expresión de los pequeños RNAs reguladores Rsm, entre otros múltiples usos.

## 12. ANEXOS:

### Anexo 1: Cepas y plásmidos

		Características relevantes	Fuente de referencia
<i>E. coli</i>	DH5- $\alpha$	<i>SupE44, <math>\Delta</math>lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Gibco BRL
<i>A. vinelandii</i>	AEIV	Fondo silvestre.	Bush <i>et al</i> ; 1959
<i>A. vinelandii</i>	E $\Delta$ BM2	Cepa a la que le fue deletado el gen <i>rsmZ1</i> y un fragmento de la región flanqueante río arriba.	Verónica M. Martínez, Tesis de maestría (2004).
<i>A. vinelandii</i>	E $\Delta$ B2	Cepa a la que le fue deletado el gen <i>rsmZ1</i> .	Verónica M. Martínez, Tesis de maestría (2004).
<i>A. vinelandii</i>	E $\Delta$ C1	Cepa a la que le fue deletado el gen <i>rsmZ1</i> .	Thomas Tzontecomani, Tesis de licenciatura (2010).
<i>A. vinelandii</i>	E $\Delta$ rsmD	Cepa a la que se le deletó el gen <i>rsmZ3</i> .	Patricia Domínguez, Tesis de licenciatura (2011).
<i>A. vinelandii</i>	<i>melA::pUMAtacKm rsm</i>	Cepas a las que se les integró el plásmido <i>pUMAtacKm rsm</i> mediante doble recombinación homóloga.	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i>	<i>melA::pUMAtacKm rsm gacA</i>	Cepa derivada de la <i>melA::pUMAtacKm rsm</i> a la que se le interrumpió el gen <i>gacA</i> con un <i>cassette</i> de resistencia a Kanamicina	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i>	<i>melA::pUMAtacKm</i>	Cepas a las que se les integró el plásmido <i>pUMAtacKm gusA</i>	Este trabajo

	<i>gusA62</i> y 82	mediante doble recombinación homóloga.	
<b>Plásmidos</b>			
	pGEM <i>rsmZ1</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ1</i> , Ap <sup>R</sup>	Yolanda Goiz, Tesis de Maestría (2008).
	pGEM <i>rsmZ2</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ2</i> , Ap <sup>R</sup>	Joaquín Manzo, Tesis de Licenciatura (2008)
	pGEM <i>rsmZ3</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ3</i> , Ap <sup>R</sup>	Patricia Domínguez, Tesis de Licenciatura (2011).
	pGEM <i>rsmZ4</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ4</i> , Ap <sup>R</sup>	Patricia Domínguez, Tesis de Licenciatura (2011).
	pGEM <i>rsmZ5</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ5</i> , Ap <sup>R</sup>	Patricia Domínguez, Tesis de Licenciatura (2011).
	pGEM <i>rsmZ6</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ6</i> , Ap <sup>R</sup>	Liliana García, Tesis de Maestría (2011).
	pGEM <i>rsmZ7</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmZ7</i> , Ap <sup>R</sup>	Liliana García, Tesis de Maestría (2011).
	pGEM <i>rsmY1</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmY1</i> , Ap <sup>R</sup>	Juan Luis Terán, Tesis de Maestría (2011).
	pGEM <i>rsmY2</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmY2</i> , Ap <sup>R</sup>	Juan Luis Terán, Tesis de Maestría (2011).
	pGEM <i>rsmY1Y2</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rsmY1Y2</i> , Ap <sup>R</sup>	Juan Luis Terán, Tesis de Maestría (2011).
	pGEM <i>rgsA</i>	Vector de clonación pGEM-T Easy Vector que contiene clonado al gen <i>rgsA</i> , Ap <sup>R</sup>	Israel, Aguilar Tesis de Licenciatura (2011).
	pUMA <i>tacKm</i>	El vector pUMA <i>TacKm</i> se construyó a partir del vector pUMA al cual se le ligó en el sitio <i>XhoI</i> del gen <i>meIA</i> (base 568) el locus <i>Ptac</i> -amplificado sobre el vector pYanni2 con cebadores que contienen un sitio <i>XhoI</i> - y un cassette de resistencia a Kanamicina –obtenido del vector pBSL197 con una restricción <i>XhoI</i> -. Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Estefanía Morales, Tesis de Licenciatura (2013).

---

pSAFA3	Plásmido con una mutación en el gen <i>gacA</i> , <i>gacA</i> ::Gm	Castañeda <i>et al</i> , 2001.
pUMAtac KmgusA6 2 y 82	Plásmido derivado del pUMAtacKm que contiene clonado un gen <i>gusA</i> delante del promotor <i>tac</i> , la diferencia entre el 62 y el 82 es la posición en la que se clonó el gen de resistencia a Kanamicina.	Este laboratorio.
pUMAtac Km $rsm$	Plásmido derivado del pUMAtacKm al que le fue clonado por separado un sRNA regulador Z1-Z6, Y1Y2, Y1, Y2, <i>rgsA</i> .	Este trabajo

---

## Anexo 2: Técnicas y medios de cultivo

### Medios de cultivo

<i>Escherichia coli</i>	
<b>Medio Luria Bertani</b>	gr/L
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar bacteriológico	15

<i>Azotobacter vinelandii</i>	Medio Burk-sacarosa
	Concentración gr/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Sacarosa	200
CaCl <sub>2</sub>	7.3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.3
FeSO <sub>4</sub>	5
NaMoO <sub>4</sub>	0.2
MgCl <sub>2</sub>	160
Agar bacteriológico	15

<i>Azotobacter vinelandii</i>	Medio de competencia (CM)
	Concentración gr/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Sacarosa	200
CaCl <sub>2</sub>	7.3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.3
MgCl <sub>2</sub>	160
Agar bacteriológico	15

### Extracción de DNA plasmidico

**Lisis alcalina:** la cepa de *E. coli* se cultiva en medio LB (5 ml) durante 12 hr a 37°C con el antibiótico correspondiente. El paquete celular se lava con MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Las células se resuspenden en 100 µl de la solución I (glucosa 50 mM, EDT 10 mM, Tris HCl 25 mM pH 8) fría, se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 200 µl de la solución II recién preparada (NaOH 0.2 N y SDS 1%) incubándose 5 min a temperatura ambiente. Se añade 150 µl de una solución III de Acetato de Potasio 5 M y ácido acético glacial, pH 4.8. Se incuba 15 min en hielo y posteriormente se centrifuga a

13000 rpm por 15 min. El sobrenadante se pasa a un tubo eppendorf nuevo y se procede a realizar la metodología de purificación con sílica.

### ***Protocolo de purificación de DNA con sílica***

Agregar dos volúmenes de buffer de unión NaI y 10 µl de sílica, resuspender e incubar 5 min a temperatura ambiente, centrifugar 1 min y decantar el sobrenadante. Hacer tres lavados con buffer de lavado (Etanol 50%, Tris-HCl 20 mM y NaCl 0.1M). Secar la pastilla a 55°C, después agregar 30 µl de RNasa diluida e incubar a 37°C durante una hora. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y correr la muestra en un gel de agarosa al 1% para verificar que la extracción haya sido exitosa.

### ***Digestiones con EcoRI***

Las digestiones fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante Thermo scientific.

### ***Defosforilación***

La Defosforilación se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones de fabricante Invitrogen, se utilizó la enzima Fosfatasa alcalina (CIAP). La reacción se llevó a cabo incubando a 50°C durante 45 min, posteriormente se inactivó por calor a 65°C durante 15 min.

### ***Ligación***

Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa de Promega de acuerdo a las condiciones del fabricante. Se dejó incubar la reacción toda la noche a 4°C. Posteriormente se precipitó con 1 µl de glucógeno y 500 µl de Isopropanol, se llevó a incubar a -70°C durante 15 min y se centrifugó a 13 000 r.p.m por 10 min. La pastilla se lavó tres veces con etanol al 70%, se secó a 37°C y se resuspendió en 10 µl de agua estéril.

### ***Preparación de células electrocompetentes de E. coli***

Se prepara un pre inóculo de 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, (para las *E. coli* DH5-α es Ácido Nalidixico 0.1 µg/ml), se deja crecer toda la noche a 37°C en agitación. Al otro día se agregan 2 ml de este a 198 ml de LB líquido sin antibiótico, se deja crecer en agitación a una temperatura de 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0.6. Se enfría el cultivo en hielo durante 20 min, posteriormente se centrifuga 10 min a 10000 rpm a 4°C. El paquete celular se resuspende en 200 ml de agua PISA estéril fría y se vuelve a centrifugar. Posteriormente el paquete celular se resuspende en 100 ml de

agua PISA estéril fría y se centrifuga de nuevo, este procedimiento se vuelve a repetir otra vez. Finalmente se decanta el agua y se resuspende en 15 ml de glicerol al 10% frío. Se centrifuga en las mismas condiciones, se decanta y con el poco glicerol que queda, se resuspenden las células y se alícuota 50  $\mu$ l en tubos eppendorf, se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### Electroporación

La ligación fue mezclada con células electrocompetentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ , se utilizó el equipo de Bio-Rad. Posteriormente las células se incubaron 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación en medio rico SOC (20 gr de peptona de caseína, 5 gr de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 10 ml de KCl 250 mM, 5 ml de  $\text{MgCl}_2$  2 M, y 20 ml de glucosa 1 M para 1 L de medio, pH 7). Después se plaquearon 300  $\mu$ l de estas células en placas de medio LB con Ap (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y Km (0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se dejaron crecer 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Reacción en cadena de la polimerasa

Las condiciones de las PCRs para determinar las orientaciones de los genes clonados en el plásmido pUMAtac se muestran en las siguientes tablas, en general se ocuparon 30 ciclos y el tiempo de extensión dependió del tamaño del amplificado esperado siguiendo el principio de 1 Kb por minuto.

gen	Fw	Rv	Peso del gen	Peso del Amplicón	Tm	Tiempo de elongación
<i>rsmZ1</i>	rsmB5'	TacR	131 bp	744 bp	60	1 min
<i>rsmZ2</i>	RsmCseq	TacR	167 bp	808 bp	60	1 min
<i>rsmZ3</i>	DsonrsmD	TacR	164 bp	774 pb	60	1 min
<i>rsmZ4</i>	Eed	TacR	164 bp	736 bp	55	1 min
<i>rsmZ5</i>	Fed	TacR	162 bp	736 bp	58.6	1 min
<i>rsmZ6</i>	Ged	TacR	164 bp	795 bp	60	1 min
<i>rgsA</i>	DsonrgsA	TacR	143 bp	727 bp	54	1 min
<i>rsmY1Y2</i>	YeD	TacR	313bp	954 bp	60	1 min
<i>rsmY1</i>	PTac	YeRv	115 bp	150 bp	60	1 min
<i>rsmY2</i>	PTac	XeFw	131 bp	217 bp	60	1 min
	PTac	TacR	varia	varia	60	varia

Nombre	sRNA correspondiente	Secuencia	Tm reportada por el fabricante
rsmB5'	Z1	5' GTC GAT GGA ACG ACG TCG GCT GAC 3'	72.29
RsmCseq	Z2	5' GTC GAC GGA GCG ACG CGG GTT GTC 3'	75.12
DsonrsmD	Z3	5' GGCGATCCCGGTAGATTCAT 3'	66.45
Eed	Z4	5' AAGGCGTCGA AGGATCGACG 3'	64
Fed	Z5	5' GTCGAAGGAACGACGCAGGC 3'	66
Ged	Z6	5' CGTCGACGGTACCACGCAAGCC 3'	72.73
DsonrgsA	rgsA	5' ACTGACGTGGCATTTC 3'	64.44
YeD	Y1Y2	5' GGGCGTCGCGCAGGAAGC 3'	72
YeRv	Y1	5' GCGCGATCTCCCTATCATC 3'	55.2
XeR	Y2	5' GTCCGCGGCTGAGTCAA 3'	68.2
TacR		5'CTCGAGAATAAGGGCGACACGGAAAT3'	60
Ptac		5' ACAATTAAT CATCGGCTCGTAT 3'	50

### *Extracción de plásmidos mediante Maxi-Prep*

Se parte de un cultivo de 50 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente. Las células se centrifugan 5 min a 6000 rpm y se lavan con  $MgSO_4$  10 mM. El paquete celular se resuspende en 1.5 ml de solución I (descrito para la lisis alcalina), posteriormente se agregan 3.5 mililitros de la solución II preparada en ese momento. Se deja reposar 10 min en hielo. Se agrega 2.5 ml de la solución III, se invierte lentamente el tubo y se incuba 20 minutos en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 6000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio. Se agrega un volumen de Isopropanol y se incuba en hielo 5 min. Se centrifuga a 6000 rpm durante 10 min, la pastilla resultante se lava 3 veces con etanol al 70%, se retira todo el etanol, se seca a 55°C y posteriormente se resuspende en 200  $\mu$ l de RNasa diluida.

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

Subcultivar la cepa de interés en una placa de medio BS fresco con el antibiótico correspondiente con el propósito de aislar una colonia, esta se subcultiva en una placa de medio CM sin antibiótico por 48 hr a 30°C. A partir de esta placa se subcultiva en otra placa de medio CM mediante estriado masivo, se incuba 48 hr a 30°C. Después se recuperan todas las células de la placa y se inoculan en 50 ml de medio CM líquido, se incuban 48 hr a 30°C a 200 rpm. Se recuperan las células por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Las células se lavan con  $MgSO_4$  10 mM o con CM. Las células se resuspenden en 1 ml de medio CM 16 mM  $MgSO_4$  (840  $\mu$ l de CM y 160  $\mu$ l de  $MgSO_4$  0.1 M). Las células así preparadas pueden durar hasta 15 días en refrigeración sin perder

la competencia o se pueden guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$  adicionando glicerol al 14%. El estriado masivo puede realizarse hasta 3 veces seguidas.

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

Se mezclan en un tubo eppendorf 200  $\mu\text{l}$  de células competentes y 50  $\mu\text{l}$  de DNA obtenido por Maxi-Prep, la mezcla se deposita en una placa de medio CM, se deja secar completamente y se incuba 48 hr a  $30^{\circ}\text{C}$ . Después se recogen todas las células de la placa, se lavan con 1ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM o con BS, se retira todo el alginato, se resuspenden en 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM o de BS y se plaquean en una placa de medio BS con los antibióticos correspondientes. Esta placa se deja incubando 48 hrs a  $30^{\circ}\text{C}$ .

### ***Extracción de DNA genómico de A. vinelandii***

Se siembra un cultivo de 25 ml con el antibiótico correspondiente, se deja incubando a  $30^{\circ}\text{C}$ , 48 hrs a 200 rpm, se recolectan las células por centrifugación. Las células se lavan con  $\text{MgSO}_4$  10 mM hasta quitar todo el alginato. El paquete celular se resuspende en 450  $\mu\text{l}$  de TE 50/20. Se agregan 50  $\mu\text{l}$  de lisozima (10 mg/ml) y se incuba 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . se agrega 50  $\mu\text{l}$  de proteasa (10mg/ml) y se incuba 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , se agregan 50  $\mu\text{l}$  de SDS 10% y se incuba 15min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se agregan 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M, se mezcla y se incuba 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . Se adiciona 80  $\mu\text{l}$  de CTAB 10% NaCl 0.7M previamente incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  y se incuba de 15 a 20 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . Se extrae una vez con un volumen de cloroformo-álcool isoamilico 24:1, se vortexea y se centrifuga 5min a 13000 rpm. Se recupera el sobrenadante y se pasa a un tubo nuevo. Se agregan 10  $\mu\text{l}$  de sílica, se deja reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga, se decanta el sobrenadante y la pastilla se lava 3 veces con el buffer de lavado ya descrito. La pastilla se deja secar a  $55^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se resuspende en 30  $\mu\text{l}$  de RNasa diluida, se incuba 1hr a  $37^{\circ}\text{C}$  y después se centrifuga, se recupera el sobrenadante y se almacena en congelación.

### ***PCR para confirmar las mutantes en gacA***

Se utilizó un par de oligonucleótidos llamados wtgacAD y wtgacAR (cuyas secuencias son 5'ATTAGGGTGCTTGTGGTTCG3' y 5'GGACAAGCGTTTCCTGAGA3' respectivamente),  $T_m$   $60^{\circ}\text{C}$ , 2 min de elongación, 30 ciclos. El amplificado en la cepa AEIV es de 773 bp (ausencia de la mutación en *gacA*), mientras que en las cepas mutantes es de 1573 bp, correspondiente a la inserción de un *cassette* de resistencia a Gentamicina que interrumpe al gen *gacA*. Esto se lleva a cabo utilizando el plásmido pSAFA3.

### ***PCR para la cepa melA::pUMAtacKmgusA***

Para confirmar que la recombinación se hubiera llevado a cabo, se utilizó el par de oligonucleótidos llamados PTac y TacR, Tm 60°C, 2.5 min de elongación, 30 ciclos.

### ***Cuantificación de proteína por el método de Bradford***

Resuspender la pastilla de células en ml de MgSO<sub>4</sub>, tomar 50 µl de esta muestra, y resuspender en 450 µl de agua PISA. Agregar 500 µl del reactivo de Bradford, reposar 10 min a temperatura ambiente.

Para el blanco, tomar 500 µl de agua y 500 µl del reactivo de Bradford.

Correr al mismo tiempo una curva de calibración con 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg /ml de proteína.

Leer las absorbancias a 595 nm y posteriormente hacer la regresión lineal, determinar las concentraciones de proteína a las que corresponden estas absorbancias y multiplicarlo por el factor de dilución 20.

### ***Determinación de la actividad β-Glucuronidasa***

Lisozima 10 mg/ml

PNPG 4 mg/ml (12.5 mM), mantener en congelación 1 a 2 meses máximo.

NaCO<sub>3</sub> 1.2 M.

Triton 100X, 10% vol/vol de triton en agua destilada.

Buffer Z:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 M

KHPO<sub>4</sub> 0.02 M

EDTA 0.001 M

DTT 0.005 M

Mantener congelada.

1. Hacer un precultivo de 18 horas con el antibiótico correspondiente en medio BS, posteriormente pasar 1 ml de este a nuevo caldo con el antibiótico correspondiente, incubar por 48 hr a 30°C.
2. Tomar una muestra de 1 ml de cultivo o más dependiendo de la densidad celular hasta obtener un paquete celular de buen tamaño.
3. Resuspender la pastilla en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
4. Tomar 20 µl de esta muestra (volumen de reacción) o de alguna dilución de la muestra y agregar 710 µl del amortiguador Z. Procesar con las muestras un blanco con 730 µl de amortiguador Z.
5. Agregar 10 µl de lisozima e incubar 5 min a 37°C.
6. Agregar 10 µl de la solución de tritón 10%.
7. Agregar 100 µl de PNPG. Cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
8. Transferir los tubos a un termoblock en 28°C.
9. Agregar 150 µl de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para parar la reacción.
10. Leer la reacción a 405 nm en contra del blanco.

El coeficiente de extinción molar del PNPG es de 1800 (0.018 en 1 ml).

Determinar las unidades β-glucuronidasa mediante la siguiente fórmula:

$$Unid - B - glucu = \frac{DO (405 nm) \times 1000}{(0.018)(t' de Rx en min) (vol de Rx en ul) (ug de \frac{proteína}{ml})}$$

### Extracción de RNA

Solución I

0.3 M de Sacarosa, 0.01M de Acetato de Sodio pH 5.2

Solución II

0.01M de Acetato de Sodio pH 5.2, 2 % SDS

Acetato de sodio 3M pH 5.2

**Toma de muestras:** a partir de un cultivo de 48 hr de *A. vinelandii*, obtener un paquete celular menor al utilizado para la extracción de DNA genómico, retirar todo el alginato y lavar con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta que quede limpio. Retirar todo el MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Todo se realiza con guantes.

**Extracción:** resuspender las células en 200  $\mu$ l de la solución I helada, se agregan 200  $\mu$ l de la solución II y se mezcla con suavidad por inversión 2 o 3 veces, se colocan los tubos en un termo block a 70°C por espacio de un minuto. La solución se aclara en la mayoría de los casos, es más difícil entre más células haya. Se agregan 400  $\mu$ l de fenol caliente (65°C) y se vortexea. Se deja a 70°C durante 2 min, se vortexea de nuevo y se pone en hielo mientras se transporta a la centrifuga. Se centrifuga 10 min a 13 000 rpm en frío, se separan dos fases, tomar la fase de arriba con mucho cuidado para no contaminarla y pasarla a un tubo nuevo, se repite otra vez desde agregar 400  $\mu$ l de fenol caliente. Posteriormente se agrega 400  $\mu$ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico frío y se vortexea. Se centrifuga 10 min a 13 000 rpm en frío. Se toma la fase de arriba y se pasa a un tubo nuevo, se agregan 300  $\mu$ l de cloroformo frío, se vortexea y se centrifuga a 13 000 rpm por 10 min en frío. Se toma la fase de arriba y se pasa a un tubo nuevo con mucha precaución para que la muestra no tenga nada de cloroformo. Se agregan 15  $\mu$ l de Acetato de Sodio 3 M y 600  $\mu$ l de etanol anhidrido grado biología molecular, se deja -20°C toda la noche. Al otro día se centrifuga 15 min a 13 000 rpm en frío, se decanta el sobrenadante, se da un espín y se retira el sobrenadante que haya quedado, la pastilla se deja secando a 60°C durante tres minutos. Posteriormente se resuspende en 20  $\mu$ l de agua DEPC 0.1%. Se resuspende mejor si se dejan calentar las muestras de 5 a 10 min a 65°C. Las muestras se mantienen en congelación hasta su uso, pero es recomendable utilizarlas ese mismo día.

### *Verificar la extracción de RNA en gel de agarosa*

**MAE 5X:** MOPS 0.2 M, Acetato de Sodio 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.

**Preparación de Sample B:** para 100 ml, MAE 5X 10  $\mu$ l, Agua DEPC 0.1% 20  $\mu$ l, Formaldehído 20  $\mu$ l, Formamida 50  $\mu$ l.

**Preparación del gel de agarosa:** MAE 5X 6 ml, Agarosa 0.3 g, Agua DEPC 0.1% 24 ml. Fundir a baja potencia en el microondas.

La cámara de electroforesis se incuba con agua DEPC 0.1% por unos minutos.

Posteriormente se prepara MAE 1X diluyéndolo con agua DEPC 0.1%, y se llena la cámara.

Las muestras se preparan utilizando 7  $\mu$ l de Sample B y 3  $\mu$ l de RNA. Se incuban 15 min a 55°C o 10 min a 60°C, posteriormente se enfrían en hielo 5 min y se agrega 1  $\mu$ l de stop mix buffer (98% v/v Formamida, 10 mM EDTA, 0.025% xilencianol y 0.025% de azul de bromofenol), y 2  $\mu$ l de Bromuro de Etidio, y se carga en el gel de agarosa.

### *Transferencia a membrana hybond*

Correr las muestras (aproximadamente 500 ng/μl o la cantidad más alta que se pueda) en un gel de agarosa al 1% (MAE 5X 6 ml, agarosa 0.3 g, agua DEPC 0.1% 18.6 ml, fundir a baja potencia y cuando este tibia, agregar 5.4 ml de Formaldehído).

Correr el gel de manera normal, (como ya se describió anteriormente), tomar una foto y asegurarse que el RNA no se haya degradado, conservando la integridad de las bandas de RNA ribosomal.

**SSC 20X:** para 100 ml, NaCl 17.53 g, Citrato de Sodio 8.82 g, aforar con agua PISA, pH 7.

Lavar el gel dos veces con SSC 10X por 30 min en agitación, diluir con agua DEPC 0.1%. En un refractario se vacía aproximadamente 300 ml de SSC 10X, se pone el vidrio encima de los borde de este y se coloca el papel filtro, de manera que quede en contacto con la solución SSC, (tarda aproximadamente una hora en que todo el papel filtro se impregne de la solución). La membrana debe sumergirse en una solución de SSC 1X diluida con DEPC 0.5 % durante 10 min (aproximadamente son 20 ml). Pasado este tiempo, se coloca el gel ya lavado sobre el papel filtro cuidando que quede bien centrado, se bloquean los bordes del gel con papel parafilm, sobre el gel se coloca la membrana cuidando que sea exactamente del tamaño del gel, una punta azul se desliza sobre la membrana para no dejar burbujas de aire, con mucho cuidado para no rasgar la membrana. Después se coloca encima un papel filtro del tamaño del gel que previamente se impregnó con agua DEPC 0.1%. Encima se coloca un paquete pequeño de servitoallas del tamaño del gel y encima de este un libro pesado. La transferencia que se ha montado se balancea y se deja toda noche. Al otro día se desmonta y se marca la membrana del lado que han quedado transferidos los RNAs, se verifica que la transferencia haya sido exitosa en el fotodocumentador y se dan 2 pulsos de radiación con luz UV de 3 min. La membrana se humedece con 1 ml de agua DEPC 0.1% y se guarda a 4°C.

### *Hibridación*

La hibridación se llevó a cabo utilizando el Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II de Roche de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Marcaje de la sonda:** agregar 1 μg de DNA y diluirlo en agua PISA estéril para llegar a un volumen final de 16 μl. Desnaturalizar a 95°C por 5 min, enfriarlo en hielo por 2 min y agregarle 4 μl de la solución I de marcaje del Kit (Vial 1 Dig-High Prime), mezclar y centrifugar (espín). Incubar toda la noche a 37°C. Poner en hielo hasta su uso.

**Prehibridación:** precalentar el horno de hibridación, la temperatura a la cual estará, se determina por la siguiente fórmula:  $T_m = 49.82 + 0.41(\%GC) - (600/l)$  donde  $l$  = longitud en bp, la  $T_m$  óptima es  $T_m - 20-25^\circ\text{C}$ .

Preparar la Dig Easy Hyb solución: agregar 6 g de gránulos Dig Easy Hyb y disolverlos en 10 ml de agua PISA, deben quedar 13.5 ml de solución, se disuelven con 5 min a  $37^\circ\text{C}$ . La solución se recalienta, la membrana se pone en el tubo del horno, y se agregan 10 ml de esta solución a la temperatura del horno. Se deja en el horno por 4 horas.

**Hibridación:** precalentar los 3.5 ml de la solución Dig Easy Hyb preparada a la temperatura  $T_m$  adecuada, y desnaturalizar la sonda a  $95^\circ\text{C}$  por 5 min, después enfriarla en hielo por 2 min. Mezclar la solución y la sonda y agregársela al tubo (antes se debe retirar la solución que ya tenía). Dejar incubando toda la noche.

Al otro día, se realizan los lavados a la membrana:

- 1) Lavar de 2 a 5 min con SSC 2X y 0.1% SDS a  $15-25^\circ\text{C}$  en agitación constante.
- 2) Hacer 2 lavados con SSC 0.5X y 0.1% SDS por 15 min a  $65-68^\circ\text{C}$  en agitación constante.

#### **Detección:**

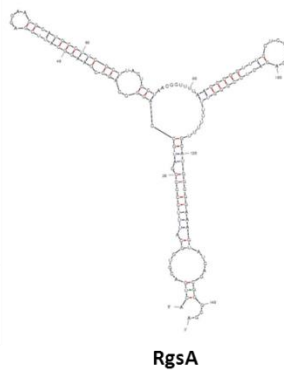
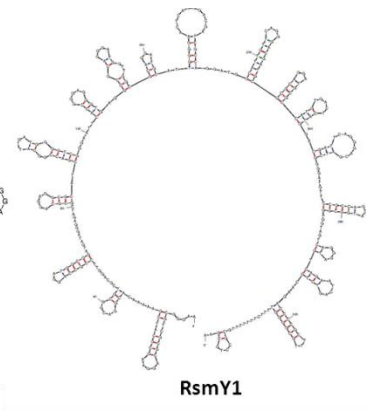
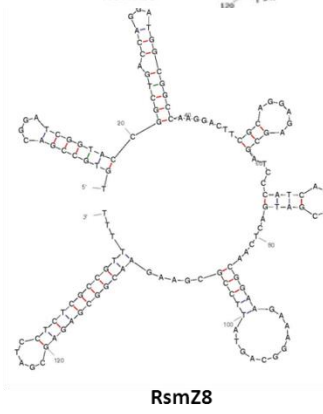
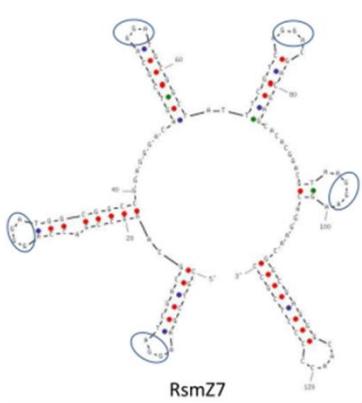
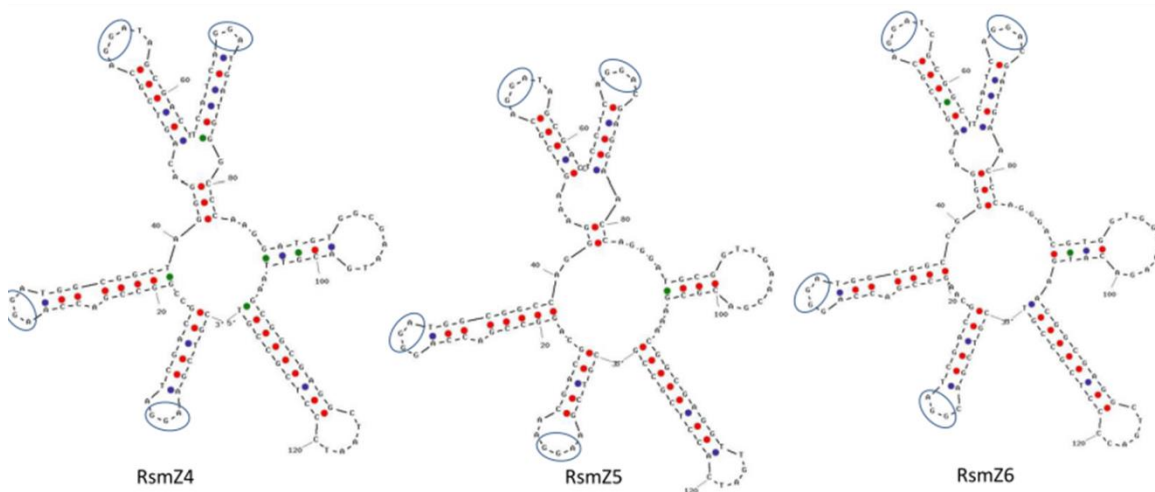
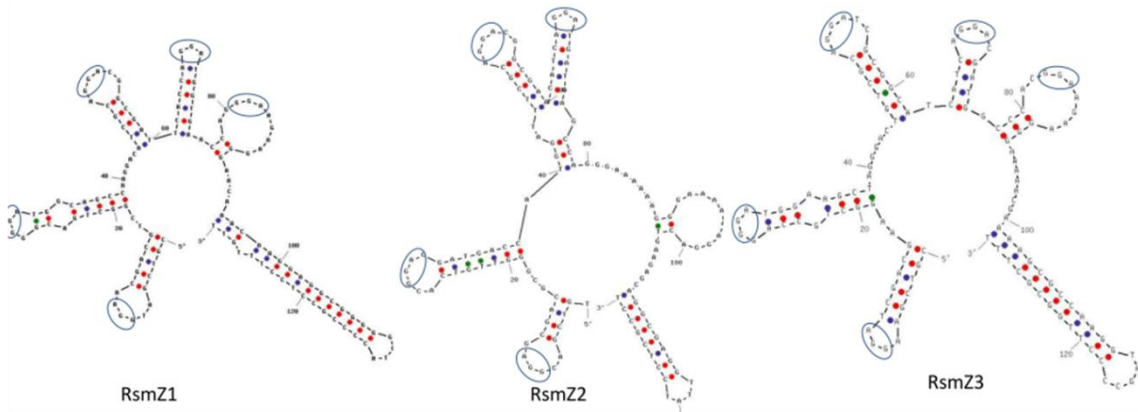
- 1) Lavar la membrana de 1 a 5 min en washing buffer (aprox 20 ml), hacer dos lavados.
- 2) Incubar 30 min en 50 ml de blocking solution (2 lavados). Diluir el vial 6 en Buffer ácido maleico 1:10.
- 3) Incubar 30 min en 20 ml de Antibody solution. Diluir 2  $\mu\text{l}$  del vial 4 (Anti-Digoxigenin AP) en blocking solution (20 ml).
- 4) Lavar 2 veces 15 min en washing buffer.
- 5) Lavar de 2 a 5 min en 20ml de detection buffer.
- 6) Poner la membrana con la cara donde está la muestra cara hacía arriba en una hoja acetato, fijar el acetato con cinta adhesiva, aplicar 1 ml de CSPD ready to use y cubrir inmediatamente la membrana con otro acetato cuidando que no queden burbujas. Incubar 5 min a temperatura ambiente. Fijar el segundo acetato.
- 7) Quitar el exceso de líquido y colocar encima un film (completamente a oscuras). Esperar 10 min a temperatura ambiente.
- 8) Retirar el film y revelar.



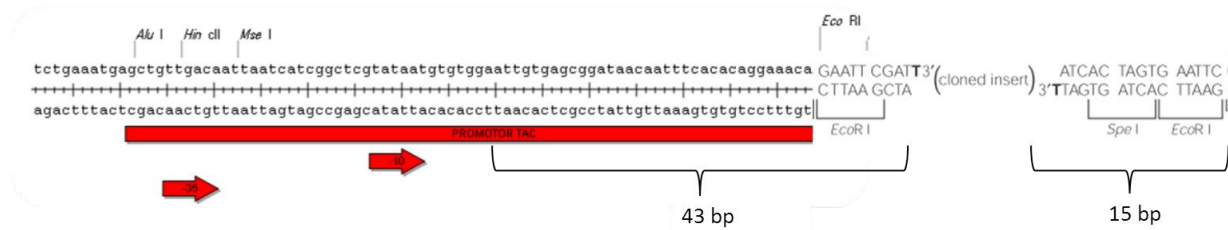
<b>Washing buffer</b>	<b>Buffer ácido maleico</b>	<b>Detection buffer</b>
0.1 M ácido maleico  0.15 M NaCl  Esterilizar y después agregar Tween 20 al 0.3%  pH 7.5	0.1 M ácido maleico  0.15 M NaCl  Ajustar el pH con NaOH sólido a 7.5	0.1 M de Tris-HCl 0.1 M de NaCl 0.2 pH 9.5

### Anexo 3: Figuras

#### Estructura secundaria de los pequeños RNAs reguladores Rsm de *A. vinelandii*

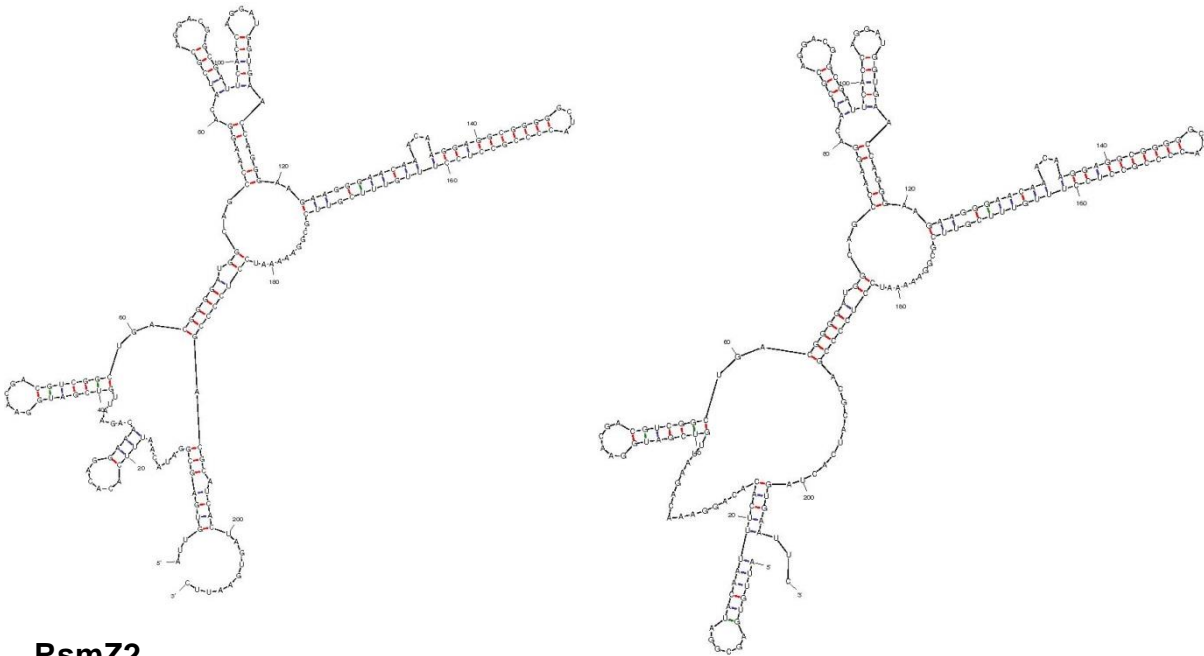


## Formación de estructuras secundarias amorfas predichas por el programa MFOLD:



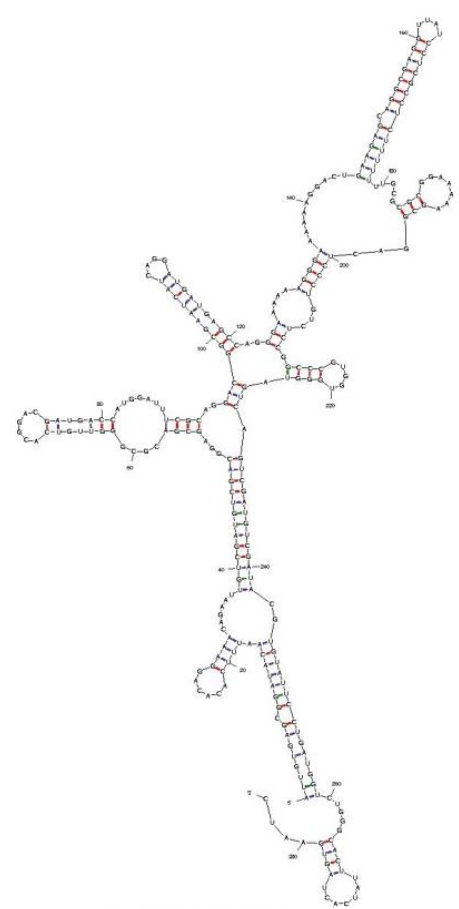
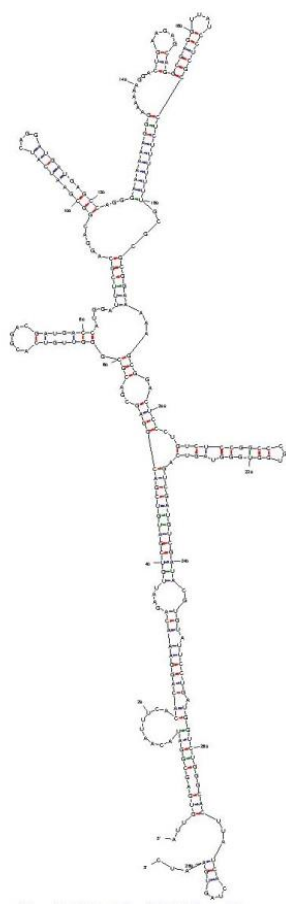
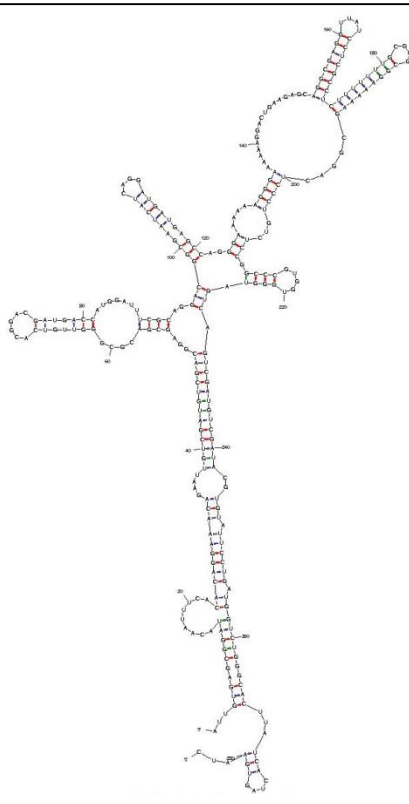
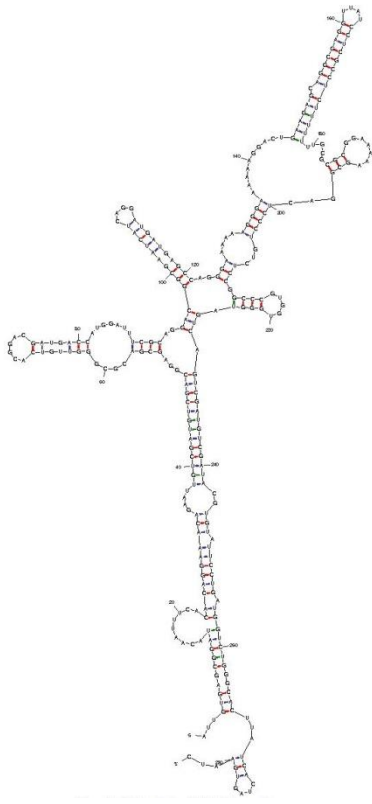
### RsmZ1

ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGAATTGTCGATGGAACGACGTCG  
 GCTGACGGGGATGGCAGCCAAGGACATCGCAGGACGGCGATTACACAGGATGGT  
 GAACCAGGGAAGAAGGGAACAAACAAGGAGGCGGGGGCTACCCCGCCTCCTTTG  
 TTTCGTTGCGGAAAAATCCTCCCCGACGCATCACTAGTGAATC



### RsmZ2

ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGAATTGTCGATGTGACGGAGCG  
 ACGCGGGTTGTCACGGACGATGACCATGGATTTGCGAGGACGGCGAATCATCAGG  
 ATGATGAGCCAGGGAAGGGAAGGACTGAAGAGCAGGCGAGGTTATCC  
 TCGCCTCTTTTTTTCGCGCGGAAAAAGCGGACTCCCTGTCTCCGGCCCGTGGTG  
 GGTAGTCAGTCGATGTCGATACGTGTATTCTGATGGTCTGGGCACTTATCACTAG  
 TGAATC



### 13. REFERENCIAS

---

- Aarons, S; Abbas,A; Adams, C; Fenton, A; O'gara;F. (2000). A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, 182 (14), 3913–3919.
- Arfman, N; Worrel, Ingram, L. (1992). Use of the *tac* Promoter and *lacP* for the Controlled Expression of *Zymomonas mobilis* Fermentative Genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, 174 (22), 7370-7378.
- Babitzke, P; Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 156–163.
- Boer, H; Comstock, L; Vassert, M. (1983). The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Biochemistry*, 80, 21-25.
- Brencic, A; McFarland, K; McManus, H; Castang, S; Mogno, I; Dove, S; Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, 73 (3), 434–445.
- Brewin, B; Woodley, P; Drummond, M. (1999). The basis of ammonium release in *nifL* mutants of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 181 (23), 7356-7362.
- Bush, J; Wilson, P. (1959). A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature*, 184,381.
- Campos, M., Martínez-Salazar, J., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G., et al. (1996). Characterization of the Gene Coding for GDP-Mannose Dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 178 (7), 1793–1799.
- 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.
- Castañeda, M; 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.
- Chang, C., & Steward, R. (1998). The two-component system. *Plant Physiology*, 117, 723–731.
- Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17 (4), 327-361.
- Ezaz-Nikpay, K; Uchino, K; Lerner, R; Verdine, G. (1993). Construction of an overproduction vector containing the novel *srp* (sterically repressed) promoter. *Protein Science*, 3, 132-138.
- González, N; Heeb, S; Valverde, C; Kay, E; Reimann, C; Junier, T; Haas, D. (2008). Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species. *BMC Genomics*, 9,167-191.

Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *The American Phytopathological Society*, 14 (12), 1351–1363.

Heeb, S., Blumer, C., Haas, D. (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 184 (4), 1046–1056.

Hoch, J. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 165-170.

Kay, E; Reimmann, C; Haas, D. (2006). Small RNAs in bacterial cell-cell communication. *Microbe*, 1 (2), 63-69.

Lapouge, K., Schubert, M., Hallain, F., & Hass, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 241–253.

Lloret, L., Barreto, R., León, R., Moreno, S., Martínez-Salazar, J., Espín, G., y otros. (1996). Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Molecular Microbiology*, 449-457.

Manzo, J; Cocotl-Yañez, M; Tzontecomani T; Martínez, V; Bustillos, R; Velásquez, C; Goiz, Y; Solís, Y; López, L; Fuentes, E; Nuñez, C; Segura, D; Espín, G; Castañeda, M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21, 147-159.

Mejía, H; Guzmán, J; Moreno, S; Soberón, G; Espín G. (1997). The *Azotobacter vinelandii* *alg88* and *alg44* genes are essential for the alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene*, 199, 271-277.

Muhammadi, Ahmed N. (2007). Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Current Genomics*, 8, 191-202.

Nagpal, P; Jafri, S; Reddy, M; Das, H. (1989). Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 171 (6), 3133-3139.

Pindar, D., & Bucke, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochemical Journal*, 152, 617-622.

Quiroz, E D. (2012). Estudio de la posible función del sistema de regulación post-transcriptional Crc/CrcZ en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología UNAM.

Sabra, W; Zeng, A; Deckwer, W. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:315–325.

Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological reviews*, 39(4), 516-539.

Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T.1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 2. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.

Setubal, J; Dos santos, P; Goldman, B; et al. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191 (14), 4534–4545.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 211 – 222.

Vazquez, A., Moreno, S., Guzmán , J., Alvarado , A., & Espín , G. (1999). Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algX*LVIFA genes: characterization of *algF* mutants. *Gene*, 232, 217–222.