



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Laboratorio de Genética Molecular Microbiana

Título de Tesis

“Estudio de la regulación ejercida por GacA y RsmA en la síntesis de sideróforos en *Azotobacter vinelandii*”

Para obtener el título de

Licenciado en biomedicina

Mauricio Alberto Basulto Almeida

Director de Tesis

D.C. Miguel Castañeda Lucio

Puebla, Pue; Noviembre de 2020

**Benemérita Universidad Autónoma
de Puebla**

Facultad de Medicina
Centro de Investigaciones en Ciencias
Microbiológicas
Laboratorio de Genética Molecular
Microbiana

Título de Tesis

**"Estudio de la regulación ejercida por
GacA y RsmA en la síntesis de
sideróforos en *Azotobacter vinelandii*"**

Presenta

Mauricio Alberto Basulto Almeida

Director de Tesis

D.C. Miguel Castañeda Lucio



Puebla; 2020

Índice

Resumen	5
Introducción	6
Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
Los Sideróforos	7
Aplicaciones de los sideróforos.....	8
La Estructura y clasificacion de los sideróforos	9
Los sideróforos de <i>Azotobacter vinelandii</i>	10
La genética y la síntesis de sideróforos en <i>A. vinelandii</i>	11
Los Catecoles	12
Las Pioverdinas.....	13
La síntesis diferencial de sideróforos en <i>A. vinelandii</i>	14
Los sistemas de regulación de doble componente	15
El sistema de regulación GacS/GacA.....	16
El sistema de regulación post-transcripcional Rsm	17
La Cascada de regulación Gac/Rsm y su relación con la síntesis de sideróforos	18
Antecedentes	20
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Resultados	24

Verificación mediante análisis de restricción de plásmidos que contienen fusiones transcripcionales y traduccionales <i>gusA</i> de genes relacionados con la síntesis de sideróforos.	24
Verificación por PCR de las fusiones <i>csbX-gusA</i> y <i>csbC-gusA</i>	27
Verificación por PCR de las fusiones <i>pvdI-gusA</i> y <i>pvdS-gusA</i>	29
Generación de las cepas de <i>A. vinelandii</i> que contienen las fusiones pUMAT <i>cgusA</i> transcripcionales y traduccionales	30
Verificación de candidatas de <i>A. vinelandii</i> que portan las fusiones <i>gusA</i>	31
Generación de las cepas mutantes en <i>rsmA</i> y <i>gacA</i> en <i>A. vinelandii</i>	32
Verificación de mutantes JGDE <i>rsmA</i>	34
Verificación de mutantes <i>gacA</i>	35
Determinación del efecto de la mutación de los reguladores de <i>gacA</i> y <i>rsmA</i> sobre la expresión de los genes <i>csbC</i> , <i>csbX</i> , <i>pvdI</i> y <i>pvdS</i> así como en la producción de sideróforos	36
Verificación de la mutante E <i>pvdS</i>	37
Cuantificación de catecoles y azotobactinas en las cepas JGDE <i>pvdS-gusAT</i> , JGDE <i>pvdS-gusAT gacA::gm</i> y JGDE <i>pvdS-gusAT rsmA::gm</i>	39
Discusión	42
Conclusiones	45
Material y métodos	46
Oligonucleótidos, Cepas y vectores	46
Medios de cultivo	50
Luria Bertani (LB).....	50
Burk Sacarosa (BS)	50
Medio de Competencia (CM)	51
Extracción de plásmido	51

Perclorato.....	51
Maxiprep	52
Extracción de DNA genómico	53
Reacción de restricción.....	55
Transformación en <i>A.vinelandii</i>.....	56
Cuantificación de proteína (Método de Lowry)	57
Cuantificación de actividad enzimática β glucuronidasa.....	58
Cuantificación de sideróforos.....	58
Cuantificación de pioverdina	58
Cuantificación de catecoles	59
Referencias	61

Resumen

La gammaproteobacteria *Azotobacter vinelandii* produce distintos metabolitos, entre los que se encuentran diferentes clases de sideróforos; moléculas de interés por las distintas aplicaciones y potencial industrial que posee y que guardan una gran importancia en la manera en que esta bacteria se relaciona con su ambiente. Los sideróforos le permiten obtener hierro (Fe), elemento indispensable para su supervivencia, motivo por el cual el estudio de la regulación de su biosíntesis cobra importancia.

A. vinelandii produce distintos tipos de sideróforos entre los que se encuentran los pertenecientes a la familia de los catecoles y el sideróforo mixto azotobactina, que son sintetizados de manera diferencial. Se ha encontrado que el sistema de regulación Gac/Rsm tiene un papel importante en el control de dicha síntesis diferencial; en reportes previos en otras bacterias se ha reportado que la mutación de *gacA* o *rsmA*, generan cambios en la producción de sideróforos.

En el presente estudio se generaron mutantes de *A. vinelandii* en los genes *gacA* y *rsmA*, se midió la expresión de los genes biosintéticos *csbC* y *csbX* involucrados en la síntesis de sideróforos de la familia de los catecoles y de los genes *pvdI* y *pvdS*, relacionados con la síntesis de las pioverdinas. La expresión se midió mediante el uso de fusiones génicas a nivel transcripcional y traduccional.

Se encontró que las mutantes *rsmA* sobreproducen pioverdinas mientras que la producción de catecoles se ve atenuada, contrario a lo que se observa en las mutantes *gacA* donde los catecoles muestran una sobreproducción y las pioverdinas se encuentran disminuidas respecto a la cepa control.

Introducción

Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria gramnegativa perteneciente a la clase de las gammaproteobacterias y a la familia de las *Pseudomonadaceae*. Es una bacteria poliploide, es decir posee varias copias de su cromosoma, se calcula que pueden tener hasta 80 copias. El número de copias varía dependiendo del medio y las condiciones de cultivo así como de la fase de crecimiento (Nagpal, 1989). Es una bacteria de gran tamaño ya que cuenta con 2x5 nm de diámetro, es decir de 5 a 10 veces el volumen de *E. coli* hecho que ha sido asociado a su poliploidía. *Azotobacter* es una bacteria pleomórfica, por lo que su morfología varía desde bacilos hasta células en forma de cocos y es posible encontrarla como células individuales o formando pares y agregados irregulares.

En condiciones de estrés la bacteria sufre un proceso de diferenciación morfológica formando quistes, estado en el cual entra en latencia, resistiendo condiciones ambientales adversas, manteniéndose viable por más de 10 años (Vela, 1974).

Otra característica de este modelo es que es diazótrofo lo que significa que cuenta con la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico; proceso que realiza en presencia de oxígeno y exhibe una tasa respiratoria muy alta si ésta es comparada con otras bacterias (Poole & Hill, 1997).

El metabolismo secundario de *A. vinelandii* es sumamente versátil teniendo la capacidad de producir metabolitos como poli-β-hidroxibutirato (PHB), utilizado para la producción de plástico biodegradable; alginatos, utilizados principalmente como aditivos para gelificar, emulsionar, estabilizar o viscosificar soluciones

acuosas; alquilresorcinoles, lípidos fenólicos de vital importancia como componente de los quistes; y sideróforos (Espín, 2008).

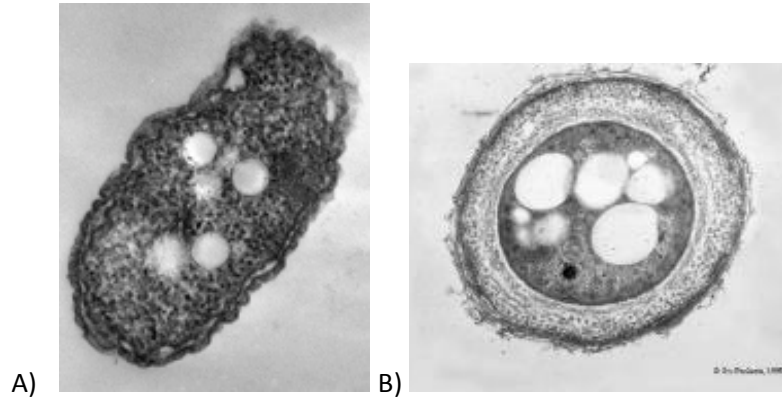


Figura 1. Morfología de *Azotobacter vinelandii* A) fase vegetativa B) fase de quiste

Los Sideróforos

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (<10KDa) capaces de quelar hierro lo que permite metabolizar a dicho elemento. El hierro(Fe) es un elemento crucial para la supervivencia de cualquier microorganismo debido a que se encuentra involucrado en procesos como cofactor de enzimas que participan en diversos procesos de carácter vital como lo son la fosforilación oxidativa, síntesis de DNA y RNA, fijación de nitrógeno, entre otros, además de ser esencial en la formación de biofilm debido a su función como regulador de la movilidad de superficie y estabilizador de la matriz de polisacáridos (Ahmed & Holmstrom, 2014; Sah & Singh, 2015).

A pesar de la abundancia del Fe y la importancia biológica que tiene, su disponibilidad en ambientes como en los que habita *A. vinelandii* (aerobios y con pH neutro), no está disponible para ser solubilizado debido a que su forma Fe^{+2} se oxida rápidamente a su forma Fe^{+3} (Andrews, *et al.* 2003) al reaccionar con el oxígeno molecular del medio en el que se encuentra, lo que lo hace un elemento

limitante y debido a ésto la competencia por hierro es fundamental para la supervivencia de una bacteria de suelo (Miethke & Marahiel, 2007).

Debido a la baja disponibilidad de Fe en el medio ambiente los microorganismos han desarrollado estrategias específicas para la absorción y asimilación de este elemento tales como la producción de sideróforos cuya función es reducir dicho metal. Los complejos sideróforo-hierro son reconocidos por receptores de membrana específicos o proteínas transportadoras y posteriormente conducidos al interior de la célula (Roosenberg, 2000).

Los sideróforos también cobran relevancia en la relación que tiene la bacteria con su hábitat debido a que se cumplen diversas funciones tales como intemperización de la roca contribuyendo al aumento de hierro disponible a otras bacterias de suelo o su contribución al ciclo bioquímico del suelo (Ahmed & Holmstrom, 2014).

Aplicaciones de los sideróforos

Los sideróforos se encuentran entre los aglutinantes más fuertes conocidos para metales pesados. Debido a esta propiedad han despertado el interés para su aplicación en distintos ámbitos por ejemplo en la terapia de quelación de metales. El sideróforo desferrioxamina se ha generalizado como un tratamiento para la intoxicación por hierro y la talasemia (Liu, 2002).

La dilucidación y comprensión de las vías de síntesis de los sideróforos en distintas bacterias patógenas donde estos actúan como un factor de virulencia ha guiado a oportunidades para el diseño de moléculas inhibitoras que bloquean la biosíntesis de sideróforos y por lo tanto el crecimiento bacteriano (Ferrerias, 2005).

Los sideróforos también tienen un gran potencial como vehículos acarreadores de drogas, donde estas moléculas se acoplarían a agentes antimicrobianos para facilitar la entrega en estos últimos dentro de bacterias patógenas. Debido a la alta afinidad de las bacterias por determinado sideróforo, estos conjugados sideróforo-agente antimicrobiano tienen una gran especificidad (Marvin J. & Miller, 1993).

Los compuestos químicos producidos por microorganismos en la rizósfera también pueden aumentar la disponibilidad y la absorción de hierro. Diversas plantas, como la avena, pueden asimilar hierro a través de estos sideróforos microbianos. Se ha demostrado que las plantas pueden usar los sideróforos de tipo hidroxamato, los de tipo catecol y los ligandos mixtos biosintetizados por bacterias saprofitas colonizadoras de raíces. Todos estos compuestos son producidos por cepas bacterianas rizosféricas, que tienen requisitos nutricionales simples, y se encuentran en la naturaleza en suelos, follaje, agua dulce, sedimentos y agua de mar (Carrillo-Castañeda, 2002).

La Estructura y clasificación de los sideróforos

Los sideróforos son capaces de unirse de manera efectiva con el hierro formando un complejo de coordinación octaédrico. Los sitios de unión de hierro para sideroforos férricos están dispuestos en el espacio en una orientación particular, de echo, la quiralidad a menudo juega un papel crítico en el proceso de reconocimiento de complejos de sideróforos férricos (Neilands, 1995).

El hierro es una ácido fuerte de Lewis, por lo que prefiere bases fuertes tales como el oxígeno para coordinarse. Los microorganismos liberan el hierro mediante la reducción de este en Fe^{2+} , estado donde pierde afinidad por su ligando (Neilands 1995).

Los sideróforos, se clasifican de acuerdo al grupo funcional que interactúa con el hierro. Los grupos primordialmente utilizados como donadores de protones para la coordinación con el Fe^{+3} por parte de los sideróforos, incluyen átomos como el oxígeno, que permiten la formación de interacciones iónicas fuertes entre el metal y el ligando. De esta manera, dependiendo del grupo de coordinación que se encuentre mediando la interacción con el Fe^{+3} los sideróforos se dividen en cuatro tipos: carboxilatos, fenolatos, hidroxamatos y catecolatos. Además de esos tipos

hay algunos sideróforos que presentan diferentes grupos funcionales y a esos sideróforos se les llama de tipo mixto (Figura 2) (Miethke & Marahiel, 2007).

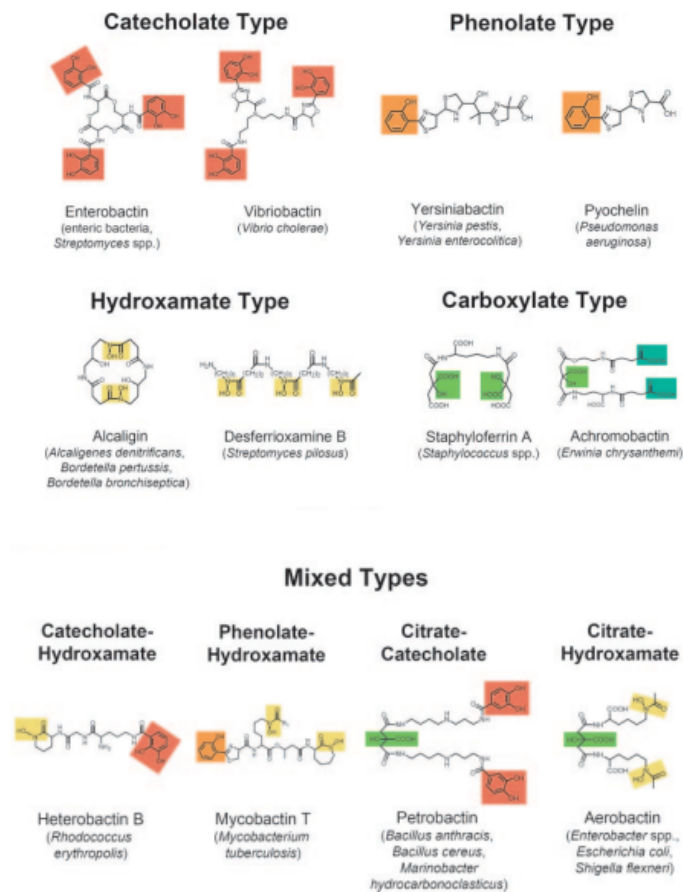


Figura 2. Tipos de sideróforos que muestran el grupo funcional que interactúa con el hierro (Tomado de Miethke & Marahiel, 2007).

Los sideróforos de *Azotobacter vinelandii*

En el caso de *Azotobacter vinelandii*, se tiene conocimiento de que es capaz de sintetizar distintos tipos de sideróforos, los cuales además de la capacidad de quelar hierro tienen afinidad por otros metales como Molibdeno y Vanadio (McRose *et al.*, 2016). Entre estos sideróforos se encuentran 4 pertenecientes al

grupo de los catecolatos: azotoquelina (Corbin & Bulen, 1969), aminoquelina (Cornish & Page, 1998), protoquelina (Cornish & Page, 1995) y DHBA (Ácido dihidroxibenzoico) (Corbin & Bulen, 1969) en cuya estructura tienen el grupo catecol característico; y un sideróforo mixto, Azotobactina; que pertenece al grupo de las pioverdinas y el cual posee una cadena peptídica unida a un cromóforo, el cual tiene la capacidad de emitir fluorescencia (Bulen & LeComte, 1962; Page *et al.*, 1991).

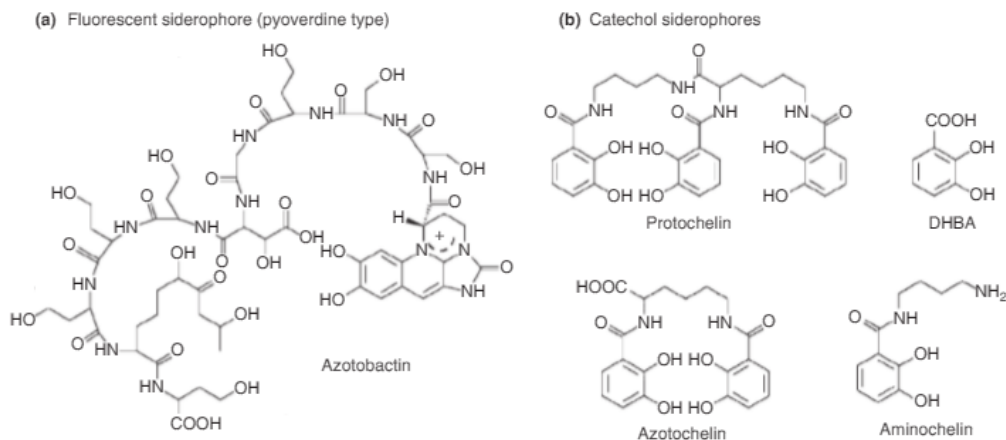


Figura 3. Estructura de los sideróforos producidos por *A. vinelandii*. (a) Pioverdinas. (b) Catecoles (Tomado de Yoneyama *et al.*, 2011).

La genética y la síntesis de sideróforos en *A. vinelandii*

Estudios previos en *A. vinelandii* han puesto en evidencia que dentro del genoma de esta bacteria se encuentran genes putativos involucrados en la producción de estos metabolitos en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, entre otras (Tindale, 2000; Page *et al.*, 2003; Yoneyama *et al.*, 2011; Baars *et al.*, 2016).

Los Catecoles

Se ha reportado un operón de genes relacionado con la síntesis de catecoles en *A. vinelandii* (Fig. 4) (Yoneyama *et al.*, 2011). De los genes agrupados en este operón, tanto en gen *csbC*, que codifica para una isocorismato sintasa, como el gen *csbX*, el cual codifica una bomba de flujo encargada de la internalización del complejo Hierro-sideróforo, comparten la misma región reguladora (Crosa & Walsh, 2002; Page y col., 2003).

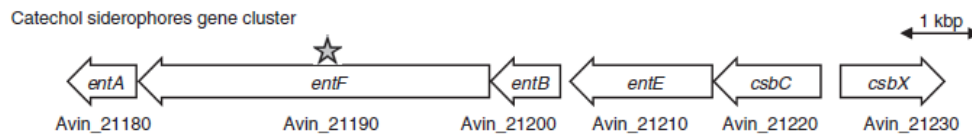
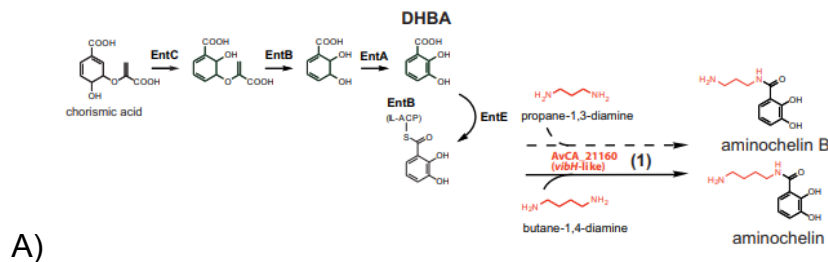


Figura 4. Operón *ent* involucrado con la producción de catecoles (Tomado de Yoneyama *et al.*, 2011)

La síntesis de estos sideróforos comienza con la acción de la isocorismato sintasa sintetizando el anillo corísmico el cual posteriormente será convertido en DHBA gracias a la acción de la isocorismatasa, enzima codificada por el gen *entB*. Posteriormente se llevan a cabo diferentes modificaciones químicas que darán lugar a la formación del resto de los catecoles de la bacteria (Balao, 2009; Baars *et al.*, 2016).



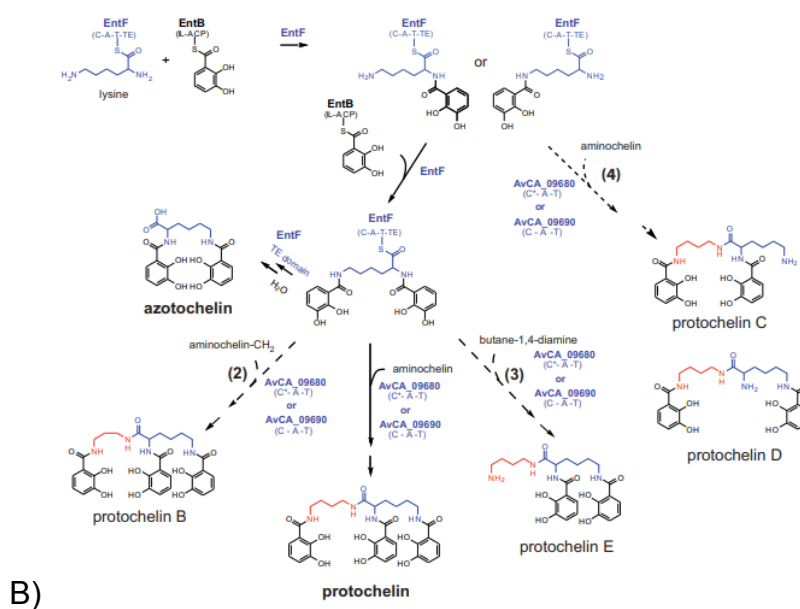


Figura 5. Biosíntesis propuesta de catecoles para *A. vinelandii*. A) Vía de biosíntesis propuesta para monocatecoles. B) Vía de biosíntesis propuesta para sideróforos de tipo bi- y tri-catecol (Tomado de Baars *et al.*, 2016).

Las Pioverdinas

En lo que corresponde a la producción de pioverdinas en *A. vinelandii* se identificó un operón que cuenta con los genes involucrados en la producción del sideróforo azotobactina, el cual es el único sideróforo producido por *A. vinelandii* que pertenece al grupo de las pioverdinas, sideróforos de carácter mixto de acuerdo a los grupos funcionales que forman el complejo de coordinación.

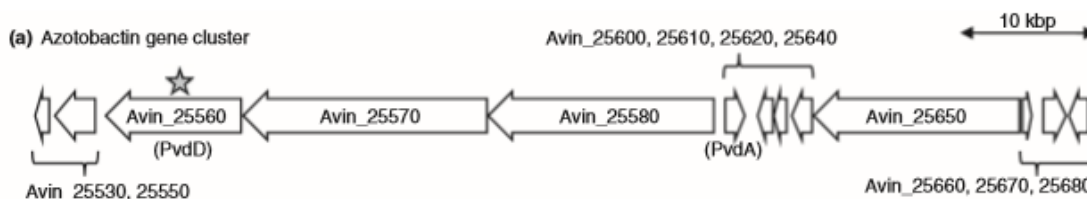


Figura 6. Operón *pvd* involucrado en la síntesis de pioverdinas en *A. vinelandii* (Tomado de (Tomado de Yoneyama *et al.*, 2011).

La ruta completa de la síntesis de pioverdinas en *A. vinelandii* no ha sido del todo dilucidada, sin embargo, gracias a la homología que presentan las proteínas presentes en este modelo respecto a las encargadas de la producción del sideróforo pioverdina en *Pseudomonas* se vuelve posible aclarar la articulación de esta vía biosintética.

Una de las características principales de este tipo de moléculas es que parte importante de su estructura se compone de una cadena polipeptídica la cual es sintetizada por sintetas peptídicas no ribosomales o NRPS (Balao, 2009) las cuales son enzimas multidominio que cumplen funciones de síntesis específicas. (Marahiel et al., 1997). La variedad de los dominios encontrados en este tipo de enzimas se debe a las diversas reacciones que son capaces de catalizar siendo el dominio de adenilación, encargado del inicio de la cadena polipeptídica, el dominio PCP (proteína peptidil acarreadora), encargado de la elongación y el dominio de condensación a cargo de la formación del enlace peptídico aquellos que resultan esenciales más no los únicos presentes en la NRPS.

En la bacteria filogenéticamente relacionada *P. aeruginosa* donde la síntesis de pioverdinas se encuentra más estudiada se sabe que esta se lleva a cabo a través de una serie de NRPS, entre ellas la codificada por el gen *pvdI*. La cadena polipeptídica al igual que un cromóforo se sintetizan en el citoplasma, para después ser trasladados al periplasma donde este madura y finalmente se exporta al espacio extracelular.

La síntesis diferencial de sideróforos en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii*, así como en bacterias filogenéticamente relacionadas a esta pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*, se ha observado que la síntesis y posterior secreción de los distintos sideróforos ocurre de manera diferencial, siendo la concentración de Fe^{+3} el factor determinante. Se sabe que en nuestro modelo de estudio bajo condiciones limitantes de hierro menores a $10\mu M$ se producen los cuatro sideróforos pertenecientes a la familia de los catecoles. A su

vez, si la concentración de hierro en el medio decrece a una concentración menor o igual a $3\mu\text{M}$ la bacteria produce pioverdinas (Sevinc & Page, 1992).

Debido a dicha síntesis diferencial en la producción de sideróforos, es de esperarse que la biosíntesis de estos sea finamente regulada, bajo un control el cual le permita a la bacteria adaptarse de manera óptima a las condiciones variables del medio.

Los sistemas de regulación de doble componente

Los sistemas de doble componente son uno de los sistemas predominantemente por los cuales las bacterias censan y responden a cambios en su ambiente. La vía de señalización de dos componentes contiene una proteína de detección de la familia de las cinasas histidínicas y una proteína efectora perteneciente a los llamados reguladores de respuesta que generalmente son factores transcripcionales. Al recibir un estímulo, la cinasa histidínica típicamente cataliza una reacción de autofosforilación en un residuo de histidina conservado (Gao & Stock, 2009). Este grupo fosforilo se transfiere luego a un aspartato conservado en un regulador de respuesta afín. La fosforilación del regulador generalmente impulsa un cambio conformacional que activa su respuesta de salida, lo que a menudo conduce a cambios en la expresión génica (Bretl *et al.*, 2011). Por lo tanto, estos sistemas representan formas versátiles y potentes de combinar los cambios en las condiciones externas o ambientales con los cambios correspondientes en la fisiología celular y la expresión génica.

El hecho de que este sistema de señalización se encuentre ampliamente difundido entre procariontes pone en evidencia la eficacia y papel que este mecanismo ha tenido como estrategia de adaptación.

Estas proteínas de señalización se han encontrado en los genomas de casi todas las bacterias secuenciadas, y la mayoría de las especies codifican docenas y a veces cientos, de proteínas pertenecientes a sistemas de dos componentes los

cuales responden a la enorme gama de señales y factores estresantes (Capra & Laub; 2012).

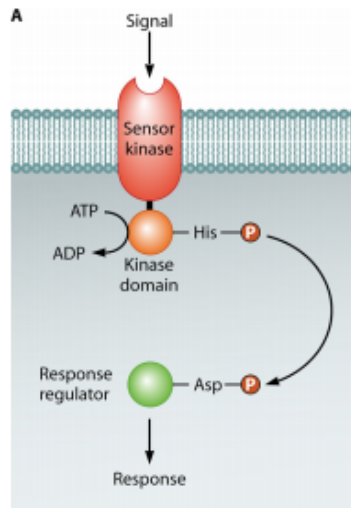


Figura 7. Componentes básicos del sistema de señalización de dos componentes (Tomado de Bretl et al., 2011).

El sistema de regulación GacS/GacA

El par regulador GacS/GacA es un sistema de transducción de señales de dos componentes reportado en varias especies bacterianas del subgrupo γ y que actúa como un regulador global de metabolismo secundario y controla diversos y numerosos metabolitos en las bacterias donde se ha reportado (Goodier & Ahmer, 2001, Lapouge *et al*, 2008). Este sistema se compone de una cinasa histidínica llamada GacS que detecta señales del medio, momento en el cual activa al segundo elemento de este sistema, la proteína reguladora de respuesta GacA mediante la transferencia de un grupo fosfato (Lapouge *et al*, 2008). En cuatro bacterias, tres de ellas filogenéticamente cercanas a *A. vinelandii* (*Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas aeruginosa*), el

sistema GacS/A controla la síntesis de sideróforos (Heeb & Haas, 2001; Jimenez *et al*, 2012).

Este sistema generalmente actúa acoplado a diversos sistemas de regulación post-transcripcional, siendo el sistema Rsm uno de ellos (Susuki *et al*, 2002; Teplitski *et al*, 2003; Valentini *et al*, 2018).

El sistema de regulación post-transcripcional Rsm

Los sistemas de control post-transcripcional conocidos como Rsm o Csr, su homólogo en *E. coli*, están constituidos por un elemento proteico y uno o más RNAs reguladores (sRNAs). Este sistema en primera instancia descrito en *E. coli* y *Erwinia* con el nombre de Csr (Carbon Storage Regulator) donde se le adjudicó un papel primordial en el metabolismo de hidratos de carbono (Romeo, 1998).

En diversas especies de γ -proteobacterias, clase de la cual *A. vinelandii* es miembro, se ha reportado un sistema homólogo a Csr llamado Rsm (Regulator of secondary metabolism) el cual está compuesto por una proteína codificada por el gen *rsmA* (homólogo a *csrA*), la cual contiene sitios de unión a DNA y por un complejo de sRNAs reguladores, codificados a su vez por genes de las subfamilias *rsmZ*, *rsmX* o *rsmY* (Romeo, 1998).

RsmA se une a sus RNAs mensajeros blancos de regulación bloqueando su traducción, mientras los sRNAs del sistema Rsm secuestran a RsmA contrarrestando su actividad represora (Romeo *et al.*, 1998; Lapouge *et al.*, 2008).

La Cascada de regulación Gac/Rsm y su relación con la síntesis de sideróforos

En varias bacterias se ha caracterizado una relación jerárquica de regulación entre GacS/A y el sistema Rsm (Heeb *et al*, 2005; Kay *et al*, 2006). De manera general, el regulador de respuesta GacA controla la transcripción de sRNAs de la familia Rsm. En *A. vinelandii* GacA controla directamente la transcripción de los sRNA's *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ3*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6*, *rsmZ7* y *rsmY* (Hernandez *et al*, 2012).

En *P. Aeruginosa*, bacteria filogenéticamente relacionada a *A. Vinelandii*, se ha determinado el funcionamiento de la cascada de regulación Gac/Rsm, donde la histidin cinasa GasS tras recibir una señal y autofosforilarse, transfiere un grupo fosfato a su regulador de respuesta cognado, GacA, el cual una vez fosforilado regula positivamente la transcripción de los sRNAs, que transcritos actúan secuestrando la proteína RsmA, regulador post-transcripcional que en caso de no encontrarse asociado a los sRNAs, se une a sus mRNAs blanco que incluyen genes involucrados en la producción de biofilm y síntesis de sideróforos (Jimenez *et al*, 2012)(Figura 8).

En *P. aeruginosa* PAO1 se han reportado 22 genes involucrados en la síntesis y el transporte de las pioverdinas (Lamont & Martin, 2003), entre estos se encuentran cuatro genes no esenciales involucrados en la síntesis del cromóforo, cuatro genes que codifican para NRPS, uno codifica para un transportador, tres genes reguladores, cinco genes que codifican para enzimas que modifican la estructura peptídica de la molécula y algunos otros de función desconocida. De forma interesante la mayoría de estos genes forman parte de un regulón controlado por un factor sigma alternativo codificado por *pvdS*.

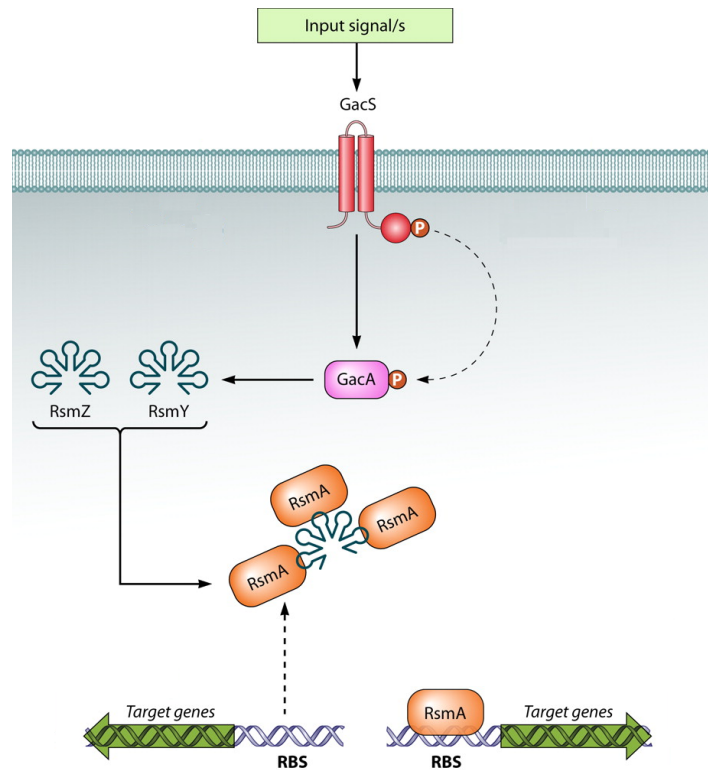


Figura 8. Esquema de elementos y su papel dentro del sistema Gac/Rsm (Tomado de Jimenez *et al*, 2012)

En *P. aeruginosa* se estableció, mediante el monitoreo de la actividad del promotor de *pvdS* y la mutación de los elementos del sistema Rsm, que el regulador post-transcripcional RsmA se encuentra implicado en el control de la expresión del gen que codifica para el factor sigma PvdS (Frangipani *et al.*, 2013).

Antecedentes

La producción de la pioverdina azotobactina se evidencia por su fluorescencia bajo irradiación con luz ultravioleta (UV). Mutantes la proteína reguladora de respuesta *gacA* de *A. vinelandii* no fluorescen bajo luz UV, hecho que sugiere fuertemente que el sistema GacS/A controla la síntesis dicho sideróforo. Una mutante doble en los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* fluorescen en menor grado que la cepa silvestre pero no abaten completamente la fluorescencia como la mutación en *gacA*. Las observaciones fueron validadas por cuantificaciones espectrofotométricas del sideróforo (datos no publicados). Sumado a esto, se ha observado que una mutación en la proteína represora RsmA produce una mayor cantidad del sideróforo fluorescente azotobactina lo que aunado a lo observado en las mutantes en dos pequeños RNAs reguladores muestran el papel que tiene el sistema Rsm en la regulación de este sideróforo en *A. Vinelandii* (Yoneyama *et al*, 2011).

De manera interesante ante la ausencia de la azotobactina la mutante *gacA*, y en menor escala la doble mutante *rsmZ1rsmZ2*, aumentaron su producción de catecoles probablemente por un fenómeno de compensación en los niveles totales de sideróforos (datos no publicados). Este fenómeno de compensación podría ser fisiológico o genético, donde la cascada Gac-Rsm controlaría la expresión de los genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de catecoles. De acuerdo a lo anterior Yoneyama y colaboradores en 2011, reportaron que mutantes en el gen biosintético *pvdD*, un gen relacionado con la producción de las pioverdinas, aumentaba la síntesis de catecoles.

Recientemente, en el grupo de trabajo del laboratorio de genética molecular microbiana, se encontró que en una mutante JGDEP Δ *algDrsmA* la expresión de una fusión traduccional *pvdS-gusA* se ve afectada (Barrientos, 2017) . La medición de la expresión del gen *pvdS* se realizó en una cepa no mucoide (debido a la mutación en el gen *algD*) ya que la mutación del gen *rsmA* no es viable en cepas productoras de alginato (mucoideas) (Morales,2014). Debido a lo anterior no es

posible realizar experimentos para detectar el efecto de la mutación de *rsmA* en fondos genéticos silvestres.

Una alternativa para probar la injerencia de la cascada Gac-Rsm sobre la expresión de sideróforos sería probar el efecto de la mutación del gen que codifica para el regulador *gacA* que a su vez controla al sistema Rsm. De manera específica estudiar la expresión de *csbC* y *csbX* en el caso de los catecoles y de *pvdI* y *pvdS* para las pioverdinas. Además, la estrategia descrita tendría la ventaja de que la mutación del gen *gacA* sí sería viable en el fondo genético silvestre.

Quedaría también por establecer el efecto de la regulación de GacA sobre la síntesis de sideróforos y a que nivel actúa. Todo esto ayudaría a esclarecer la intrincada regulación que posee la biosíntesis de estas moléculas esenciales para nuestra bacteria de interés.

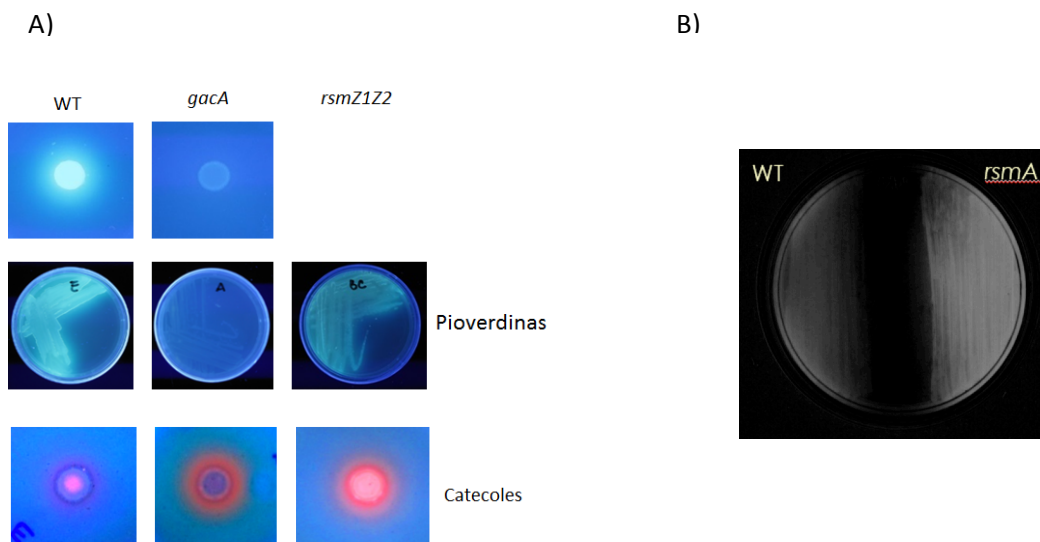


Figura 9. A) Visualización de sideróforos de *A. vinelandii* con luz UV donde se observa la fluorescencia emitida por las pioverdinas en la cepa silvestre E y en la mutante *EgacA*, en colonia y en placa y tinción de cromo azurol donde se observan los catecoles en color rojo en la cepa silvestre E y en la mutante *EgacA*. **B)** Fotografía iluminada con luz UV donde se observa un aumento en la producción de pioverdinas en la mutante *ErsmA* con respecto a la cepa silvestre E.

Justificación

Aunque actualmente se conoce la importancia de sideróforos en sistemas biológicos, el hecho de que sean fundamentales para la supervivencia de éstos y el interés que estas moléculas poseen en distintas industrias por su papel como agentes quelantes de hierro, los mecanismos que regulan su biosíntesis no se encuentran totalmente dilucidados.

Este trabajo contribuirá en la generación de conocimiento sobre los mecanismos que se encuentran implicados en la regulación de la producción de sideróforos en *A. vinelandii*.

Hipótesis

El sistema Gac/Rsm es el regulador maestro en la síntesis diferencial de catecoles y pioverdinas.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el papel regulador del sistema Gac/Rsm en la síntesis de sideróforos en *A. vinelandii*.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la mutación del regulador de respuesta *gacA* a nivel transcripcional y postranscripcional sobre la expresión de los operones *pvd* y *csb*.
- Determinar el efecto de la mutación de *rsmA* a nivel transcripcional y postranscripcional sobre la expresión de los operones *pvd* y *csb*.

Resultados

Verificación mediante análisis de restricción de plásmidos que contienen fusiones transcripcionales y traduccionales *gusA* de genes relacionados con la síntesis de sideróforos.

En el trabajo previo de Barrientos (2017) se realizaron las construcciones que contienen las regiones reguladoras de los genes biosintéticos de interés para este trabajo, *csbC* y *csbX*, involucrados en la producción de catecoles, y *pvdI* y *pvdS*, en la producción de la pioverdina azotobactina.

Las regiones reguladoras de dichos genes se encuentran en el vector integrativo pUMAT*cgusA*, que recombina en el locus neutro *meIA* (Cocotl-Yanez et al., 2014). Dichos vectores, además del sitio de recombinación y de las regiones reguladoras correspondientes, contienen un casete de resistencia a tetraciclina, y el gen reportero *gusA* que codifica para la enzima β -glucoronidasa la cual cataliza la hidrólisis del 4-Nitrofenilo- β -D- glucopiranosido(PNPG) (figura 10).

Otra de las características del vector pUMAT*cgusA* que utilizamos es que *gusA*, al tratarse de un gen reportero su expresión se encuentra bajo el control de la región reguladora de los genes a estudiar. En la fusión transcripcional, el gen reportero utiliza el promotor de la región reguladora insertada río arriba para su transcripción pero posee su propio sitio de unión a ribosoma (RBS) para la traducción, mientras que en la fusión traduccional, el gen reportero utiliza tanto el promotor como el RBS de la región reguladora insertada río arriba, lo que permite determinar la expresión temporal del gen en cuestión.

Los genes *csbC* y *csbX* son divergentes entre sí, por lo que en la región intergénica *csbC-csbX* está localizada la región reguladora de ambos genes, lo cual sucede también con *pvdS* y *pvdI*. Los vectores utilizados contienen clonadas las regiones intergenicas de los genes *csbC* y *csbX* y de *pvdI* y *pvdS*, respectivamente.

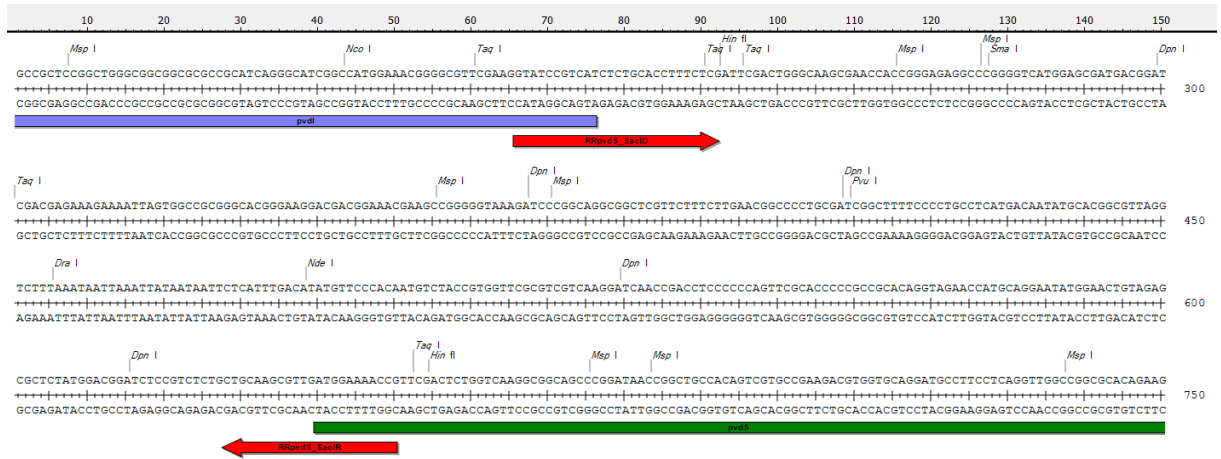


Figura 11. Mapa de las regiones reguladoras de los genes biosintéticos de sideróforos. A) Región reguladoras de los genes *csbC* y *csbX*. B) Región reguladora de los genes *pvdI* y *pvdS*. Las flechas rojas muestran la dirección de los iniciadores correspondientes.

Los plásmidos que portan las fusiones transcripcionales y traduccionales se encuentran en la cepa de mantenimiento DH5 α de *E.coli*. Para corroborar que los plásmidos contenían las regiones reguladoras, las cepas se crecieron en medio líquido LB con el marcador de selección tetraciclina (20 mg/ml), se les extrajo el plásmido y se sometió a una reacción de digestión que debía liberar un fragmento con un peso de 217 pb para la región *cbc* y de 435 pb para la región *pvd* (figura 12).

1. *csbC-gusA*
2. *csbC-´gusA*
3. *csbX-gusA*
4. *csbX-´gusA*

5. *pvdI-gusA*
6. *pvdI-´gusA*
7. *pvdS-gusA*
8. *pvdS-´gusA*

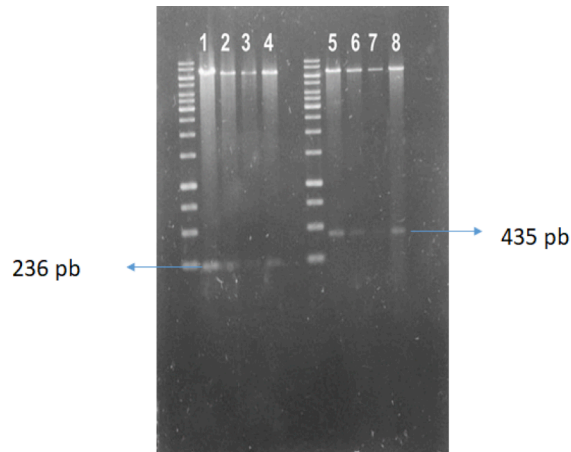


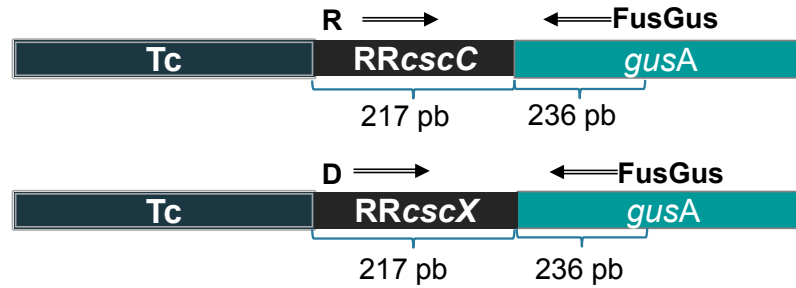
Figura 12. Corroboración por análisis de restricción de la presencia de las regiones reguladoras *csb* y *pvd* en los plásmidos pUMA Tc *gusA* T y pUMA Tc *gusA* PT. Carriles 1-4, inserciones de la región reguladora *csb* con un peso de 217 pb. Carriles 5-8, inserciones de la región reguladora *pvd* con un peso de 435 pb.

Verificación por PCR de las fusiones *csbX-gusA* y *csbC-gusA*.

Una vez que se verificó que las regiones reguladoras *csb* y *pvd* se encontraban clonadas en los vectores pUMATc*gusA* transcripcionales y traduccionales se prosiguió a corroborar la orientación de estas mediante un análisis de PCR utilizando los oligonucleótidos delanteros correspondientes a cada gen y como reverso un oligonucleótido dentro que aparece en el gen reportero *gusA* (figura 13, A).

El tamaño de la región reguladora *csb* sumada a la longitud abarcada dentro del gen *gusA* da como resultado 453 pb, mismo peso que se observó al realizar una electroforesis en gel de agarosa de la muestra tras haberse realizado la PCR, corroborando así que las regiones reguladoras correspondientes se encontraban clonadas en la dirección correcta dentro del vector (Figura 13, B).

A)



B)

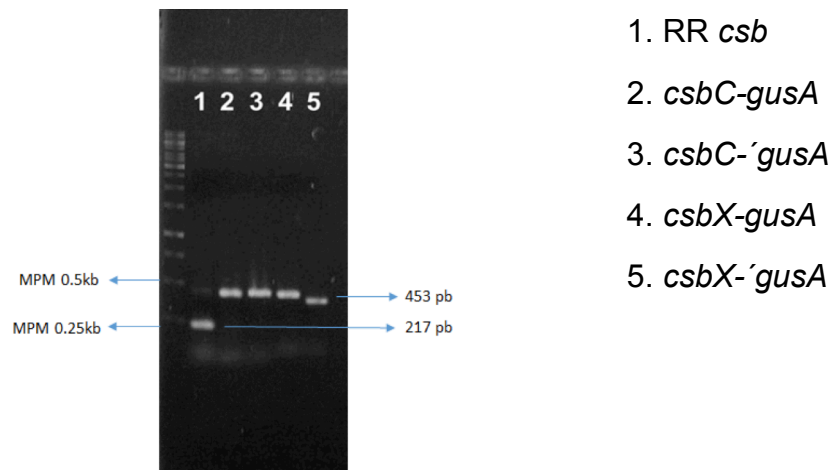


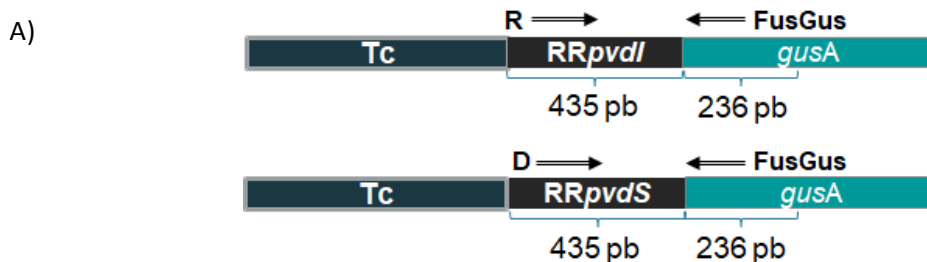
Figura 13. Corroboración por análisis de PCR de la orientación de las regiones reguladoras de los genes *csbC* y *csbX* dentro del vector pUMATgusA. A) Esquema de la región a amplificar dentro de las fusiones y la dirección de los oligonucleótidos utilizados; B) Gel de electroforesis donde se corrieron las muestras de PCR para confirmar que estas contaban con el peso deseado. De igual manera de muestras en el carril uno la muestra correspondiente a la región reguladora sin el fragmento del gen reportero.

Verificación por PCR de las fusiones *pvdI-gusA* y *pvdS-gusA*.

Para corroborar la orientación de las fusiones que contenían la región correspondiente a los genes *pvdI* y *pvdS* se realizó el mismo procedimiento que para las regiones correspondientes a *csbC* y *csbCX*.

Obtenidos los plásmidos mediante extracción por perclorato se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes a cada gen y se obtuvo un amplificado que resultaba en un peso de 671 pb, el cual es la suma de la región reguladora más el fragmento del gen *gusA* (Figura 14, A).

Después de realizar la PCR, la muestra se corrió mediante electroforesis en un gel de agarosa lo que evidenció que en efecto se amplificó la región con el peso esperado corroborando así que al igual que con las fusiones correspondientes a la región *csb*, la región reguladora *pvd* se encuentra clonada en la dirección adecuada (Figura 14, B).



B)

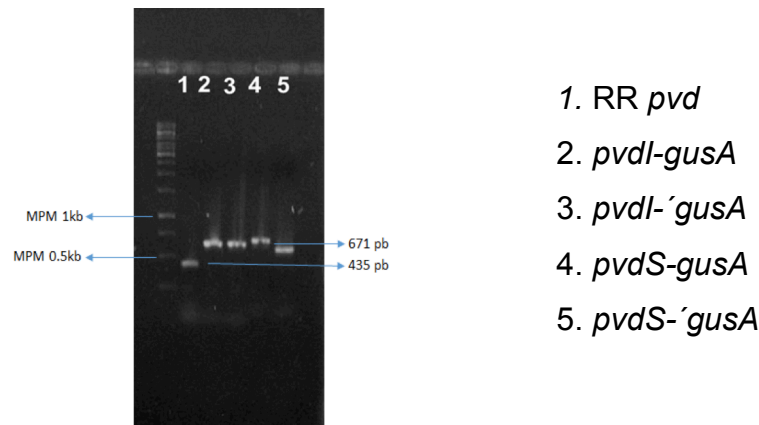


Figura 14. Corroboración por análisis de PCR de la orientación de las regiones reguladoras de los genes *pvdI* y *pvdS* dentro del vector pUMAT*cgusA*. A) Esquema de la región a amplificar dentro de las fusiones y la dirección de los oligonucleótidos utilizados; B) Gel de electroforesis donde se corrieron las muestras de PCR para confirmar que estas contaban con el peso esperado. En el carril uno se muestra la muestra correspondiente a la región reguladora sin el fragmento del gen reportero.

Generación de las cepas de *A. vinelandii* que contienen las fusiones pUMAT*cgusA* transcripcionales y traduccionales

Una vez comprobado que todas las fusiones transcripcionales y traduccionales contenían la región reguladora correspondiente y la orientación adecuada, el DNA plasmídico de la cepa *E. coli* DH5 α se obtuvo en gran cantidad mediante extracción por maxiprep, esto, para transformar la cepa JGDE de *A. vinelandii*.

La cepa JGDE cuenta con una mutación por inserción de un casete de resistencia a Kanamicina dentro del gen *algD*, que codifica para la enzima GDP manosa deshidrogenasa la cual es fundamental para la síntesis del alginato producido por nuestro modelo de estudio. Dicha mutación vuelve a la cepa JGDE una variante no mucoide de la cepa silvestre E y, por lo tanto, un buen modelo de estudio debido a que la mutación del regulador RsmA sólo es factible en fondos genéticos no productores de alginato.

A. vinelandii es una bacteria naturalmente competente, estado que se induce al resembrarse en repetidas ocasiones en medios de cultivo carentes de hierro, llamado medio de competencia (CM). Una vez obtenidas las células competentes, éstas se mezclaron con el DNA plasmídico que contiene las fusiones para después seleccionar las cepas candidatas creciéndolas en medio de selección BS (Burk-Sacarosa) adicionado con tetraciclina 40mg/ml.

Verificación de candidatas de *A. vinelandii* que portan las fusiones *gusA*

A las cepas candidatas, se les extrajo el DNA genómico para verificar mediante análisis de PCR la presencia de las fusiones, lo cual significaría que se llevó a cabo la recombinación de los vectores integrativos en el locus *melA*. Se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos utilizados con anterioridad para verificar la orientación de las regiones reguladoras, para verificar su presencia en el genoma de *A. vinelandii* (Figura 15, figura 16).

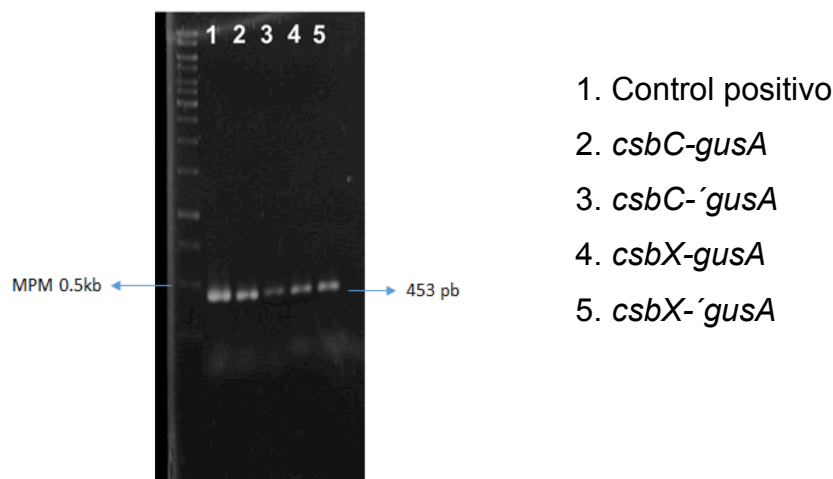


Figura 15. Corroboración por PCR de la presencia de las fusiones *gusA* Transcripcionales y traduccionales de los genes *csbc* y *csbX* en el cromosoma de *A. vinelandii*. Gel de electroforesis donde se corrieron los productos de PCR para confirmar que estas contaban con el peso deseado

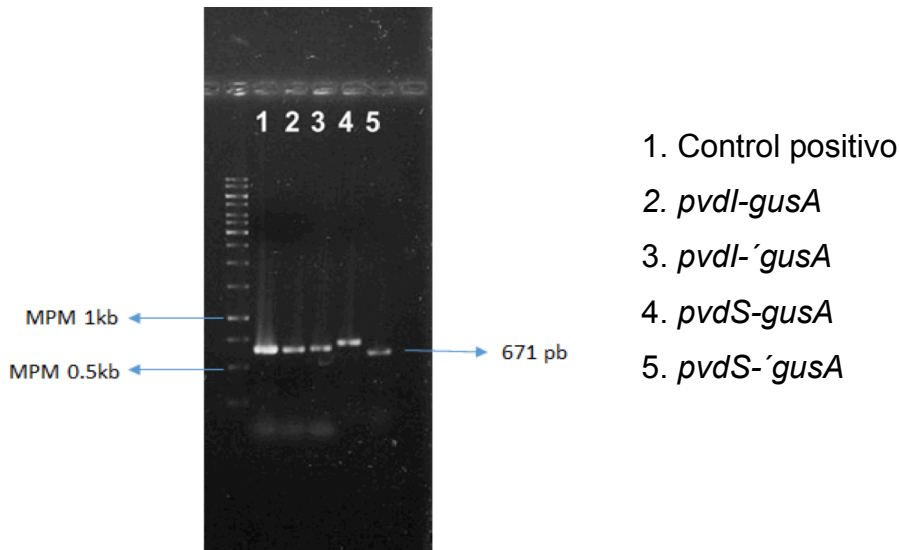


Figura 16. Corroboración por PCR de la presencia de las fusiones *gusA* transcripcionales y traduccionales de los genes *pvdI* y *pvdS* en el cromosoma de *A. vinelandii*. Gel de electroforesis donde se corrieron los productos de PCR para confirmar que estas contaban con el peso deseado.

De esta manera se comprobó que se habían generado exitosamente cepas de *Azotobacter vinelandii* que contienen las fusiones transcripcionales y post-transcripcionales de los genes de interés relacionados a la producción de sideróforos, recombinadas en su cromosoma.

Generación de las cepas mutantes en *rsmA* y *gacA* en *A. vinelandii*

Una vez que se obtuvieron y se verificaron correctamente las cepas que contenían las fusiones *gusA*, se prosiguió a generar mutaciones tanto en el gen que codifica la proteína reguladora GacA como en el gen que codifica a la proteína RsmA, utilizando los plásmidos mutagénicos construidos en trabajos previos.

Para generar la mutación en *rsmA* se utilizó el plásmido pGEM*rsmA*::GM, contruido previamente a partir del vector pGEM, que porta el gen *rsmA* con una inserción del casete de resistencia al Gentamicina en el extremo carboxilo terminal

(Figura 17). Este plásmido fue utilizado para transformar las cepas JGDE de *A. vinelandii* que portan las fusiones transcripcionales y traduccionales descritas anteriormente. Posteriormente se seleccionaron las cepas candidatas que crecieron en medio de selección BS adicionado con Gentamicina 1.5mg/ml.

Para generar la mutación en *gacA* se utilizó el plásmido pSAFAgacA::Gm, contruido con anterioridad a partir del vector pBluescript KS, que porta el gen *gacA* con una inserción de un casete de resistencia a Gentamicina (Figura 17). Dicho plásmido fue utilizado para transformar cepas competentes de *A. vinelandii* que portaban las fusiones transcripcionales y traduccionales *csb-gusA* y *pvd-gusA* para posteriormente seleccionar las cepas candidatas que crecieron en medio de selección BS con Gentamicina 1.5mg/ml.

A las candidatas se les verificó por PCR que se hubiera llevado a cabo una doble recombinación homóloga donde el locus silvestre se intercambiaría por el locus mutante para ambas mutaciones.

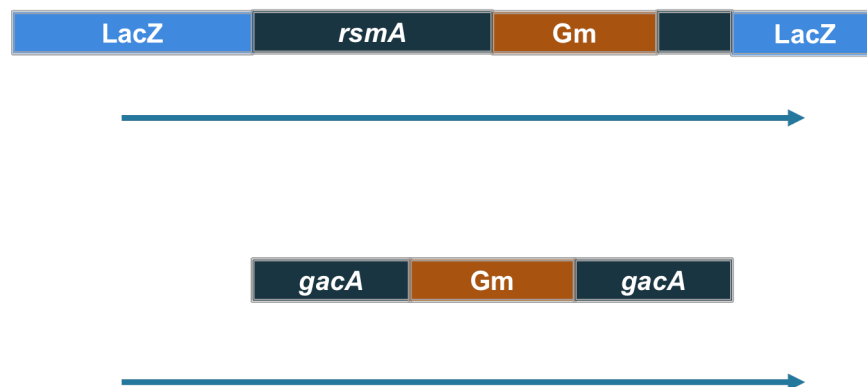


Figura 17. Esquemas de las regiones mutagénicas de los plásmidos utilizados para obtener las cepas mutantes en *rsmA* y *gacA*. A) Plásmido mutagénico pGEMrsmA::Gm B) Plásmido mutagénico pSAFAgacA::Gm

Verificación de mutantes JGDE*rsmA*.

El DNA genómico de las candidatas seleccionadas en el medio de selección adicionado con Gentamicina, se verificó mediante PCR la presencia de la mutación del gen *rsmA* en el genoma de *A. vinelandii*. Utilizando los oligonucleótidos delantero y reverso del gen *rsmA*, se espera un amplificado con el peso del gen más la inserción del casete de gentamicina, lo que suma 1800 pb, 900pb del gen silvestre y 900pb del marcador de resistencia (Figura 18, B).

De esta manera se confirmó el intercambio alélico del gen *rsmA* en el locus silvestre de la cepa JGDE que portan las fusiones transcripcionales o traduccionales correspondientes para los genes *csbC*, *csbX*, *pvdI* y *pvdS*.

Cabe destacar que del total de mutantes generadas, tres mostraron la presencia del gen silvestre, lo que pone en evidencia la merodiploidia de estas, estado que puede explicarse por la poliploidía del genoma de *A. vinelandii*.

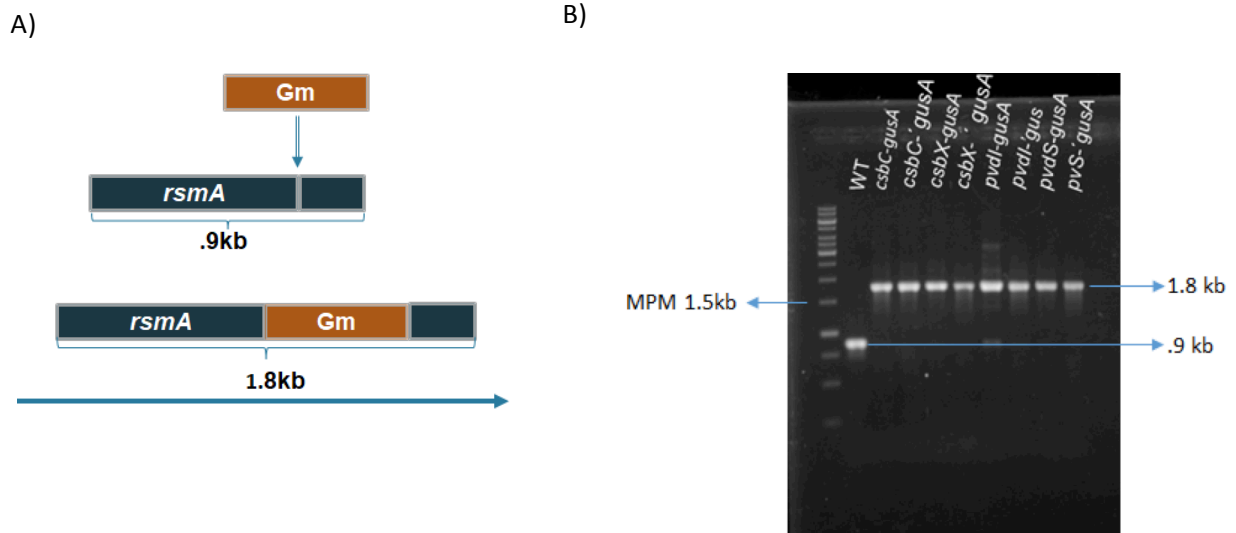


Figura 18. Corroboración por análisis PCR de la presencia de la mutación del gen *rsmA* en el cromosoma de *A. vinelandii*. A) Esquema del gen silvestre *rsmA* y de dicho gen con una inserción del gen de Gentamicina (debajo se muestran los pesos en

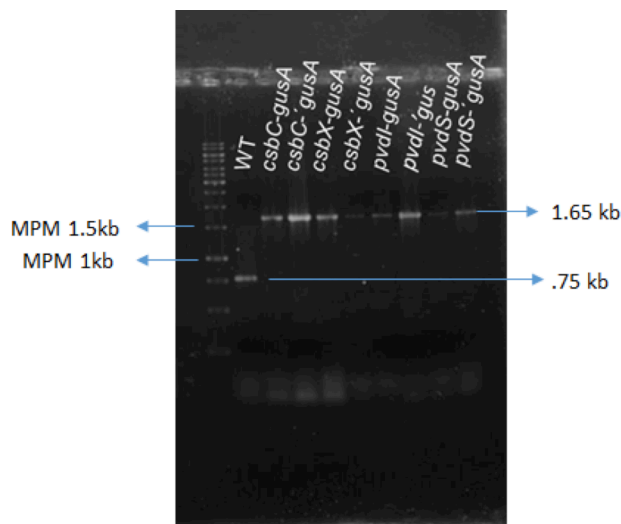
kilobases, kb) B) Gel de electroforesis donde se muestra en el primer carril la amplificación del gen silvestre y en los carriles adyacentes la amplificación del gen mutado en cada una de las cepas que contienen las fusiones transcripcionales y traduccionales

Verificación de mutantes *gacA*

Una vez que se seleccionaron las candidatas de manera similar a lo descrito , se les extrajo el DNA genómico y se verificó que en efecto se encontrara mutado el gen *gacA*, por análisis de PCR y utilizando los oligonucleótidos delantero y reverso del gen *gacA* se esperaba como resultado un amplificado con el peso del gen *gacA* más el de la inserción del casete de gentamicina que sumaba 1650 pb, 750 pb del gen silvestre y 900pb del casete de resistencia (Figura 19 A).

De la forma descrita , se comprobó la obtención de la mutante *gacA* que en las cepas que contienen las fusiones de los genes *csb* y *pvd* y, en este caso, no se observa ninguna copia del gen silvestre *gacA* lo que indica que se obtuvieron mutantes completamente segregadas (Figura 19 B).

A)



B)

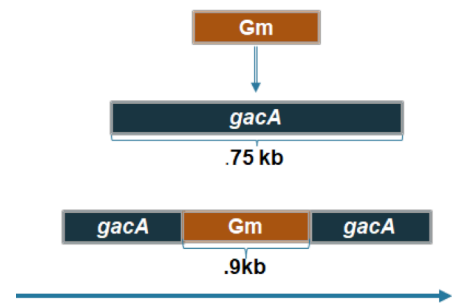


Figura 19. Corroboración por PCR de la presencia de la mutación en el gen *gacA* en el cromosoma de *A. Vinelandii*. A) Gel de electroforesis donde se muestra en el primer

carril la amplificación del gen silvestre y en los carriles adyacentes la amplificación del gen mutado en cada una de las cepas que contienen las fusiones transcripcionales y traduccionales. B) Esquema del gen silvestre *gacA* y de dicho gen con una inserción del gen de Gentamicina (debajo se muestran los pesos en kilobases, kb)

Determinación del efecto de la mutación de los reguladores de *gacA* y *rsmA* sobre la expresión de los genes *csbC*, *csbX*, *pvdI* y *pvdS* así como en la producción de sideróforos.

Llegado a este punto se habían obtenido 16 cepas de *A. vinelandii* en total; ocho correspondientes a las cepas que poseían la mutación en el gen *rsmA* y las fusiones *gusA* respectivas de los genes biosintéticos de sideróforos y otras ocho cepas que poseían la mutación en el gen *gacA* y las fusiones transcripcionales y traduccionales correspondientes. Para continuar el trabajo, se eligieron solo las cepas JGDE*pvdS-gusAT*, JGDE*pvdS-gusATgacA::Gm* y JGDE*pvdS-gusATrsmA::Gm* debido a que al realizar un ensayo preliminar de actividad específica β -glucuronidasa, en las cepas restantes no se observó actividad del reportero.

Partiendo de los cultivos de las cepas JGDE*pvdS-gusAT*, JGDE*pvdS-gusATgacA::Gm* y JGDE*pvdS-gusATrsmA::Gm* en medio BS líquido sin hierro incubados 48 horas en agitación, se tomó una muestra de 25 ml en la que se realizó la medición de la actividad de la enzima β -glucuronidasa con la cual se puede establecer de manera indirecta la transcripción del gen fusionado, en este caso *pvdS*.

Se observó que las mutaciones en los genes *gacA* y *rsmA* tuvieron un efecto evidente en la transcripción del gen *pvdS* con respecto a la cepa silvestre (Figura 21).

Con respecto a la cepa JGDE*gacA*, se observó un claro descenso en la transcripción del gen *pvdS* lo que probablemente resultaría en una menor producción del sideróforo azotobactina. Por el contrario, se observó que en la cepa mutante JGDE*rsmA*, la enzima B-glucoronidasa mostró un aumento de la actividad al doble con respecto a la cepa control JGDE, lo que evidencia una mayor transcripción del gen *pvdS*.

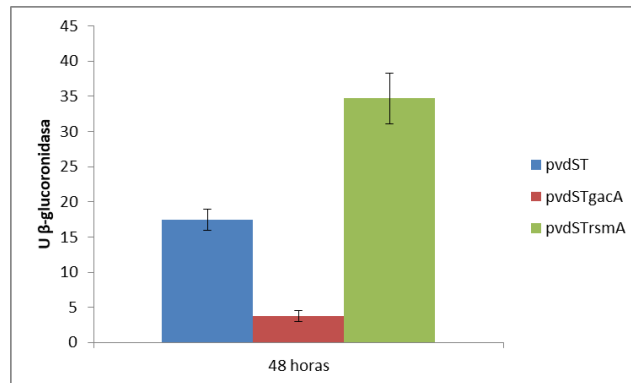


Figura 21. Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa de las fusiones *pvdS-gusA*. La cuantificación se realizó a las 48 h de la actividad β -glucuronidasa de la fusión transcripcional *pvdS-gusA* en las cepas, JGDE*pvdS-gusAT*, JGDE*pvdS-gusAT gacA::gm* y JGDE*pvdS-gusAT rsmA::gm* crecidas en medio mínimo BS sin hierro.

Verificación de la mutante *EpvdS*.

Al usar al gen *pvdS* como blanco de regulación donde se detectó el efecto de la mutación de *rsmA* y *gacA* se hacía indispensable confirmar que *pvdS* la esencialidad del gen para la síntesis de pioverdinas. Por otra parte para confirmar si un aumento o disminución de la expresión del gen *pvdS* se traduce en un producción mayor o menor producción de sideróforos se planteó cuantificar la síntesis de los sideróforos (tanto pioverdinas como catecoles) en las mutantes *rsmA* y *gacA* teniendo como control a la mutante *pvdS*.

Previamente en el laboratorio, se había construido una mutante *EpvdS*, en la cual se generó una mutación por inserción de un casete de resistencia a Gentamicina.

Después de sembrar dos clones de la cepa en medio BS sin hierro, se observó que efectivamente poseían un fenotipo de una no productor de pioverdinas. Una vez confirmado lo anterior se prosiguió a extraer el DNA cromosomal de las candidatas para confirmar por PCR la mutación. Se utilizaron oligonucleótidos que flanquean al gen silvestre y se esperaba tener un amplificado de 2000 pb debido a la suma del peso de 1100 pb del locus *pvdS* silvestre y regiones aledañas y de 900 pb del casete de gentamicina (Figura 21 A).

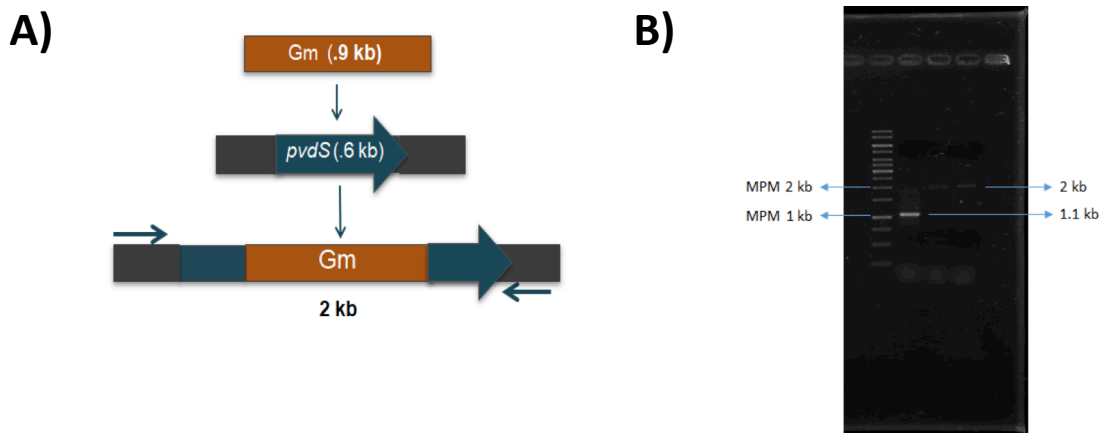


Figura 21. Corroboración por PCR de la presencia de la mutación en el gen *pvdS* en el cromosoma de *A. vinelandii*. A) Esquema del locus silvestre *pvdS* y de la mutación por inserción del gen de resistencia a Gentamicina. B) Gel de electroforesis donde se muestra la amplificación del locus silvestre (primer carril) y la amplificación del locus *pvdS* con la inserción del casete de Gentamicina.

Una vez realizada la PCR se corrieron las muestras en un gel de electroforesis donde se visualizó satisfactoriamente el amplificado del gen *pvdS* con la inserción del casete de resistencia en ambas clonas; por lo que se prosiguió a seleccionar una de estas para realizar el experimento subsecuente. Cabe aclarar que en este caso la selección de cualquiera de las dos clonas candidatas es indistinto, ya que ambas mostraron el mismo fenotipo y el mismo peso en la amplificación del gen *pvdS*.

Cuantificación de catecoles y azotobactinas en las cepas JGDE*pvdS-gusAT*, JGDE*pvdS-gusAT gacA::gm* y JGDE*pvdS-gusAT rsmA::gm*.

La cepa control *EpvdS* y las cepas JGDE*pvdS-gusAT*, JGDE*pvdS-gusAT gacA::gm* y JGDE*pvdS-gusAT rsmA::gm* fueron sembradas en placas con medio mínimo BS sólido adicionadas con el antibiótico de selección (Tetraciclina). Pasadas 48 horas se inocularon en medio mínimo BS líquido sin hierro (25ml de medio-25µl de Tetraciclina 40 mg/ml). Se incubaron 24 horas en agitación (200 rpm) a 30° C y se tomó un mililitro de cada uno para inocular 50 ml de medio BS líquido sin hierro y sin antibiótico.

La cuantificación de ambos sideróforos (catecoles y azotobactina) se realizó tomando una muestra cada 24 horas, iniciando en el momento en que se inoculó el cultivo líquido, tomando 5 ml de este para realizar la cuantificación. De esta manera se buscaba comparar la producción de estos en diversas etapas del crecimiento, correspondiendo la muestra tomada a las 24 horas a la etapa exponencial, la muestra tomada a las 48 horas a la etapa estacionaria y por último la tomada a las 72 horas a la etapa estacionaria tardía.

La cuantificación de pioverdinas se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Page & Huer(1991) (Material y métodos pag.54), y se observó que ambas mutantes, JGDE*pvdS-gusAT gacA::gm* y JGDE*pvdS-gusAT rsmA::gm*, produjeron menos Azotobactinas dentro de las primeras 48 horas, en relación con la cepa parental JGDE*pvdS-gusAT*, la cual sólo contiene la fusión transcripcional *pvdS-gusA* insertada en el locus neutro *melA*. Llegadas las 72 horas de cultivo se observó que la cepa parental JGDE*pvdS-gusAT* no cambió considerablemente con respecto a la medición realizada a las 48 horas; mientras que en la cepa mutante JGDE*pvdS-gusATrsmA::gm* la medición de las 48 horas muestra un aumento en la producción de azotobactina aproximadamente el doble respecto a la cuantificación realizada 72 horas, sin embargo, no rebasó los niveles de producción de la cepa madre. Como era esperado la cepa JGDE*pvdS-*

gusATgacA::gm mostró una producción menor de azotobactinas (pioverdinas) en todas las mediciones que se realizaron con respecto a la cepa *JGDEpvdS-gusAT*.

Como se esperaba, la cepa control *EpvdS::gm* no produjo la pioverdina azotobactina.

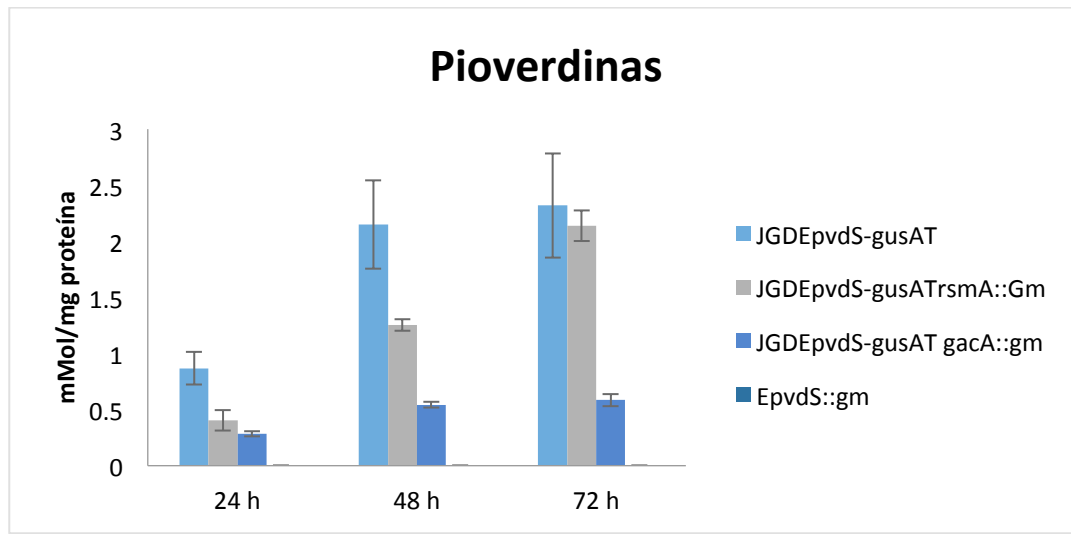


Figura 22. Cuantificación de azotobactina en las cepas *Epvds::gm*, *JGDEpvdS-gusAT*, *JGDEpvdS-gusAT gacA::gm* y *JGDEpvdS-gusAT rsmA::gm*. Cuantificación de azotobactina a las 24, 48 y 72 horas de las cepas *Epvds::gm*, *JGDEpvdS-gusAT*, *JGDEpvdS-gusAT gacA::gm* y *JGDEpvdS-gusAT rsmA::gm* en medio líquido BS sin hierro.

En cuanto a la producción de los sideróforos de tipo catecoles, se observó que ocurría lo contrario a lo observado en las cuantificaciones de pioverdinas. Tomando a la cepa parental *JGDEpvdS-gusAT* como referencia nos encontramos que la cepa *JGDEpvdS-gusATrsmA::Gm* mostró una baja en la producción de catecoles en todas las fases de crecimiento, contrario a lo observado en la cepa mutante *JGDEpvdS-gusATgacA::Gm* donde se observó, en todas las muestras cuantificadas, un claro aumento en la producción de estos sideróforos, encontrando un cambio más significativo en las muestras de las 48 y 72 horas (Figura 23).

La cepa *EpvdS::gm* produjo una gran cantidad de catecoles comparada con las otras cepas.

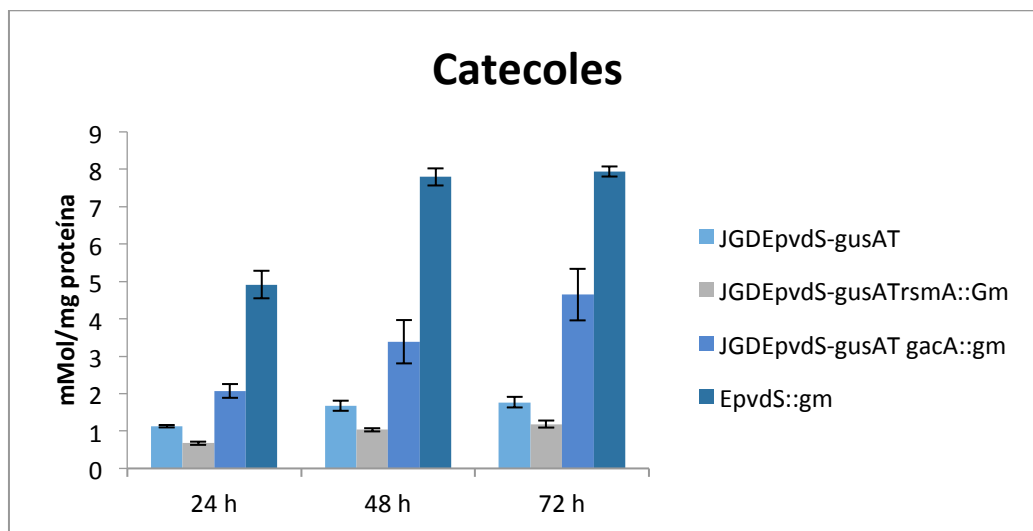


Figura 23. Cuantificación de catecoles en las cepas *Epvds::gm*, *JGDEpvdS-gusAT*, *JGDEpvdS-gusAT gacA::gm* y *JGDEpvdS-gusAT rsmA::gm*. Cuantificación de catecoles a las 24, 48 y 72 horas de las cepas *Epvds::gm*, *JGDEpvdS-gusAT*, *JGDEpvdS-gusAT gacA::gm* y *JGDEpvdS-gusAT rsmA::gm* en medio líquido BS sin hierro

Discusión

En trabajos previos se había estudiado la regulación del sistema de doble componente GacS/GacA sobre la producción de sideróforos (catecoles y pioverdinas) en distintas cepas de *A. vinelandii*. Las observaciones llevaron a hipotetizar que la regulación ejercida por dicho sistema de doble componente se ejercía a través del sistema de regulación post-transcripcional Rsm pero los resultados mostraron grandes variaciones por lo cual no se brindaron conclusiones concretas (Barrientos, 2017). El hecho de la selección de la cepa JGDE la cual no produce alginato por una mutación del gen biosintético *algD* se pensó en un principio como una posible solución a la alta variabilidad que habían mostrado los experimentos realizados en otros fondos genéticos productores de alginato.

La producción de sideróforos ha sido ampliamente estudiada en *P. aeruginosa* una bacteria filogenéticamente relacionada a *A. vinelandii*, lo cual ha servido como modelo de referencia para comprender el funcionamiento de las vías biosintéticas de los sideróforos, en *A. vinelandii*. Estas vías están poco estudiadas en Azotobacterias, y aunque es probable que existan semejanzas también pueden presentar diferencias sustanciales entre los dos modelos así como en los mecanismos que las regulan estas vías metabólicas. *A. vinelandii* posee un queloma mayor que *P. aeruginosa*, lo que se traduce en una mayor variedad de sideróforos producidos (Brandel et al., 2011. Baars et al., 2016).

Previamente, en cepas de *A. vinelandii* mutantes en genes biosintéticos de sideróforos se había reportado la síntesis diferencial entre catecoles y pioverdinas y se asumía una producción compensatoria de éstos (Yoneyama et al., 2011), observaciones que se corroboraron en este trabajo, pero ahora estudiando el efecto de genes reguladores. Dicha expresión diferencial explicaría el hecho de que en el ensayo de cuantificación de sideróforos la mutante *gacA* mostrará una producción atenuada de pioverdinas y un aumento sustancial en la producción de

catecoles, contrario a lo observado en la mutante *rsmA* donde la síntesis de catecoles se encuentra reducida respecto a la cepa silvestre.

El fenómeno de compensación puede encontrar su génesis en dos mecanismos distintos de los cuales aún falta esclarecer cual es el correcto. Un mecanismo se debería a una respuesta genética diferencial mientras que el otro se explicaría como una regulación alostérica de corte fisiológico, donde la expresión de los genes relacionados a la síntesis de determinado sideróforo no se vería alterada pero si la actividad de las enzimas codificadas por estos, aumentando o disminuyendo su eficiencia.

Para dilucidar esta cuestión fue que se planteó utilizar las fusiones transcripcionales y traduccionales de los genes *csbC* y *csbX* y los genes *pvdI* y *pvdS* involucrados en la producción de catecoles y pioverdinas respectivamente. De esta manera, y utilizando las herramientas que nos proporcionaran las fusiones, si se encontraba una expresión genética diferencial en las cepas nos indicaría que la producción estaría controlada a nivel genético mientras que de no ser así nos señalaría una compensación a nivel fisiológico mientras que al mismo tiempo se podría determinar a qué nivel se estaría dando la regulación.

El hecho que una gran cantidad de las cepas construidas no mostraran actividad de la enzima reportera impidió que se tuviera una vista más clara de los elementos presentes en la vía de síntesis de los sideróforos y de cómo estos interactúan para su regulación, aun así las cepas que portan la fusión transcripcional del gen *pvdS* nos permitieron esclarecer parte de la intrincada vía que supone la regulación en la producción de sideróforos en *A. vinelandii*.

Al analizar los datos obtenidos se encuentra que, acorde a lo esperado, se observó un aumento en la transcripción del gen *pvdS* en la cepa que poseía una mutación en *rsmA*, lo que nos indica el papel que esta proteína juega como regulador negativo en la producción de azotobactina, y una disminución en la que posee la mutación en el gen *gacA*, que señala el rol como regulador positivo en la producción de azotobactina.

Para establecer si existía linealidad entre la expresión del gen *pvdS* con la síntesis de sideróforos en las mutantes *rsmA* y *gacA* se realizaron las cuantificaciones correspondientes donde se observó que, en lo referente a las azotobactinas, la producción en la cepa mutante en *gacA* se vio atenuada en todas las etapas de crecimiento lo que nos confirma el papel como regulador positivo que posee esta proteína.

Al medir la azotobactina en la cepa mutante en *rsmA* se observó que, contrario a lo que sucedía en el resto de cepas, el pico de producción se encontraba hasta las 72 horas de cultivo, hecho que quizás se justifique por la dificultad que muestra esta cepa para crecer dentro de las primeras 48 horas en medio líquido, tomándole más tiempo para llegar a fase exponencial. Dentro del mismo ensayo y contrario a lo esperado, se observó que si bien existe una mayor transcripción de *pvdS* esto no se ve reflejado en la producción de azotobactina ya que no hay una diferencia sustancial si esta se compara con la cepa silvestre. Lo anterior sugiere la existencia de regulación a otros niveles que controlen la estabilidad del RNA mensajero, su traducción o bien la actividad de la proteína.

Además de descifrar a que nivel RsmA controla la síntesis de las pioverdinas queda por esclarecer el mecanismo de regulación en la síntesis de catecoles y si ésta se lleva a cabo de manera directa por o si existe un mediador de la regulación intermediario. Como se recordará la fusión *gusA* utilizada es transcripcional, de tal manera que podría existir un regulador transcripcional intermediario que podría estar regulado post-transcripcionalmente por RsmA.

Conclusiones

1. La cascada de regulación Gac-Rsm está involucrada en la regulación de la síntesis de sideróforos en *A. vinelandii*
2. Ocurre un proceso de compensación en caso de que no se produzca alguno de los dos sideróforos.
3. El gen *pvdS* es regulado transcripcionalmente de manera negativa por la proteína RsmA y positiva por GacA.

Material y métodos

Oligonucleótidos, Cepas y vectores

Nombre	Secuencia	Tm
RRcsbC_SacID	SacID 5' ACG AGC TCC ATG ATG CCT CCT TAC GG 3'	64°C
RRcsbC_SacIR	5' TCG AGC TCC ATG CTC TCT CCA AGT GA 3'	64°C
RRpvdS_SacID 5'	5' GTG AGC TCC ATC TCT GCA CCT TTC TCG 3'	64°C
RRpvdS_SacIR	5' CGG AGC TCC ATC AAC GCT TGC AGC AG 3'	64°C
GusAFus2	5' TTG ACC CAC ACT TTG CCG TAA TGA 3'	64 °C
wgacAD	5' ATT AGG GTG CTT GTC GTC G3'	58 °C
wgacAR	5' GAA CAA GCG TTT CCT GAG A3'	58 °C
RsmA1kbF	5' CGA CGG TGC GCA TTA TAG TGT 3'	57 °C
RsmA1kbR	5' CGG CGC ACG CGA AGT CAT T 3'	57 °C
PvdS_F1	5' TTC GGC GGC CCT AATT CCT GCG 3'	64°C
PvdS_R1	5' GGA GAG GCC CGG GGT CAT GGA GC 3'	64°C

Tabla. Oligonucleótidos utilizados para comprobación por PCR.

Célula	Cepa	Descripción	Origen	Cultivo
<i>E. coli</i>	DH5α	EndA hsdR17 supE44 thi-1λ- recA1 gyrA96 retAΔlacU169Φ80	Woodcock, et al., 1989	Luria Bertani, 37°C

		(Δ lacZ Δ M15)		
A. vinelandii	<i>Epvds::gm</i>	Mutante derivada de la cepa E a la que se le inserto un casete de resistencia a Gentamicina interrumpiendo el gen <i>pvdS</i> .	Datos no publicados	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Gentamicina 1 mg/ml
	JGDE	Mutante derivada de la cepa E a la que le insertó un casete de resistencia a Kanamicina interrumpiendo el gen <i>algD</i> .	IBT/ UNAM	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Kanamicina 4mg/ml
	JGDE <i>pvdS-gusAT</i>	Derivada de la cepa JGDE a la que se le inserto por doble recombinación homóloga en el locus <i>meIA</i> el plásmido pUMAT <i>cpvdSgusAT</i>	Este trabajo	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Tetraciclina 40 mg/ml
	JGDE <i>pvdS-gusATgacA::gm</i>	Mutante derivada de la cepa JGDE <i>pvdS-gusAT</i> a la que le insertó un casete de resistencia a Kanamicina interrumpiendo el gen <i>algD</i> .	Este trabajo	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Tetraciclina 40 mg/ml, Gentamicina 1 mg/ml
	JGDE <i>pvdS-gusATrsmA::gm</i>	Mutante derivada de la cepa JGDE <i>pvdS-gusAT</i> a la que le insertó un casete	Este trabajo	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Tetraciclina

		de resistencia a Kanamicina interrumpiendo el gen <i>algD</i> .		40 mg/ml, Gentamicina 1 mg/ml
--	--	---	--	----------------------------------

Tabla. Bacterias y cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Características	Referencias
pUMATcpvdSgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdS</i>	Barrientos, 2017
pUMATcpvdSgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdS</i>	Barrientos, 2017
pUMATcpvdlgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdI</i>	Barrientos, 2017
pUMATcpvdlgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdI</i>	Barrientos, 2017
pUMATccsbCgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>csbC</i>	Barrientos, 2017
pUMATccsbCgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>csbC</i>	Barrientos, 2017
pUMATccsbXgusAT cdc	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>csbX</i>	Barrientos, 2017
pUMATccsbXgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>csbX</i>	Barrientos, 2017
pSAFA3	Derivado del pSAFA2, porta el gen <i>gacA</i> (750 b)	Castañeda et al., 2001

	con inserción de un casete de resistencia a Gentamicina	
pGEMrsmA::GM	Derivado del pGemT-Easy, porta el gen <i>rsmA</i> (1 kb) con inserción de un casete de resistencia a Gentamicina	Morales, 2014

Tabla. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Medios de cultivo

Luria Bertani (LB)

- Agar bacteriológico* 10g/L
- Peptona de caseína 5g/L
- Cloruro de sodio 5g/L
- Extracto de levadura 10g/L

*En el caso de que se necesite medio solido

Burk Sacarosa (BS)

- Sacarosa 20%: 200 g/L
- Buffer fosfatos (PO₄): K₂HPO₄ 0.8 g/L + KH₂PO₄ 0.2 g/L, pH 7
- Cloruro de calcio (CaCl₂): CaCl₂. 2H₂O 0.073 g/L
- Sulfato de sodio (Na₂SO₄): Na₂SO₄ 0.183 g/L
- Cloruro de magnesio (MgCl₂): MgCl₂. 6H₂O 0.16 g/L

- Molibdato de sodio (Na_2MnO_4): $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0002 g/L
- Sulfato de hierro (FeSO_4): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L
- Agua destilada

Medio de Competencia (CM)

- Sacarosa 20%: 200 g/L
- Buffer fosfatos (PO_4): K_2HPO_4 0.8 g/L + KH_2PO_4 0.2 g/L, pH 7
- Cloruro de calcio (CaCl_2): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.073 g/L
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4): Na_2SO_4 0.183 g/L
- Cloruro de magnesio (MgCl_2): $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.16 g/L
- Agua desionizada

Extracción de plásmido

Perclorato

Soluciones y reactivos

- Solución TES (Tris-EDTA-Sacarosa): Sacarosa 15%, Tris 50 mM a pH 8.5, EDTA 50 mM a pH 8.0
- Lisozima 10 mg/ml
- NaClO_4 5M
- RNAsa 10 mg/ml

Protocolo

Se parte de un cultivo de *E. coli* en un tubo de polipropileno con 3 ml de LB líquido.

1. Centrifugar 3 ml de cultivo.
2. Decantar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de $MgSO_4$.
3. Transferir todo a un tubo de 1.5 ml.
4. Centrifugar 10 segundos a 12000 rpm y decantar el sobrenadante.
5. Resuspender en 175 μ l de solución TES.
6. Agregar 25 μ l de lisozima.
7. Mantener 20 minutos en hielo.
8. Agregar 400 μ l de agua helada destilada.
9. Incubar 15 minutos a 73°C.
10. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml.
12. Agregar 60 μ l de $NaClO_4$.
13. 600 μ l de Isopropanol y mezclar.
14. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm.
15. Lavar el pellet con 500 μ l de Etanol al 70% 2 veces.
16. Secar a 55°C
17. Resuspender en 30 μ l de RNAsa e incubar 1 hora a 37°C.

Maxiprep

Soluciones y reactivos

- Solución 1: Glucosa 10mM, EDTA 2mM, TrisCl 5mM, todo a pH 8.0
- Solución 2: NaOH 2N, SDS 10%
- Solución 3: Acetato de Na o K (5M), Ac. Acético Glacial, todo a pH 4.8
- RNAsa 20 mg/ml

Protocolo

1. Bajar las células de un cultivo de *E. coli* de 50 ml en LB líquido.

2. Lavar 1 vez con MgSO_4 10 mM.
3. Agregar 2 ml de la Solución 1 y mezclar en el vórtex.
4. Agregar 3 ml de la Solución 2, mezclar despacio y dejar reposar de 1 a 2 min.
5. Agregar 2 ml de la Solución 3, mezclar despacio e incubar en hielo por 15 min.
6. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y recuperar sobrenadante.
7. Agregar un volumen de isopropanol e incubar 15 minutos en hielo.
8. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y decantar.
9. Lavar 2 veces con 2 ml de etanol al 70% y centrifugar por 2 minutos.
10. Secar la pastilla a 55°C e incubar toda la noche con 100 μl de RNAsa a 37°C .

Extracción de DNA genómico

Soluciones y reactivos

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

Protocolo

1. Cosechar las células por centrifugación de un cultivo de *A. vinelandii* en 25 ml de medio.

2. Lavar 1 vez con MgSO_4 10 mM.
3. Resuspender en 450 μl de buffer TE 50/20.
4. Agregar 50 μl de lisozima y 50 μl de proteasa e incubar 1 hora a 37°C.
5. Agregar 50 μl de SDS 10% e incubar 15 min a 37°C o hasta que se observe una solución turbia y viscosa.
6. Agregar 100 μl de NaCl 5M, mezclar e incubar 10 min a 65°C.
7. Adicionar 80 μl de CTAB (previamente incubado a 65°C) e incubar de 15 a 20 min a 65°C.
8. Agregar un volumen de una solución de Cloroformo-Alcohol isoamílico y dar vórtex.
9. Centrifugar 5 min a 10 mrpm y recuperar sobrenadante.
10. Agregar 10 μl de sílica y centrifugar 2 min a 10 mrpm.
11. Lavar la pastilla 3 veces con 600 μl New Wash y centrifugar 2 min.
12. Secar la pastilla a 55°C y resuspender en 30 μl de RNAsa a 37°C.
13. Centrifugar 2 min a 10 rpm y recuperar sobrenadante.

Electroforesis

Soluciones y reactivos

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

Protocolo

Para determinación de la concentración de DNA, se analiza la muestra en un gel de agarosa.

1. Cargar en el primer pozo de un gel de agarosa el marcador de peso molecular de concentración conocida, seguido de las muestra de DNA en los pozos que siguen.

2. Teñir el gel en bromuro de etidio.
3. Visualizar en un transiluminador de luz UV.

Reacción de restricción

Soluciones y reactivos

- Enzima de restricción *SacI*

Enzima	Extremos generados	Temperatura de actividad	Secuencia de corte	Marca
<i>SacI</i>	Cohesivos	37°	5'GACGT\C 3'	Thermo Scientific

- Buffer *PacI, SacI, Ecl36II* 10x Thermo Scientific

Protocolo

1. Mezclar en un tubo eppendorf de 1.5 ml lo siguiente
 - 30 µL de plasmido a una concentración de 145 ng/µL
 - 5 µL de buffer 10x
 - 0.25 µL de enzima *SacI*
 - 14.75 µL de agua
2. Incubar la mezcla 2 horas a 37°C
3. Detener la reacción incubando 20 minutos a 65°C

Transformación en *A.vinelandii*

Preparación de células competentes

1. A partir de una placa fresca de medio BS sólido subcultivar la cepa de *A. vinelandii* en medio CM incubando 48 horas a 30°C.
2. A partir de este cultivo sembrar una placa de CM en toda su superficie con la ayuda de un asa. Incubar a 24 horas a 30°C.
3. Recolectar todas las células en 1 ml de MgSO₄ 10 mM con la ayuda de un asa grande.
4. Lavar las células 2 veces con MgSO₄ 10mM.
5. Resuspender las células en 160 µl de medio CM y 840 µl de MgSO₄ 10 mM.
6. Proceder a transformar.

Transformación

1. Se toman 200 µl de células competentes de *A. vinelandii* y se le agregan de 10 a 50 µl de plásmido, dependiendo de la concentración del mismo, y se mezcla despacio.
2. Se depositan los 200 µl de células en el centro de una placa pequeña de CM con una pipeta, cuidando que el líquido no se derrame por toda la superficie.
3. Se deja secar en esterilidad y se incuba por 48 horas a 30°C.
4. Se recogen las células con un asa grande y se depositan en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de MgSO₄ 10 mM, se lavan 2 veces con MgSO₄ 10 mM.
5. Se siembran 200 µl en placas de selección, de medio BS con los antibióticos correspondientes.

Cuantificación de proteína (Método de Lowry)

Soluciones y reactivos

- Solución reactiva: 1 ml de solución B + 1ml de solución C + 98 ml de solución A
- Solución A: Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1N
- Solución B: Tartrato de Na y K 2%
- Solución C: CuSO₄ 1%
- Folin 1:2

Protocolo

1. Centrifugar 25 ml de cultivo de 48 horas hasta obtener paquete celular.
2. Lavar las células con MgSO₄ 10 mM y resuspender en 1 ml.
3. Tomar 10 µl y llevarlo a un volumen final de 200 µl con MgSO₄.
4. Agregar 1 ml de la solución reactiva, mezclar y dejar reposar 10 minutos.
5. Agregar 100 µl de folin y dejar reposar 30 minutos.
6. Medir absorbancia a 625 nm.
7. Correr al mismo tiempo una curva de calibración usando Albúmina Sérica

Albumina	MgSO₄	Vf
0 µl	200 µl	200 µl
2 µl	198 µl	200 µl
4 µl	196 µl	200 µl
8 µl	192 µl	200 µl
16 µl	184 µl	200 µl
32 µl	168 µl	200 µl

Cuantificación de actividad enzimática β glucuronidasa

Soluciones y reactivos

- Buffer Z
- Lisozima 10 mg/ml
- Tritón al 10%
- 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (PNPG)
- Na_2CO_3

Protocolo

1. Centrifugar 25 ml de cultivo de 24 horas hasta obtener paquete celular.
2. Lavar las células con MgSO_4 10 mM y resuspender en 1 ml.
3. Tomar 20 μl y ponerlo en un tubo nuevo de 1.5 ml con 710 μl de buffer Z.
4. Agregar 10 μl de lisozima e incubar 5 minutos a 37°C.
5. Agregar 10 μl de tritón e incubar 5 minutos a 28°C
6. Agregar 200 μl de PNPG y cronometrar la reacción.
7. Agregar 150 μl de Na_2CO_3 para detener la reacción y, posteriormente, medir absorbancia a 405 nm

Cuantificación de sideróforos

Cuantificación de pioverdina

Soluciones y reactivos

- HCl 5N

Protocolo

1. Preparar un preinóculo de 18 horas de incubación en agitación de 210 rpm a 30°C con la cepa de *A. vinelandii* de interés en 25 ml de medio BS líquido sin hierro.
2. Tomar 1 ml del preinóculo para realizar un inóculo en 25 ml de medio BS sin hierro nuevo, el cual se incuba durante 24 horas en agitación de 210 rpm a 30°C.
3. Tomar 5 ml y centrifugar.
4. Trasferir sobrenadante a un tubo cónico de 15 ml nuevo.
5. Acidificar el sobrenadante con HCL 5N hasta que el pH sea de 2.
6. Medir absorbancia a 380 nm.

Cuantificación de catecoles

Soluciones y reactivos

- Buffer Acetatos (acetato de sodio 3M, ph 5.2)
- Solución Nitrito-Molibdato 0.1 M
- NaOH 6 N

Protocolo

1. Preparar un preinóculo de 18 horas de incubación en agitación de 210 rpm a 30°C con la cepa de *A. vinelandii* de interés en 25 ml de medio BS líquido sin hierro.
2. Tomar 1 ml del preinóculo para realizar un inóculo en 25 ml de medio BS modificado nuevo, el cual se incuba durante 24 horas en agitación de 210 rpm a 30°C.
3. Tomar 5 ml y centrifugar.
4. Tomar 400 microlitros del sobrenadante

5. Adicionar 200 microlitros de buffer acetatos
6. Adicionar 200 microlitros de solución Nitrito-Molibdato
7. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos
8. Medir absorbancia a 508 nm.

Referencias

- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Baars, O., Zhang, X., Morel, F. M., & Seyedsayamdost, M. R. (2016). The siderophore metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 27-39
- Balao, M. (2009). Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*. Santiago de Compostela: Editorial USC.
- Barrientos M., T. (2017). *Estudio de la expresión de los genes involucrados en la producción de sideróforos en Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Bretl, D. J., Demetriadou, C., & Zahrt, T. C. (2011). Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 566-582.
- Bulen, W.A., & LeComte, J.R. (1962) Isolation and properties of a yellow-green fluorescent peptide from *Azotobacter* medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 9: 523-528.
- Capra, E.J. & Laub, M.T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol.* 66:325–347.
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., Lopez-Pliego L., Castañeda M. & Espin, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 160, 479-87.

- Corbin J.L., Bulen WA. (1969). The isolation and identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2-N,6-N-di-92,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysine formed by iron-deficient *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. 8(3):757–762.
- Cornish, A.S., and Page, W.J. (1995) Production of the triacetate siderophore protochelin by *Azotobacter vinelandii*. *BioMetals* 8: 332-338.
- Cornish, A.S., and Page, W.J. (1998) The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology* 144: 1747-1754.
- Crosa, J. H., & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(2), 223-249.
- Espín, G. (2008). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Frangipani E., Visaggio D., Heeb S., Kaever V., Cámara M., Visca P. and F. Imperi. 2014. The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* Mar;16:676-88.
- Ferreras J.A., Ryu J.S., Di Lello F, Tan D.S., Quadri L.E. (2005) Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Nat Chem Biol.* 1(1):29–32. doi:10.1038/nchembio706
- Gao, R., & Stock A.M. (2009) *Biological insights from structures of two-component proteins*. *Annu Rev Microbiol.* 63:133-54.
- Goodier R. I., and B. M. Ahmer. (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 183:2249-58.
- Heeb ,S., & Haas, D. (2001) Review: Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:1351-1363.
- Heeb, S., Valverde, C., Gigot-Bonnefoy, C., & Haas, D. (2005). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism

and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS microbiology letters*, 243(1), 251–258.

- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 8), 1953–1963.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 76(1), 46–65.
- Kay, E., Humair, B., Déneraud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., & Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(16), 6026–6033.
- Kulkarni, P. R., Jia, T., Kuehne, S. A., Kerkering, T. M., Morris, E. R., Searle, M. S., Heeb, S., Rao, J. and Kulkarni, R. V. (2014). A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research*, 42, 6811-6825.
- Lamont, I. L., & Martin, L. W. (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 149(4), 833-842.
- Lapouge, K. M. Schubert, F. H. Allain, and D. Haas. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol.* 67: 241-253.
- Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. (1997) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev.* 97(7):2651–2674

- Marvin J. Miller and Francois Malouin. (1993). Microbial iron chelators as drug delivery agents: the rational design and synthesis of siderophore-drug conjugates. *Accounts of Chemical Research*, 26 (5), 241-249
- McRose D.L., Baars O, Morel FMM, Kraepiel AML. (2017) Siderophore production in *Azotobacter vinelandii* in response to Fe-, Mo- and V-limitation. *Environ Microbiol.* 19(9):3595–3605.
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413-451.
- Morales, S.P.I. (2014) . *Generación y caracterización de mutantes rsmA en Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Nagpal, P., Jafri, S., Reddy, M. A., & Das, H. K. (1989). *Multiple chromosomes of Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3133–3138.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem.* 270(45):26723–26726.
- Page, W.J., Collinson, S.K., Demange, P., Dell, A., and Abdallah, M.A. (1991) *Azotobacter vinelandii* strains of disparate origin produce azotobactin siderophores with identical structures. *Biology of Metals* 4: 217-222.
- Page, W. J., Kwon, E., Cornish, A. S. & Tindale, A. E. (2003). The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 211-216.
- Poole, R. K. & Hill, S. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*, Roles of the terminal oxidases. *Bioscience reports*, 17, 303-317.
- Rediers, H., Vanderleyden, J. & DE MOT, R. 2004. *Azotobacter vinelandii*: a Pseudomonas in disguise?. *Microbiology*, 150, 1117-1119.
- Romeo T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29:1321-30

- Roosenberg J.M., Lin YM, Lu Y, Miller MJ. (2000). Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents *Current Medicinal Chemistry* 7: 159-97. PMID 10637361. *Current Medicinal Chemistry*, 7.
- Sah, S., & Singh, R. (2015). Siderophore: Structural And Functional Characterisation—A Comprehensive Review. *Agriculture (Polnohospodárstvo)*, 61(3), 97-114.
- Sevinc, M. y Page, W. J. (1992). Generation of *Azotobacter vinelandii* strains defective in siderophore production and characterization of a strain unable to produce known siderophores. *Microbiology*, 138(3), 587-596.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P., & Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(18), 5130–5140.
- Teplitski, M., Goodier, R. I., & Ahmer, B. M. (2003). Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *Journal of bacteriology*, 185(24), 7257–7265.
- Tindale, A. E., Mehrotra, M., Ottem, D., & Page, W. J. (2000). Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology*, 146(7), 1617-1626.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current opinion in microbiology*, 41, 15–20.
- Vela, G. R. (1974). Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Applied Microbiology*, 28, 77-79.
- Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W. & Murata, K. (2011). *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol

siderophores produced in response to molybdenum. *J Appl Microbiol*, 111, 932-8.