



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**Estudio del pequeño RNA regulador RgsA de
*Azotobacter vinelandii***

TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA:

Q.F.B. Jesús Manuel Huerta Campos

ASESOR DE TESIS:

D.C. Miguel Castañeda Lucio

Puebla, Pue.

Marzo 2015

INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Características de <i>Azotobacter vinelandii</i>	2
1.2 Ciclo de vida <i>A. vinelandii</i>	2
1.3 Alginato	3
1.4 PHB poli- β -hidroxibutirato	5
1.5 Alquilresorcinoles (AR's)	6
1.6 Regulación de la producción de biopolímeros en <i>Azotobacter vinelandii</i>	7
1.6.1 Sistema de transducción de señales de doble componente GacS/GacA	7
1.6.2 Sistema de regulación pos-transcripcional Csr/Rsm	8
1.6.3 Cascada de regulación GacS/A-RsmA/Z	9
1.7 Pequeños RNAs no codificantes (ncRNAs) en bacterias	10
2. ANTECEDENTES	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPOTESIS	15
5. OBJETIVOS	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
7. RESULTADOS	26
7.1 Generación de la mutante <i>A. vinelandii</i> UW136rgsA	26
7.2 Generación de la mutante <i>A. vinelandii</i> AEIVrgsA	27
7.3 Complementación genética de las mutantes <i>A. vinelandii</i> UW136rgsA y AEIVrgsA	27
7.4 Determinación de Alginato, PHB y AR's en las mutantes rgsA	29
7.5 Resistencia a estrés oxidativo	32
7.6 Resistencia a estrés por calor	33
7.7 Formación de <i>biofilm</i>	35
7.8 Regulación de RpoS y GacA sobre rgsA	36
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	43
10. PERSPECTIVAS	43
11. BIBLIOGRAFIA	44

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria gramnegativa que pertenece al grupo de las gammaproteobacterias, fija nitrógeno, es móvil por flagelos peritricos, aerobia, poliploide, es capaz de adaptar su metabolismo a diversas fuentes de nutrientes. La bacteria presenta un proceso de diferenciación para formar quistes que son resistentes a la desecación. Es de interés biotecnológico ya que produce dos polímeros de uso industrial el alginato y el poliéster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB), así como los lípidos fenólicos alquilresorcinoles (AR's). La producción de estos metabolitos la controla el sistema de doble componente GacS/GacA que a su vez actúa sobre el sistema de regulación post-transcripcional Rsm, este sistema lo integran una proteína de unión a RNA llamada RsmA y RNAs pequeños no codificantes (ncRNAs) que regulan positivamente la producción de los polímeros. En esta bacteria se han descrito siete ncRNAs de la familia RsmZ y uno de la familia RsmY. Buscando ncRNAs de este tipo, se encontró en el genoma de *A. vinelandii* un homólogo a RgsA de *Pseudomonas*. RgsA es un ncRNA descrito originalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, este ncRNA está regulado indirectamente por GacA y directamente por RpoS. Su función se relacionó con la resistencia a estrés oxidativo. La secuencia del homólogo de *rgsA* en *A. vinelandii*, presenta la caja -10 y -35 correspondiente a un promotor RpoS. Mediante ensayos tipo *Northern Blot* confirmamos que RpoS regula a *rgsA* y que GacA lo controla indirectamente ya que no hay secuencia de reconocimiento para este regulador en la región reguladora de RgsA. Se generaron mutantes *rgsA* en las cepas UW136 (no productora de alginato) y AEIV (productora de alginato). Estas mutantes se complementaron, se midió la producción de alginato, PHB y AR's y no mostraron alteración alguna. También se realizaron ensayos de estrés por exposición a peróxido de hidrógeno, donde las mutantes AEIV*rgsA* y UW136*rgsA* se mostraron más sensibles con respecto a la silvestre y las cepas complementadas. En ensayos de estrés por calor la mutantes UW136*rgsA* mostró una mayor resistencia que la cepa UW136. Por último, se observó un aumento de formación de *biofilm* en las mutantes AEIV*rgsA*. En resumen, en este trabajo se demostró que RgsA está regulado por RpoS y GacA y que participa en la respuesta a estrés oxidativo y calórico, así como la formación de *biofilm*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria gramnegativa de vida libre fijadora de nitrógeno perteneciente al grupo de las gammaproteobacterias. Se mueven por flagelos peritricos, son aerobias, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Algunas cepas producen pigmentos solubles o insolubles en agua. Tiene un tamaño relativamente grande (2 x 5 nm), es una bacteria poliploide, es decir posee varias copias de su cromosoma, se calcula que pueden tener hasta 80 copias (Sadoff, 1975; Bergey *et al.*, 2001).

A. vinelandii es capaz de utilizar diversas fuentes de nutrientes. Si no hay ninguna fuente de carbono, la bacteria se someterá a un proceso de diferenciación para formar quistes que son resistentes a la desecación y a diversos productos químicos (Sadoff, 1975). Produce dos polímeros de uso industrial, el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB), así como alquilresorcinoles (AR's).

1.2 Ciclo de vida de *A. vinelandii*

En su ciclo de vida presenta una fase vegetativa y otra con la capacidad de formar quistes. La fase vegetativa presenta flagelos peritricos los cuales se desprenden al entrar al enquistamiento. En la generación de los quistes utiliza PHB y alginato.

La diferenciación celular se inicia cuando la bacteria pierde sus flagelos y se vuelve inmóvil, posteriormente se da una división celular donde se generan dos células esféricas de tamaño menor las cuales están cubiertas por dos capas, una de intina y otra de exina, constituidas principalmente de alginato (Lin & Sadoff, 1969). Los fosfolípidos de la membrana se reemplazan por los alquilresorcinoles en el proceso de enquistamiento, estos AR's son lípidos fenólicos que también forman parte de la exina. Terminado este proceso, se forman quistes maduros, constituidos por un cuerpo basal, que en su interior acumula gránulos de PHB. Cuando el quiste encuentra condiciones metabólicas favorables, inicia la germinación con un aumento del tamaño del cuerpo basal y la ruptura de la exina,

emergiendo dos células que recuperan la movilidad (Sadoff, 1975). Adicionalmente a la fase de enquistamiento, en la fase vegetativa también se produce alginato (Clementi, 1998).

1.3 Alginato

Los alginatos son una familia de heteropolímeros, compuestos por monómeros de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M) unidos por enlaces $\beta(1-4)$, cuyo contenido y distribución es variable, encontrándose cadenas con secuencias alternas (-M-G-M-G-M), o bloques de monómeros alternados (-M-M-M-G-G-G-M-M-M) con número irregular de monómeros en los bloques (Haug *et al.*, 1971). La variabilidad de la distribución y contenido de ácido gulurónico y manurónico permite tener alginatos con diferente capacidad de gelificación, así, contenidos altos de ácido gulurónico generarán geles rígidos y resistentes, y un bajo contenido de éste, hará que los geles se presenten suaves y elásticos (Clementi, 1998).

Los alginatos son utilizados principalmente como aditivos para gelificar, emulsionar, estabilizar o viscosificar soluciones acuosas, en la inmovilización de células y enzimas. En la actualidad los alginatos utilizados son extraídos de algas marinas de los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum* (Rehm & Valla, 1997). La composición de los alginatos algales está sujeta a las variaciones del medio ambiente y a la edad de las algas de donde son extraídos. Por lo cual la calidad de estos alginatos es también muy variable. Es por esta razón que la producción de alginatos de origen bacteriano con calidad uniforme representa una alternativa interesante (Galindo *et al.*, 2007).

El alginato es sintetizado a partir de fructosa 6-P, la cual es isomerizada por la enzima fosfomanosa isomerasa/guanosina difosfomanosa pirofosforilasa (PMI-GMP o AlgA), con el fin de producir manosa 6-P, la cual es convertida por la fosfomanomutasa (PMM o AlgC) en manosa 1-P. PMI-GMP o AlgA, cataliza la conversión de manosa 1-P para producir GDP-manosa, la GDP manosa es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) a ácido GDP-manurónico. La polimerización del ácido GDP-manurónico es llevada a cabo por la proteína Alg8, una manuronato polimerasa. La molécula polimanurónica resultante es entonces modificada por un complejo de acetilasa que incluye a las proteínas AlgI, AlgV y AlgF, y algunos de los residuos manuronatos no

acetilados son epimerizados a guluronato por una manuronatoepimerasa (ME o AlgG) y entonces, el alginato es exportado a través de la membrana externa vía una proteína formadora de poro, AlgJ (Haug & Larsen, 1971) (Fig. 1).

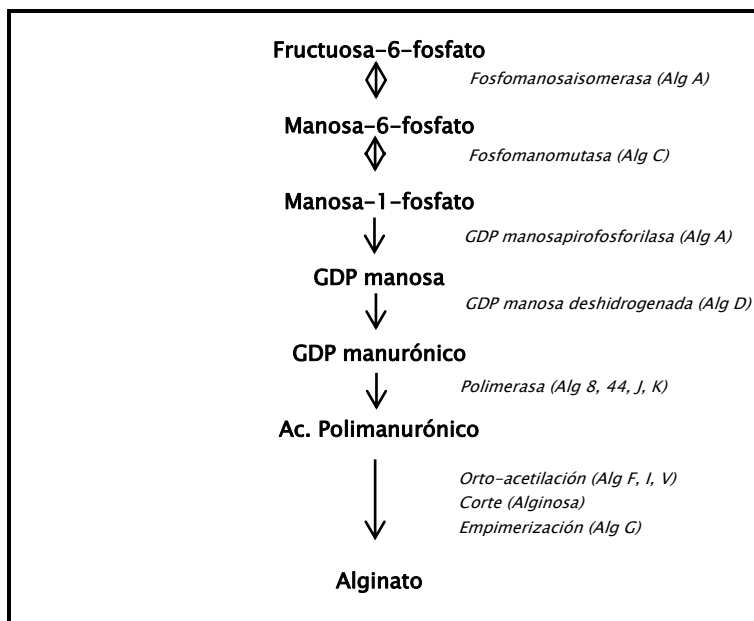


Fig. 1. Ruta biosintética para la producción de alginato

Se ha reportado que el grupo de genes de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* está organizado en tres operones, en uno está codificado *algD*, gen de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, que desempeña un papel clave en la biosíntesis del alginato (Lloret *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 1999). El gen *algD* se transcribe a partir de tres promotores, uno de ellos (P1) es dependiente de σ^S , el segundo promotor (P2) dependiente de σ^E y un tercer promotor (P3) que aún no se conoce (Castañeda *et al.*, 2001).

El operón *algU mucABCD* fue caracterizado en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* y en ambos casos sus productos controlan la producción de alginato. Así, *algU* codifica para el factor σ^E (Martínez-Salazar *et al.*, 1996). Los genes *mucA* y *mucB* codifican para factores anti-sigma que regulan negativamente la actividad de σ^E . Se sabe que AlgU (σ^E) también está involucrado en el proceso de enquistamiento de *A. vinelandii*, independientemente de su papel en la síntesis de alginato (Moreno *et al.*, 1998). AlgR, un regulador transcripcional juega un papel importante en la síntesis del alginato en *Pseudomonas*, ya que mutantes en

el mismo muestran producción nula del polímero. Sin embargo, en *A. vinelandii* su papel no es tan trascendente, ya que en sus mutantes no se abate la síntesis del alginato (Nuñez *et al.*, 1999).

1.4 PHB poli- β -hídrosibutirato

El polihidrosibutirato (PHB) es un polímero compuesto por monómeros de β -hidrosibutirato que forma parte de la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs), los cuales son poliésteres formados por unidades de 3-hidroxiácidos y son producidos por más de 90 géneros bacterianos entre los que se encuentra *Azotobacter* (Anderson & Dawes, 1990). Son de interés biotecnológico, ya que constituyen un grupo complejo de elastómeros y termoplásticos naturales, tienen la ventaja de ser biodegradables, representando una alternativa para la producción de plásticos no contaminantes (Dawes, 1990).

El PHB sirve como material de reserva de la fuente de carbono y energía que puede ser utilizado en períodos de limitación de nutrientes, ya que este polímero almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula (Lafferty, 1990). Otra función está relacionada con la fijación biológica de nitrógeno, específicamente con la protección de la nitrogenasa. Se propone que el PHB permite la protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono exógena, al proveer a la célula de una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, permitiendo mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno, contribuyendo así a la protección (Senior *et al.*, 1972). El PHB también juega el papel de regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Por último la síntesis de PHB está involucrada en procesos de diferenciación celular. En *A. vinelandii* está íntimamente relacionado con el proceso de formación de quistes, aunque no es esencial, ya que mutantes no productores del poliéster enquistan de igual forma que la silvestre (Segura *et al.*, 2003).

En *A. vinelandii* están presentes tres actividades enzimáticas que llevan a cabo la biosíntesis de PHB. El primer paso de la vía consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa para generar acetoacetil-CoA, la cual es reducida por una acetoacetil-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidrosibutiril-

CoA que finalmente es polimerizado por la actividad de la PHB sintasa (Manchak & Page, 1994) (Fig. 2).

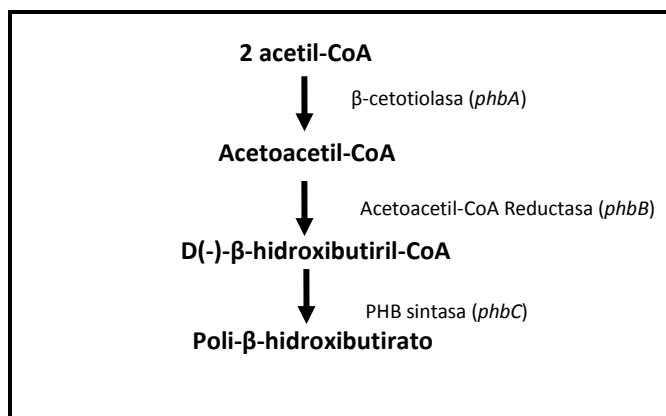


Fig. 2. Ruta biosintética para la producción de PHB

En *A. vinelandii* *phbA*, *phbB* y *phbC*, los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis del PHB, se encuentran agrupados en el operón *phbBAC*. Este operón es transcrito a partir de dos promotores superpuestos, pB1 y pB2. PhbR, codificado por *phbR*, activa la transcripción del operón biosintético de PHB a partir del promotor pB1, mientras que la transcripción de pB2 es dependiente del factor σ^S (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

1.5 Alquiresorcinoles (AR's)

Los alquiresorcinoles (AR's) son lípidos fenólicos homólogos del orcinol que se encuentran en una gran diversidad de organismos, como plantas, algas y hongos, que presentan actividades como antifúngicos, antibacteriales o antiparasitarios (Kozubek & Tyman, 1999). *A. vinelandii* produce AR's de cadena larga en el proceso de diferenciación morfológica en el que se forman quistes resistentes a la desecación. Los AR's reemplazan a los fosfolípidos de las membranas de células vegetativas llegando a constituir el 95% de los lípidos en las membranas del quiste y son un componente estructural de la cápsula del quiste. Se ha sugerido que son importantes para la resistencia a la desecación. Los AR's más abundantes en *A. vinelandii* son los 5-n-heneicosilresorcinol y 5-n-tricosilresorcinol (AR1) y sus derivados galactosidados (AR2). También se ha demostrado que son componentes de la cápsula, encontrándose en la exina y en menor cantidad en la intina.

Estudios previos demuestran que mutantes de los AR's son incapaces de formar cápsula bien estructurada y los quistes se aglutinan de manera que forman agregados por uniones entre capsulas (Segura *et al.*, 2003); por otro lado, mutantes de los lípidos fenólicos aun enquistan y pueden resistir a la desecación (Segura *et al.*, 2009).

En la ruta de biosíntesis de los AR's en *A. vinelandii*, participan las proteínas llamadas ArsA, ArsB, ArsC, y ArsD. ArsA que cataliza la síntesis de una molécula de 22 carbonos, el n-behenil-CoA, a partir de un acetil-CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA; el n-behenil-CoA es utilizado como sustrato por ArsB para sintetizar los 5-n-henicosilresorcinoles por condensación aldólica entre C2 y C7. El n-behenil-CoA también es sustrato de ArsC para la formación de 6-n-alkuilpironas. La enzima ArsD catalizaría la modificación post-traducciona del dominio ACP (Proteína Acarreadora de Acilos) de la proteína ArsA, uniendo covalentemente a la 4-fosfopanteteína proveniente de coenzima A para hacer funcional a ArsA para aceptar sustratos (Nobutaka *et al.*, 2006).

1.6 Regulación de la producción de biopolímeros en *Azotobacter vinelandii*

En *A. vinelandii* el sistema de transducción de señales de doble componente GacS/A es un regulador positivo de la producción de los polímeros alginato, PHB y AR's. El doble componente activa genes del sistema post-transcripcional Rsm, desencadenando una cascada de regulación global para llevar a cabo la síntesis de estos metabolitos.

1.6.1 Sistema de transducción de señales de doble componente GacS/GacA

Muchas especies de bacterias responden a señales o cambios de su medio ambiente por la activación de la transcripción de genes cuyos productos ayudan a la bacteria a contener con el medio ambiente. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes constituyen el principal mecanismo mediante el cual las bacterias responden a estos cambios. Estos sistemas están formados por dos proteínas: una que detecta las señales del medio ambiente, y la segunda que en la mayoría de los casos es un regulador transcripcional, cuya actividad es controlada por la primera (Stock *et al.*, 1995).

Un ejemplo de este tipo de sistemas empleado por bacterias gram-negativas es el sistema de doble componente GacS/A; que actúa como regulador del metabolismo secundario, controlando diversos fenotipos, producción de enzimas involucradas en la patogenicidad de planta y animales, entre otros (Heeb & Haas, 2001).

GacS es una proteína detectora transmembranal perteneciente a la familia de cinasas-histidínicas, se autofosforila y fosforila a GacA, que es el regulador de respuesta citoplasmático (GacA) que activa la transcripción de su gen blanco. En *A. vinelandii*, GacA activa la transcripción del gen *rsmZ*. También se ha demostrado que controla otros sistemas de regulación global como el factor sigma alternativo σ^s o σ^{38} y el sistema de Quórum sensing (Castañeda *et al.*, 2001; Lapouge *et al.*, 2008).

1.6.2 Sistema de regulación pos-transcripcional Csr/Rsm

Este sistema regulador del metabolismo que está presente en varias especies bacterianas, por ejemplo: en *Escherichia coli*, donde el sistema Csr (carbon storage regulator) controla el metabolismo primario del carbono (Romeo, 1998), en *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*, donde controla la virulencia (Lenz *et al.*, 2005; Fortune *et al.*, 2006).

Un homólogo al sistema Csr es el que presenta *E. carotovora* y otra especie del género *Pseudomonas*, y se denomina sistema Rsm (repressor of stationary phase metabolism) porque es considerado como un regulador global del metabolismo secundario (Lapouge *et al.*, 2008). En algunas γ -Proteobacterias el sistema de transducción de señales GacS/A controla los sistemas de regulación post-transcripcional como los Csr/Rsm (Liu *et al.*, 1997; Guadapaty *et al.*, 2001).

CsrA (RsmA) es una proteína de aproximadamente 7 kD que presenta dominios de unión a ARN y en particular a CsrB (RsmZ-Y), un pequeño RNA regulador no codificante (ncRNAs) cuya secuencia nucleotídica no está conservada entre sus ortólogos, posee estructura de tallo y asa, presentando un elemento conservado GGA (Romeo, 1998; Lapouge *et al.*, 2008).

La regulación post-transcripcional por el sistema anteriormente descrito se lleva de la siguiente manera: la proteína CsrA (RsmA) se une a una región cercana y superpuesta al sitio de unión al ribosoma (RBS) de los RNA mensajeros (RNAm) que son sus blancos de regulación, por lo tanto, se impide su traducción y posteriormente son degradados. La función del segundo componente CsrB (RsmZ-Y) el pequeño RNA regulador, consiste en captar a la proteína antes de que se una al ribosoma, mediante los sitios de unión que presenta en la estructura de asa, actuando como un antagonista para contrarrestar los efectos de CsrA (RsmA), por lo tanto se lleva a cabo la traducción del RNAm (Romeo, 1998).

1.6.3 Cascada de regulación GacS/A-RsmA/Z

En *A. vinelandii* el sistema GacS/A es un regulador positivo de la transcripción del gen *rpoS*, que codifica para el factor σ^s y que controla la síntesis de alginatos, ya que regula igualmente la transcripción de *algD*, el gen encargado de codificar para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa que participa en la producción del polímero. Este gen presenta una región reguladora compleja formada por tres promotores: P1 dependiente de σ^E , P2 dependiente de σ^s y el tercero aún desconocido. GacS/A controla la expresión del gen *algD* a nivel transcripcional controlando los niveles del factor σ^s y éste a su vez regula al promotor P2. GacS/A también controla la expresión del gen *algD* a nivel post-transcripcional, controlando la expresión de los ncRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2*, los cuales contrarrestan y antagonizan el efecto inhibitorio que la proteína RsmA ejerce sobre la traducción del mRNA *algD*, por lo tanto, en presencia se lleva a cabo la síntesis de la proteína AlgD y por ende la síntesis del alginato (Castañeda *et al.*, 2001; Manzo *et al.*, 2011).

El sistema de regulación GacS/A-RsmA/Z también es requerido para la síntesis de PHB, ya que se conoce que mutaciones en GacA afectan la expresión del gen *phbR*, PhbR es un regulador transcripcional que activa la transcripción del operon *phbBAC* que codifica para las enzimas que participan en la síntesis de PHB. Por otro lado, se ha demostrado que cuando RsmA no está presente los RNAm de *phbR* y *phbB* son más estables e incrementan su expresión (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

Poco se sabe la regulación genética de los AR's, pero estudios recientes han mostrado que el sistema GacS/A-RsmA/Z controla al regulador transcripcional *arsR*, que promueve la transcripción de los genes *arsA*, *arsB*, *arsC* y *arsD*. La expresión de *arsA* uno de los genes que codifican para una enzima de la ruta de biosíntesis de AR's, está controlada tanto por el sistema de regulación GacS/A-RsmA/Z y de RpoS (Segura *et al.*, datos no publicados). La regulación genética que ejerce este sistema sobre los diferentes polímeros se representa en la Figura 3.

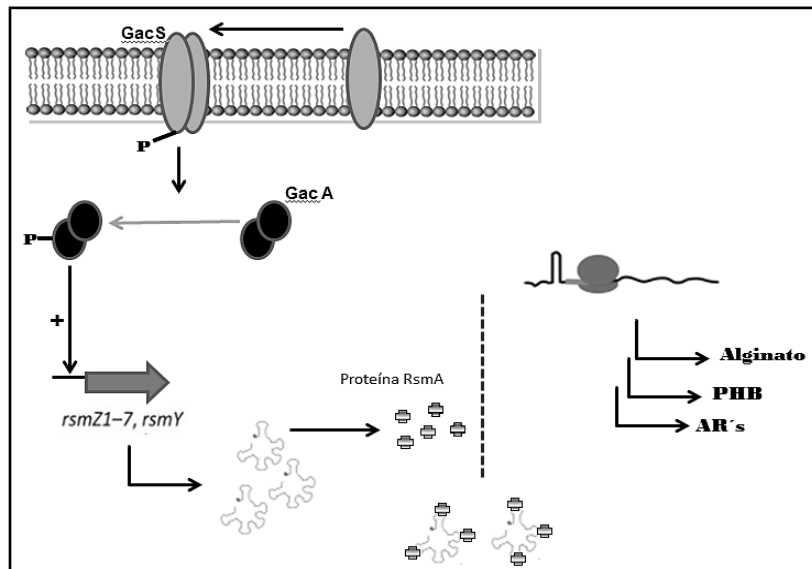


Fig. 3. Cascada de regulación GacS/A-RsmA/Z sobre la producción de Alginato, PHB y AR's

1.7 Pequeños RNAs no codificantes (ncRNAs) en bacterias

Los pequeños RNAs no codificantes se han presentado como moléculas de RNA que no poseen una secuencia traducible y que participan en varios procesos de regulación genética. La mayoría están interfiriendo a nivel post-transcripcional (Vogel & Sharma, 2005). Los más estudiados han sido los de *E. coli* como OxyS que regula estrés, o DsrA, que inhibe la traducción de HN-S pero activa la de RpoS. Estos RNAs se ha visto que aumentan su funcionalidad con ayuda de chaperonas como HFq, una proteína que se ha encontrado interactuando con los pequeños RNAs OxyS y RprA (Henderson *et al.*, 2013).

La función de los ncRNAs es modificar la estructura secundaria de RNA mensajeros específicos directamente, por ejemplo, la región 5' UTR del mensajero *rpoS* adopta una conformación tipo *hairpin* que bloquea el acceso ribosomal a la secuencia Shine-Dalgarno, entonces el ncRNAs DsrA es capaz de interaccionar con la región 5' UTR de *rpoS* liberando la secuencia Shine-Dalgarno, promoviendo así la traducción del mensajero (Fig. 4A); o a través de proteínas, la proteína RsmA se une a la secuencia Shine-Dalgarno del mensajero *hcnA* impidiendo la unión del ribosoma y el ncRNAs RsmB secuestra al inhibidor RsmA, habilitando la función del ribosoma y permitiendo la traducción (Fig. 4B).

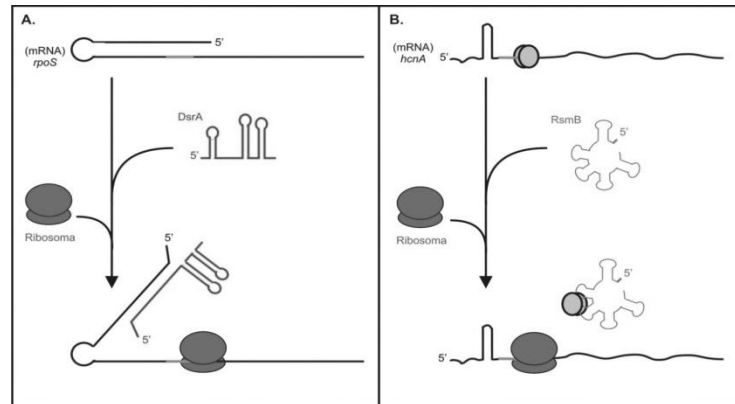


Fig. 4. Mecanismos de acción de los ncRNAs

La bioinformática, la predicción de su estructura secundaria y los diferentes algoritmos que existen para buscar secuencias de RNAs, han servido para descubrir más RNAs pequeños que a pesar de ser de corta longitud tienen una participación en regulación que no debe ser subestimada, ya que su funcionalidad es igual que la de una proteína (Hüttenhofer *et al.*, 2002). En *A. vinelandii* se han descubierto ocho ncRNAs de la familia Rsm: siete RsmZ y uno RsmY, y la investigación supone la presencia de más RNA reguladores, de los cuales es importante conocer su función y participación para entender mejor la regulación genética que ejercen.

2. ANTECEDENTES

En un análisis bioinformático del genoma de *P. aeruginosa* se buscaba la presencia de ncRNAs (pequeños RNA no codificantes), enfocándose en regiones intergénicas con longitud mayor de 50 pb. Se encontró un ncRNAs al que se le llamó RgsA (**R**egulated by **G**acA and **S**tress). Posteriormente se encontró que *rgsA* está presente con al menos un 65% de identidad en cinco cepas diferentes de *Pseudomonas* sp (González *et al.*, 2008).

El análisis del gen *rgsA* reveló que está bajo la regulación positiva de GacA y de RpoS en fase estacionaria. La determinación de su estructura secundaria mediante el programa MFold mostró un único motivo de unión a RsmA. Estos datos llevaron a hipotetizar que RgsA participaba en la regulación post-transcripcional de genes controlados por el sistema Gac-Rsm. Sin embargo, la sobreexpresión de *rgsA* no fue capaz de revertir los efectos de la mutación en *gacA*, como lo hacen los RNAs de la familia Rsm. Por esto se sugirió que RgsA es incapaz de secuestrar proteínas del tipo RsmA debido a que sólo posee un motivo de unión a esta proteína. Aun así, la mutante en *rgsA* mostró una reducida habilidad para sobrevivir al estrés por H₂O₂, evidenciando que dicho RNAs tiene un papel aún no determinado (González *et al.*, 2008).

Por la cercanía filogenética entre *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*, se buscaron homólogos de *rgsA* en el genoma de *A. vinelandii* AEIV, hallando una secuencia de 121 nucleótidos con identidad del 68%. El alineamiento de las secuencias de *rgsA* en diferentes miembros de la familia Pseudomonadaceae (*A. vinelandii* AEIV, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* CHA0, *P. putida* KT2440 y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000) mediante ClustalW, reveló una clara conservación de una secuencia regulatoria ubicada río arriba (URS, Upstream Regulatory Sequence). Así se detectó el terminador rho-independiente, y de las cajas -35 y -10 correspondientes a elementos promotores RpoS, a partir de los cuales se determinó el posible +1 del inicio de la transcripción. Al no observarse secuencia consenso de reconocimiento para GacA, probablemente la regulación observada por González y colaboradores, es indirecta (Fig. 5).

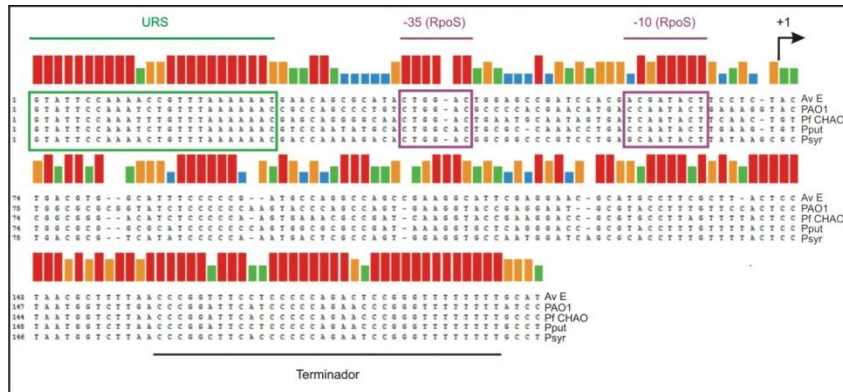


Fig. 5. Alineamientos de la secuencia de *rgsA* en miembros de la familia Pseudomonadaceae

Además, al predecir la estructura del transcrito de *rgsA* en *A. vinelandii* utilizando MFold se observa que, de manera similar a su homólogo en *P. aeruginosa*, RgsA presenta una estructura secundaria con múltiples tallos y asas, pero sólo un sitio de pegado a RsmA (ANGGA) (Fig. 6).

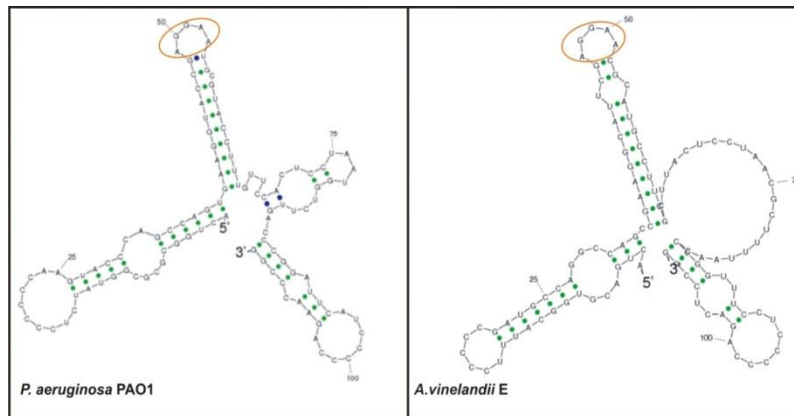


Fig. 6. Comparación de la estructura secundaria del transcrito RgsA en *P. aeruginosa* PAO1 y *A. vinelandii* AEIV

El análisis de la región reguladora de *rgsA* en *A. vinelandii* utilizando la herramienta MEME revela la secuencia de unión a RpoS (E-value = 0.192148), lo cual sugiere que la expresión de este ncRNAs está controlada por dicho factor sigma, por lo tanto, cabe esperar que su nivel máximo de expresión se de en fase estacionaria (Aguilar, 2011).

En cuanto al modelo Gac-Rsm, ya que los reportes señalan que el homodímero RsmA parece requerir de la interacción simultánea con dos asas con motivo ANGGA,

RgsA podría participar en el mecanismo de regulación en forma de dos copias del ncRNAs interaccionando con un homodímero de RsmA, contrarrestando la represión de los mRNA controlados por este sistema. Sin embargo, por la ausencia de la secuencia de unión a GacA en la región promotora de *rgsA* no es de esperar que este regulador controle directamente al ncRNAs, lo cual sugiere una vía alternativa a GacA, ofreciendo un nivel más de regulación para el sistema Rsm (Aguilar, 2011).

Un estudio de RgsA (P16) en *P. syringae* pv. *tomato* cepa DC3000 demostró que su expresión está regulada directamente por RpoS y que juega un papel en la protección de las bacterias al estrés oxidativo y en la tolerancia de estrés por calor. De igual manera, se observó que RgsA no participa en la virulencia y que probablemente interacciona con la chaperona Hfq, que en *E. coli* está regulada por CsrA (Park *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Azotobacter vinelandii es una bacteria que presenta ncRNAs (RsmZ 1-7, RsmY) que participan en la regulación para la producción de diversos metabolitos, se descubrió un homólogo a RgsA, otro ncRNAs descrito en las especies de *Pseudomonas*. En este trabajo pretendemos conocer la función y regulación de RgsA que aún no están descritas en *A. vinelandii*.

4. HIPÓTESIS

RgsA participa en la cascada de regulación iniciada por GacS/A y su expresión depende de los reguladores transcripcionales RpoS y GacA.

5. OBJETIVOS

5.1 General

5.1.1 Estudiar el ncRNAs RgsA de *Azotobacter vinelandii*

5.2 Específicos

5.2.1 Obtener mutantes en *rgsA* de *Azotobacter vinelandii* cepas UW136 y AEIV

5.2.2 Complementar las mutantes generadas

5.2.3 Cuantificar la producción de alginato, PHB y AR's en las cepas mutantes y complementadas

5.2.4 Medir la resistencia a estrés oxidativo y calórico de las mutantes

5.2.5 Cuantificar la formación de *biofilm*

5.2.6 Confirmar el efecto regulador positivo de RpoS y GacA sobre la expresión de *rgsA*

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas

Cepa	Características	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
UW 136	Cepa tipo derivada de la UW (OP), <i>algU</i> , Nal ^r , Rif ^r	Bishop & Brill (1977)
UW 136 <i>rgsA</i>	Cepa derivada de UW 136 deficiente en <i>rgsA</i> , Gm ^r	Este trabajo
UW 136 <i>rgsA</i> ^{-/+}	Cepa complementada de la mutante en <i>rgsA</i> . Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
UW 136 <i>gacA</i>	Cepa derivada de UW 136 deficiente en <i>gacA</i> , Gm ^r	Colección de cepas
UW 136 <i>rpoS</i>	Cepa derivada de UW 136 deficiente en <i>rpoS</i> , Spe ^r	Colección de cepas
AEIV	Cepa tipo, Nal ^r	Larsen & Haugh (1971)
AEIV <i>rgsA</i>	Cepa derivada de AEIV deficiente en <i>rgsA</i> , Gm ^r	Este trabajo
AEIV <i>rgsA</i> ^{-/+}	Cepa complementada de la mutante en <i>rgsA</i> . Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
AEIV <i>gacA</i>	Cepa derivada de AEIV deficiente en <i>gacA</i> , Gm ^r	Castañeda (2000)
AEIV <i>rpoS</i>	Cepa derivada de AEIV deficiente en <i>rpoS</i> , Spe ^r	Cocotl-Yañez (2014)
<i>E. coli</i> DH5 \square	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> .	Gibco BRL

6.2 Plásmidos

Plásmidos	Características	Referencia
pGEM T Easy vector	Vector de clonación, lacZ, Amp ^r	Promega
pGem <i>rgsA</i> ::Gm	Vector derivado de p <i>GrgsA</i> 1.4 kb deletada la región de <i>rgsA</i> , Gm ^r	Aguilar (2011)
p <i>GrgsA</i> 1.4kb	Vector derivado de pGemTeasy que contiene un fragmento de 1.4 kb que incluye a <i>rgsA</i>	Aguilar (2011)
pGI <i>rgsA</i>	Vector derivado del pGemTeasy que contiene la región promotora y estructural de <i>rgsA</i>	Este trabajo
pUMATc	Vector derivado del pUMA, Tc ^r	Cocotl-Yañez (2014)
pUMATc <i>rgsA</i>	Vector derivado del pUMA Tc y de pGI <i>rgsA</i> que contiene a <i>rgsA</i> , Tc ^r	Este trabajo
pUMATc <i>gusA</i> T	Vector que contiene al gen reportero <i>gusA</i> , utilizado para fusiones transcripcionales, Tc ^r	Cocotl-Yañez (2014)
pUMATc <i>gusA</i> T <i>rgsA</i>	Vector derivado del pUMATc <i>gusA</i> T que contiene la región promotora de <i>rgsA</i> , Tc ^r	Este trabajo

6.3 Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Longitud (pb)
DsonrgsA	ACTGACGTGGCATTTC	18
RsonrgsA	TCGCCCCTGATACTTC	18
DcomrgsA	GTTGCAGCGCCAGCGACTTATG	22
RcomrgsA	CGAGACCGGGCTGGACTATCACTA	24
RinvrgsA	AGAGGAGGTACCGTCGTGGAT	21
RsgAM1F	CGCCGCCTTCGTCACTGT	18
RsgAM1R	CGCGGCGCTGGATCTCGGCTTCTA	24
DUTRrgsA	CTTCCCGCGGCCGCGACGCG	20
RinvrgsAPst	GGGAAGTGCAGCGTCAGTAGAGG	23
TcR	GCTAGCAGCACGCCATAGTGA	21
GusAR	TGTAACGCGCTTTCCCACCAAC	22
M13R	Oligo reverso universal del vector pGEM	

6.4 Medios y condiciones de cultivo

6.4.1 Medio BS (Burk-Sacarosa)

Soluciones stock		Para preparar 1L de medio (ml de solución stock)	
Reactivo	g/L	BS	CM
CaCl ₂	7.3	10	10
Na ₂ SO ₄	18.3	10	10
MgCl ₂	160	1	1
FeSO ₄	5	1	0
NaMoO ₄	0.2	1	0
Buffer Fosfatos	K ₂ HPO ₄	100	100
	KH ₂ PO ₄		
Sacarosa	200	100	100
		H ₂ O: 800	

6.4.2 Medio PY-Sacarosa 2%

Reactivo	g/L
Peptona	5
Levadura	3
Sacarosa	20
H ₂ O	1000 ml

Para medio sólido se añadió 1.5% de agar

A. vinelandii se cultivó a 30°C por 48 h, en medio líquido en agitación 200 rpm. Los cultivos para las cuantificaciones se realizaron con un pre-inóculo de 25 ml de medio (BS,

PY-Sacarosa) se incubaron 24 h a 30°C, se estandarizó el inóculo y se añadió 1 ml a 25 ml de medio (por triplicado), se incubó a 30°C por 48 h.

6.4.3 Medio LB (Luria Bertani):

Para preparar 1 L de medio LB líquido en agua destilada se agregaron:

10 g de peptona de caseína.

5 g de extracto de levadura.

10 g de NaCl.

Para preparar LB sólido, se agregaron 15 g de agar bacteriológico

E. coli se creció a 37°C en agitación 200 rpm por 24 h en medio líquido.

6.5 Extracción de DNA plasmídico por Perclorato

Centrifugamos 3 ml de cultivo, resuspendimos en 175µl de TES (TRIS-EDTA-Sacarosa), agregamos 25µl de lisozima (10mg/ml), se mantuvo 20 min en hielo, agregamos 400 µl de agua helada e incubamos a 73°C/15min, posteriormente dejamos enfriar 15 min en hielo y centrifugamos 15 min a 13,200 rpm. Transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregaron 60 µl de NaClO₄ 5M y 600µl de isopropanol, agitamos en vórtex. Dejamos enfriar 5 min en hielo, centrifugamos 15 min a 13,200rpm. Lavamos la pastilla 2 veces con etanol al 70%, dejamos secar la pastilla y se resuspendió en 30 µl de RNAsa (10mg/ml), incubar 1 hora a 37°C.

6.6 Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Maxiprep):

Se centrifugaron 25 ml de cultivo (tubos Falcon), lavamos con sulfato de magnesio 10 mM y se resuspendió el paquete celular en 1.5 ml de solución 1 fría (glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM; Tris HCl pH 8, 25 mM), incubamos 3 min a temperatura ambiente. Agregamos 3.5 ml de solución 2 recién preparada (NaOH 0.2 N y SDS 1%), mezclando por inversión de 4 a 6 veces, incubamos en hielo 10 minutos. Añadimos solución 3 fría de acetato de potasio pH 4.8 (CH₃COOK, 5 M; CH₃COOH glacial; agua), incubamos 15 min en hielo. Centrifugamos 10 min a 6,000 rpm y el sobrenadante se pasó a otro tubo en el cual se le adicionó un volumen igual de isopropanol, mezclamos y centrifugamos por 5 min a

6,000 rpm. Desechamos el isopropanol y lavamos la pastilla 2-3 veces con etanol al 70%, dejamos secar y agregamos 400 µl de RNAsa (10 mg/ml), incubamos 1 h a 37°C.

6.7 Transformación de *Azotobacter vinelandii* con DNA plasmídico

Tomamos 200 µl de células competentes y agregamos 50 µl de DNA plasmídico (10 µg aproximadamente) en un tubo eppendorf de 1.5 ml, colocamos la mezcla en una placa de agar CM, se extendió un poco con la punta utilizada, incubamos 30°C/ 48 h. Recolectamos el tapete en 1 ml de MgSO₄ 10 mM, lavamos hasta quitar alginato, se plateó en medio BS con antibióticos de selección e incubamos 30°C por 2 ó 4 días.

6.8 Extracción de DNA cromosomal de *A. vinelandii*

Crecimos a *A. vinelandii* en 25 ml en medio BS líquido con antibióticos de selección, incubamos 200 rpm/48 h. Centrifugamos las células, se lavaron con MgSO₄ 10 mM y se resuspendieron las pastillas en 450 µl de Buffer TE (TRIS/EDTA) 50/20, se agitaron en vortex y agregamos 50 µl de lisozima (10 mg/ml), incubamos a 37°C 30 min. Agregamos 50 µl de proteasa (10 mg/ml) e incubamos a 37°C 30 minutos. Agregamos 50 µl de SDS 10% (dodecilsulfato sódico) e incubamos a 37°C 15 min (o hasta observar una solución turbia y viscosa). Se agregaron 100 µl de NaCl 5 M mezclar e incubamos a 65°C/10 min. Adicionamos 80 µl de solución CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio)/NaCl 0.7 M (previamente incubada a 65°C) e incubamos a 65°C de 15 a 20 min; posteriormente se extrajo una vez con un volumen (600µl) de solución Cloroformo-Alcohol Isoamilico 24:1, llevamos al vortex y centrifugamos 5 min. Recuperamos el sobrenadante y pasamos a un tubo eppendorf nuevo. Agregamos 10 µl de silica y centrifugamos 1 minuto, lavamos 3 veces con New Wash y dejamos secar la pastilla, ya seca se agregaron de 30-50 µl de RNAsa diluida, incubamos 1 h después centrifugamos y con cuidado pasamos el sobrenadante a un tubo nuevo.

6.9 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Mezcla de reacción utilizada:

Reactivo	Volumen final 50 μ l	Volumen final 25 μ l
H ₂ O	33.8 μ l	16.3 μ l
dNTP's	8.0 μ l	4.0 μ l
Buffer 10x	5.0 μ l	2.5 μ l
DNA molde	1.0 μ l	1.0 μ l
Oligo delantero	1.0 μ l	0.5 μ l
Oligo reverso	1.0 μ l	0.5 μ l
Dream Taq polimerasa	0.2 μ l	0.2 μ l

Condiciones:

Pasos	Temperatura °C	Tiempo minutos	
1	95	5	5
2	95	1	1
3	61	1	1
4	72	2.5	1
Repetir pasos 1-4 por 30 ciclos			
5	72	10	10
Fragmento		2100 pb	100 a 1000 pb

6.10 Electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989)

Para verificar la integridad o bien la concentración de DNA, se analizó la muestra de DNA en un gel de agarosa al 1% y se comparó visualmente contra un estándar de DNA de concentración conocida. El corrimiento electroforético se llevó a cabo en un amortiguador Tris-acetatos- EDTA (TAE: Tris pH 8, 90 mM; ácido acético, 90 mM; EDTA, 2 mM). Después de la tinción del gel en bromuro de etidio se visualiza en un transiluminador de rayos UV.

6.11 Purificación de bandas de DNA a partir de gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de la muestra a purificar. Visualizamos el gel en el transiluminador y con una navaja se cortó el fragmento de agarosa que contiene la banda de DNA que se va a purificar, el fragmento se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, agregamos 3 volúmenes de NaI 6 M y calentamos 5 min a 55°C o hasta que se funda la

agarosa. Agregamos 10 µl de silica y mezclar por inversión, calentamos 5 min a 55°C. Centrifugamos a máxima velocidad 30 s, decantamos el sobrenadante y lavamos la pastilla tres veces con la solución New Wash. Dejamos secar la pastilla y se resuspendió en agua estéril. Centrifugamos nuevamente por 2 min y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo.

6.12 Reacción de ligación con T4 DNA ligasa

Se llevó a cabo una reacción con un volumen final de 10 µl: 5 µl de Buffer de T4 DNA ligasa, 3 µl del producto de PCR (precipitado con glucógeno) 1 µl del vector Pgem-T Easy y 1 µl de enzima T4 ligasa. Dejar incubar la reacción toda la noche a -4 °C.

6.13 Precipitación con glucógeno

El producto de la ligación se sometió a precipitación con glucógeno para eliminar las sales que pudieran interferir en el proceso de electroporación. Se le agregó un volumen de 500 µl de isopropanol más 1 µl de glucógeno (Roche), se mezcló por inversión y reposar 15 min a -70 °C. Se centrifugó la mezcla por 10 min a 12000 rpm, y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se lavó la pastilla de DNA 3 veces con etanol al 70%. Dejamos secar la pastilla y finalmente resuspendimos en 10 µl de agua PISA estéril.

6.14 Transformación por electroporación

Las celdas de electroporación deben estar previamente esterilizadas. Se mezclaron las células electrocompetentes y la ligación, posteriormente se les dio a un pulso eléctrico (programa Ec2 del electroporador, 2.5 kV, 5 msec). Inmediatamente se le agregó 1 ml de medio Sock a la celda. Después de 1 h de incubación a 37 °C/200 rpm se inocularon 200 µl en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente. El producto de la ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α.

6.15 Cuantificación de alginato por el método de Carbazol

La producción del polisacárido se midió de acuerdo a lo reportado por Blumenkrantz *et al.*, 1973, bajar 10 ml de cada cultivo y recolectar el sobrenadante, lavar las células con EDTA 0.01 M y volver a recolectar el sobrenadante, guardar las células para cuantificar la proteína; el sobrenadante se precipita con dos volúmenes de isopropanol (se

observa un precipitado blanco), centrifugamos y dejamos secar toda la noche el precipitado formado, posteriormente se resuspende en agua PISA. En tubos de ensayo sumergidos en hielo agregamos 3 ml de solución ácido sulfúrico-boratos, agregamos 350 μ l de la solución problema de alginato, corremos paralelamente la curva estándar de alginato con concentraciones conocidas, añadir 100 μ l de carbazol al 0.1% y dar vórtex cuidadosamente, incubar en baño de agua a 55°C por 30 minutos desarrollando un color violeta, se dejan atemperar y se miden las absorbancias a 530 nm.

6.16 Cuantificación de la producción de PHB

La cuantificación de PHB se realizó por el método de Law & Slepecky 1961. Se parte de un cultivo de 25 ml en LB líquido, se toma 1ml de cultivo, centrifugar y lavar con $MgSO_4$ 10 mM se adiciona 1 ml de hipoclorito de sodio al 30% para separar el polímero, se incuba 1 h a 30 C/200 rpm, centrifugar y decantar, lavar con 1 ml de agua centrifugar y decantar, lavar con 1 ml de Etanol al 100% centrifugar y decantar, por último lavar con acetona centrifugar, decantar y dejar secar. Para convertir el polímero a ácido crotónico se disuelve el paquete celular con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, se pasa a un tubo de vidrio y se adiciona 1 ml ácido sulfúrico concentrado, incubar a 95 °C durante 10 min y se cuantifica espectrofotométricamente a 235 nm.

6.17 Determinación de AR's

Las células se crecieron en placas de agar Burk-butanol para inducir la síntesis de los AR's, se dejaron incubar por 5 días a 30 °C, posteriormente se les agregó el colorante Flast Blue B para revelar la presencia de los lípidos fenólicos, tiñéndose de marrón las que los producen, todo se llevó a cabo mediante las especificaciones del método reportado por Segura *et al.*, 2003.

6.18 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el Método de Lowry *et al.*, 1951. Se toma 1 ml de cultivo problema se centrifuga y el paquete celular se lava con $MgSO_4$ 10 mM, resuspender en 1 ml de la misma solución, o bien en agua PISA. Tomar 50 μ l (este

volumen varía de acuerdo a la concentración de proteína de la muestra) y añadir 150 µl de MgSO₄ 10 mM o agua PISA, agregar 1 ml de solución reactiva recién preparada (A: Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1 N, B: Tartrato de Na y K 2%, C: CuSO₄ 1%. Mezclar 1 ml de solución C más 1 ml de solución B más 98 ml de solución A); y dejar reposar 10 min. Añadir 100 µl de reactivo de Folin (Sigma) dilución 1:2 en agua. Reposar 30 min (Vf: 1.3 ml). Finalmente leer absorbancia a 625 nm. Simultáneamente se corrió una curva de calibración utilizando un patrón de albumina, con las siguientes concentraciones: 50, 100, 200 y 400 µg/ml.

6.19 Ensayo de estrés oxidativo

Las cepas a evaluar se cultivaron igual que en las cuantificaciones, se tomó 1 ml de cada cultivo y se centrifugó, las células fueron resuspendidas en 3 ml de medio Burk que se le adicionó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 300 mM, como control se resuspendieron células en medio Burk sin peróxido de hidrógeno, todos los tubos fueron incubados a 30°C por 30 min a 200 rpm, posteriormente se realizaron series de diluciones y plateamos por goteo 20 µl las más convenientes, en nuestro caso fueron -5, -6, -7 y -8, en placas de agar BS, incubamos a 30 °C hasta la aparición de colonias cuantificables.

6.20 Ensayo de estrés por calor

De la serie de cultivos de las diferentes cepas se tomó 1 ml y se centrifugó, las células fueron resuspendidas en 3 ml de medio Burk (tubos falcon de 15 ml), se realizaron diluciones de cada muestra antes de ser incubadas y se tomó como el tiempo 0, posteriormente se incubaron a 48 °C y se fueron tomando muestras a los 30, 60 y 120 min de incubación, de cada muestra de los diferentes tiempos se realizaron serie de diluciones, que fueron inoculadas por goteo en placas de agar BS y se incubaron a 30 °C, hasta que se observaran y pudiéramos contar las UFC (unidades formadoras de colonias).

6.21 Cuantificación de la formación de *biofilm*

Se tomó una cepa fresca y se hizo un pre-inóculo de 25 ml de medio BS, se incubó en agitación de 18 a 20 h, se estandarizó el inóculo y se agregaron 200 µl en placas que contiene 2 ml de medio a convenir (BS o PY-Sacarosa), se hicieron dos series de tres

pozos, una serie para determinar la formación de *biofilm* y otra para determinar proteína total, dejar incubar dos días a 30 °C de manera estática, posteriormente decantamos el cultivo de una serie de pozos, colectando la células plactónicas o libres, recuperamos las células adheridas al vidrio lavando con MgSO₄ 10 mM, reunimos los lavados con el sobrenadante, centrifugar y lavar, posteriormente se determinó la cantidad de proteína. Vaciamos por inversión la otra serie de pozos y se lavaron tres veces con PBS 1X, dejamos secar, agregamos 2 ml de metanol a cada pozo y dejamos fijar por 10 min, vaciamos el metanol por inversión y dejamos secar, se tiñó con 3 ml de cristal violeta durante 15 min, vaciamos el cristal violeta (se puede reutilizar) y enjuagamos tres veces la placa con agua, solubilizar el colorante con una solución de ácido acético 33 %, 2 ml en cada pozo y agitando 10 min a 60 rpm, leer la densidad óptica a 565 nm, la formación de *biofilm* se calcula dividiendo las lecturas de DO *biofilm*/mg de proteína.

6.22 Extracción de RNA con fenol caliente

Se cultivó *A. vinelandii* en medio BS por 48 h a 30 °C, se centrifugan las células y se lavan con MgSO₄ 10 mM, resuspender las células en 200 µl de solución 1 helada (sacarosa 0.3 M, acetato de sodio 0.01 M pH 5.2), agregar 200 µl de solución 2 (acetato de sodio 1.1 M pH 5.2, SDS 2%) y mezclar con suavidad por inversión 2 o 3 veces, colocar los tubos en un termoblock a 70 °C por 1 min, agregar 400 µl de fenol caliente (65 °C) y vortexear, dejar a 70 °C otro min y vortexear de nuevo y poner en hielo, centrifugar 10 min a 14,000 rpm en frío, tomar la fase de arriba con mucho cuidado para no contaminarla y pasarla a un tubo nuevo, repetir a partir del fenol caliente. Agregar 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico frío y vortexear, centrifugar 10 min a 14,000 rpm en frío, tomar la fase superior y pasar a un tubo nuevo. Agregar 300 µl de cloroformo frío vortexear y centrifugar 10 min a 14,000 rpm en frío, tomar la fase superior con precaución, para que la muestra no lleve cloroformo, agregar 15 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 600 µl de etanol anhídrido grado biología molecular, Centrifugar 15 min a 14,000 rpm en frío (se puede dejar precipitando toda la noche si se desea obtener una mayor concentración del RNA), quitar todo el etanol del tubo por decantación y luego centrifugar por un pulso y sacar el resto con micro pipeta, se puede dejar secando a temperatura ambiente o a 60°C tres minutos, resuspender en 50 µl de agua DEPC y congelar a -20°C hasta su uso.

6.23 Hibridación tipo Northern blot

Para los ensayos de Northern blot se cargaron 300 μg de RNA por carril. Se realizó la electroforesis en amortiguador MAE 5X (MOPS 8.36 gr., acetato de sodio, 0.82 gr., EDTA, 0.36 gr., pH 7 y agua DEPC 200 ml), el gel que se va a transferir debe estar adicionado con formaldehído. Se lavó 2 veces 30 minutos con SSC 10X, la transferencia a la membrana Hybond se realizó con SSC 10X toda la noche. El RNA se fijó en la membrana con luz UV y se llevó a cabo la hibridación según las instrucciones del fabricante Roche® (*DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*).

7. RESULTADOS

7.1 Generación de la mutante *A. vinelandii* UW136*rgsA*

La principal característica de la cepa de *A. vinelandii* UW136 es que no produce alginato ya que presenta una mutación en el gen *algU*, que codifica para el factor sigma alternativo σ^E o σ^{32} . Además de resistir a rifampicina tiene la ventaja de que su genoma ha sido secuenciado y completamente anotado. Por lo anterior, para estudiar el gen *rgsA* decidimos inactivarlo en esta cepa. Para esto utilizamos el plásmido pGem*rgsA*::Gm previamente construido (Aguilar, 2011), al cual se le deletó la región estructural de gen y se le insertó un casete de resistencia a gentamicina. Se transformó *A. vinelandii* cepa UW136 con el plásmido pGem*rgsA*::Gm, para generar una mutación por inserción mediante doble recombinación homóloga dentro del genoma de la bacteria. Como resultado de la transformación se obtuvieron dos candidatas, las cuales se verificaron mediante PCR amplificando el fragmento silvestre como control, con un tamaño de 1.4 kb, y el fragmento mutante de 2.1 kb. En una de las candidatas se pudo amplificar el fragmento que porta la mutación y no se detectó copia silvestre, obteniendo así nuestra mutante *A. vinelandii* UW136*rgsA* (Fig. 7).

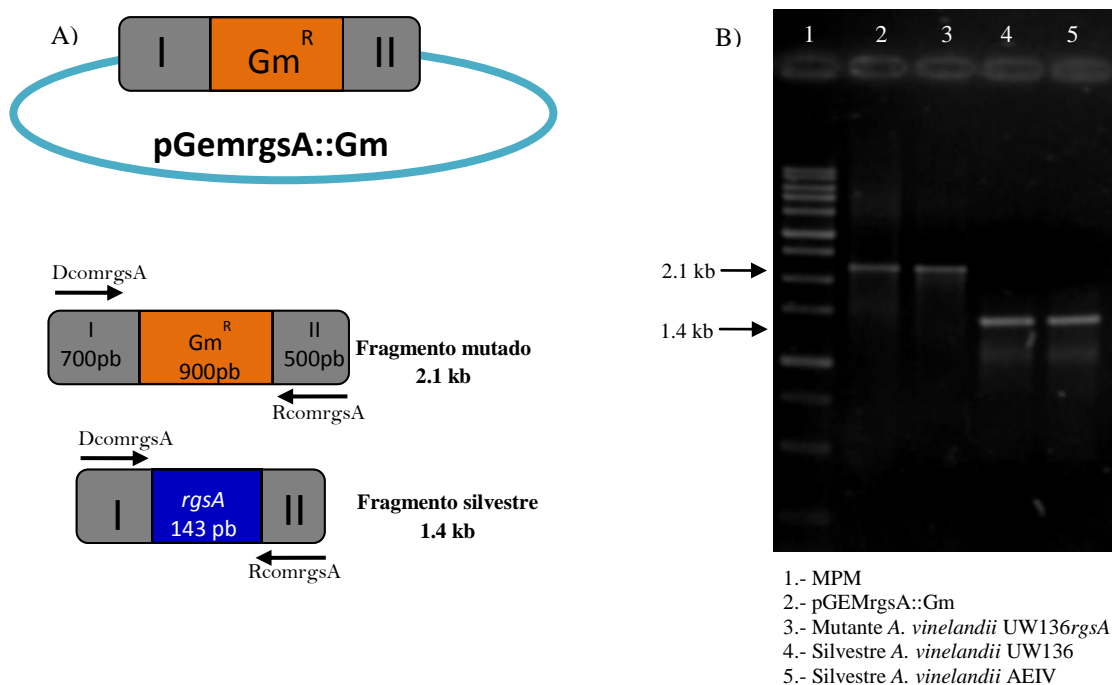


Fig. 7. A) Representación de la mutación de *rgsA* y posición de los oligonucleótidos para confirmarla, B) Electroforesis de los fragmentos de PCR amplificados a partir del locus silvestre y mutante *rgsA*

7.2 Generación de la mutante *A. vinelandii* AEIVrgsA

En el trabajo previo se había intentado mutagenizar la cepa de *A. vinelandii* AEIV, pero no se logró obtener la mutante, así que decidimos volver a transformarla, obteniendo candidatas que fueron verificadas mediante PCR con los oligonucleótidos DcomrgsA y RcomrgsA, mismos que usamos para confirmar la mutante en la cepa UW136. Los amplicones silvestre y mutante fueron visualizados en gel de electroforesis mostrado en la Figura 8.

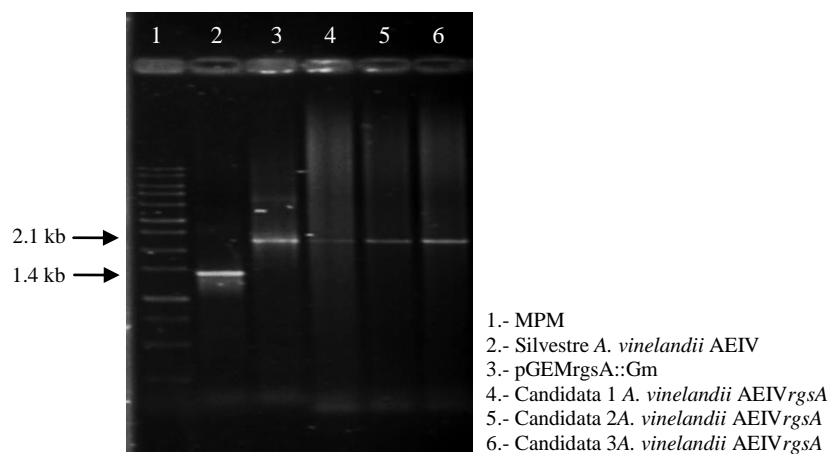


Fig. 8. Electroforesis de los fragmentos de PCR que amplifican el locus silvestre y mutante del gen *rgsA* en la cepa AEIV y su derivada AEIVrgsA

7.3 Complementación genética de la mutantes *A. vinelandii* UW136rgsA y AEIVrgsA

Teniendo las dos cepas mutantes, decidimos complementarlas con el gen *rgsA* silvestre para descartar un efecto de polaridad de la mutación y que el fenotipo manifestado se debiera únicamente a la delección de *rgsA*. Para construir el plásmido con el que se realizaría la complementación, partimos del plásmido pGrgsA1.4 kb previamente construido (Aguilar, 2011), el cual contiene la región reguladora y el gen de *rgsA*, amplificamos el fragmento con los oligonucleótidos DcomrgsA y RsonrgsA. El amplicón fue clonado en el vector pGem®-TEasy y el producto de ligación se nombró pGIrgsA tal como lo muestra la Figura 9.

La finalidad de construir pGIrgsA fue para obtener un sitio de restricción *PstI* del vector pGem®-TEasy, que nos ayudaría a generar nuestra siguiente construcción.

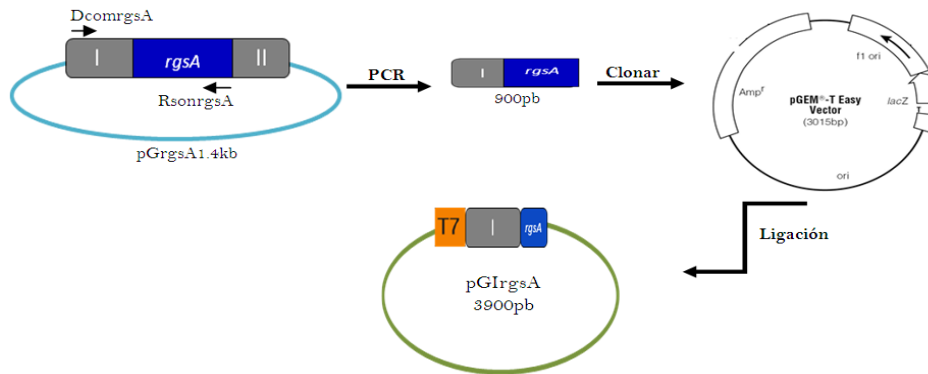


Fig. 9. Construcción del plásmido pGIrgsA

Del plásmido pGIrgsA se realizó un PCR con los oligonucleótidos DcomrgsA y el M13R del vector de clonación. El amplicón se digirió con las enzimas *StuI* y *PstI* para obtener así la secuencia reguladora (URS) y la región estructural de *rgsA*, que se clonó en el plásmido pUMATc, un plásmido integrativo que reconoce la secuencia de *mela* (codifica para una α -galactosidasa), para llevar a cabo la recombinación en el genoma de *A. vinelandii*. El pUMATc fue cortado con las mismas enzimas de restricción *StuI* y *PstI*, se ligó y la construcción se llamó pUMATcrgsA, con el cual transformamos a las mutantes *A. vinelandii* UW136rgsA y *A. vinelandii* AEIVrgsA (Fig. 10).

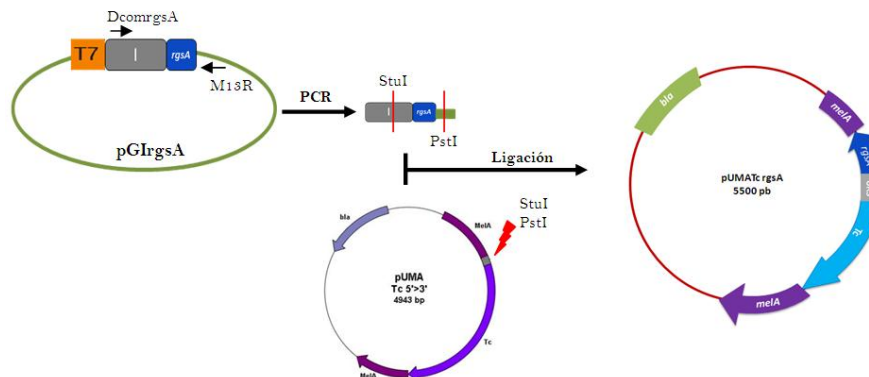


Fig. 10. Construcción del plásmido pUMATcrgsA

Una vez generado el plásmido pUMATcrgsA, transformamos con él a las mutantes en *rgsA*. Las candidatas de las dos cepas UW136 y AEIV obtenidas fueron verificadas mediante PCR. Tanto el fragmento que contiene el gen con su región reguladora con los oligonucleótidos RsgAM1F y RsgAM1R, así como, el fragmento estructural de *rgsA*, amplificado con DsonrgsA y RsonrgsA (Fig. 11).

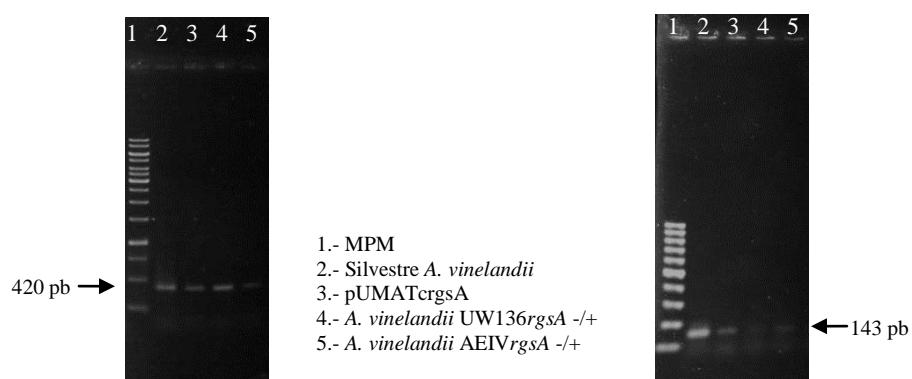


Fig. 11. Electroforesis de PCR's para confirmar la complementación genética de las mutantes

Una vez verificadas las recombinantes para fines prácticos se les nombro de la siguiente forma: *A. vinelandii* UW136*rgsA*^{-/+} y *A. vinelandii* AEIV*rgsA*^{-/+}. Así, una vez obtenidas las mutantes y las complementantes, investigamos la participación de RgsA en la bacteria, midiendo la producción de alginato, PHB, AR's, *biofilm*, así como en la resistencia a estrés oxidativo y por calor.

7.4 Determinación de Alginato, PHB y AR's en las mutantes *rgsA*

En *A. vinelandii* la producción y síntesis de alginato, PHB y AR's están controlados por el sistema GacS/A. RgsA está regulado por RpoS en *Pseudomonas* y en *A. vinelandii* RpoS controla la síntesis de alginato, PHB y AR's, aunque también la producción de estos metabolitos está controlada por GacS/A a través del control que ejerce sobre los ncRNAs de la familia Rsm. Por lo anterior, nos planteamos determinar si RgsA formaba parte de la cascada iniciada por GacS/A en la que toma parte el sistema Rsm o en la que toma parte RpoS.

La medición de alginato sólo se realizó en las cepas de *A. vinelandii* AEIV y derivadas, ya que son las productoras del polímero. Las mediciones se realizaron de acuerdo con la metodología ya descrita y se repitieron tres veces. La producción del metabolito no muestran diferencias entre la cepa silvestre AEIV, la mutante AEIV*rgsA* y la complementada AEIV*rgsA*^{-/+}. Los resultados indican que RgsA no está participando en la síntesis de alginato (Fig. 12).

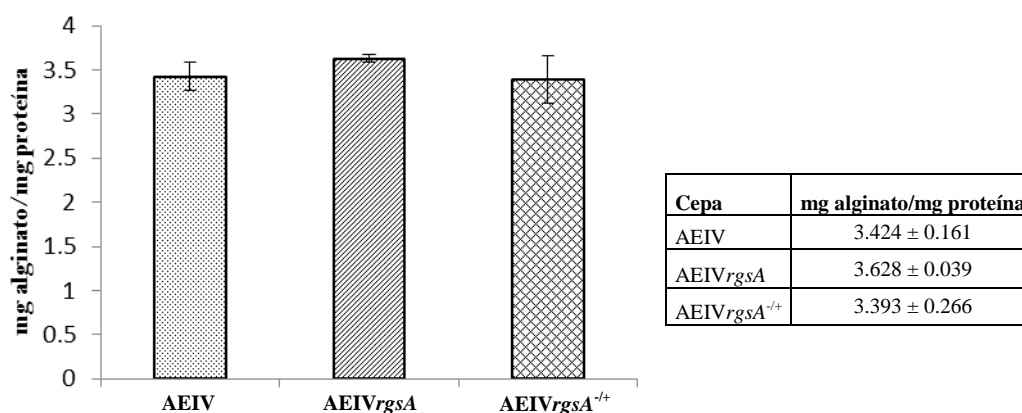


Fig. 12. Grafica de cuantificación de alginato. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

Determinamos la producción de PHB de las cepas silvestres, mutantes *rgsA* y complementadas, tanto de la UW136 y la AEIV. Las cuantificaciones se realizaron a partir de células crecidas en medio mínimo BS y medio rico PY-sacarosa. El gráfico de la Figura 13 representa la medición de las cepas UW136 y no se detectan diferencias de las mutantes respecto a la silvestre en ambos medios. Como era de esperarse la producción de PHB aumento en medio PY-Sacarosa, debido a la disponibilidad de fuente de carbono

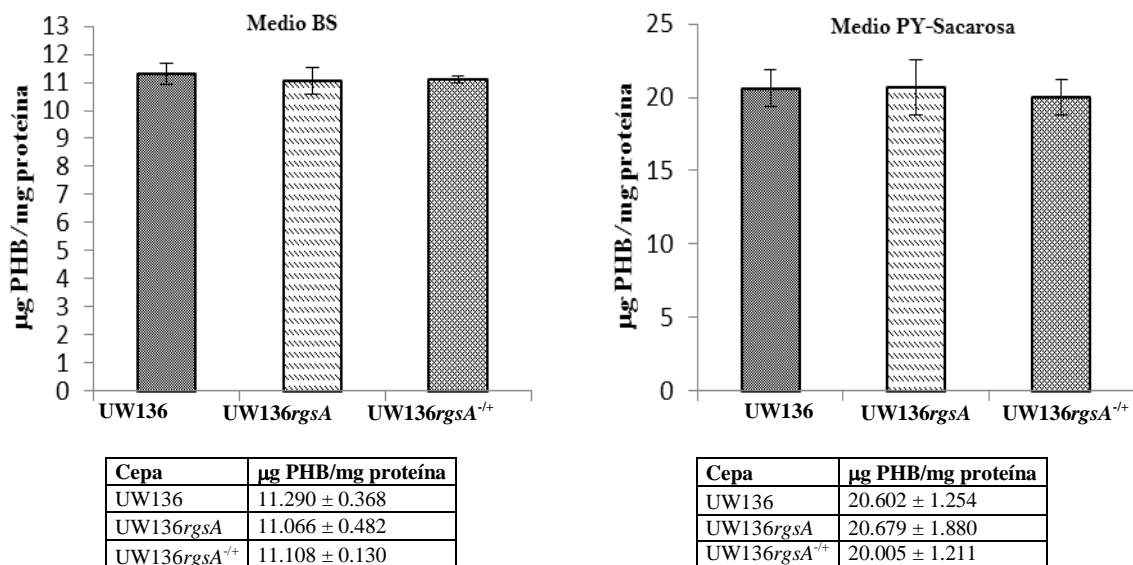


Fig. 13. Gráficos de la cuantificación de PHB en medio BS y PY-Sacarosa en las cepas UW136, UW136rgsA y UW136rgsA^{-/+}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

Las cuantificaciones de las cepas AEIV se realizaron en los dos medios. Como los resultados anteriores, la mutante AEIVrgsA no muestra diferencias respecto a la cepa silvestre y a la cepa complementada, en ambos medios, descartando la posibilidad que RgsA participe en la regulación de la producción de PHB (Fig. 14).

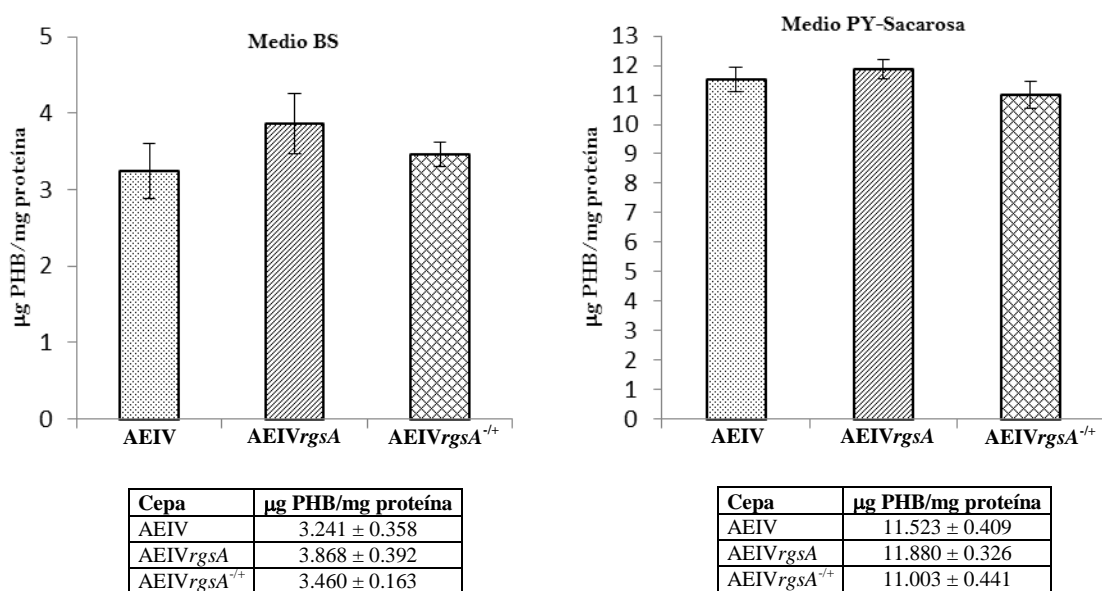


Fig. 14. Gráficos de la cuantificación de PHB en medio BS y PY-Sacarosa en las cepas AEIV, AEIVrgsA y AEIVrgsA^{-/+}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

La síntesis de AR's es inducida al crecer las bacterias en medio Burk-butanol. Una vez crecidas en este medio en cajas petri, las colonias se tiñeron con la solución reveladora Fast-Blue, que se intercala entre los anillos fenólicos de los AR's y los tiñe de rojo. Tampoco se observó diferencia entre las cepas silvestres y las respectivas mutantes. Se tuvieron como controles a las mutantes en *GacA* y *RpoS* de cada cepa, ya que se ha reportado que mutaciones en estos componentes abaten la síntesis de los lípidos fenólicos (Fig. 15, Fig. 16).

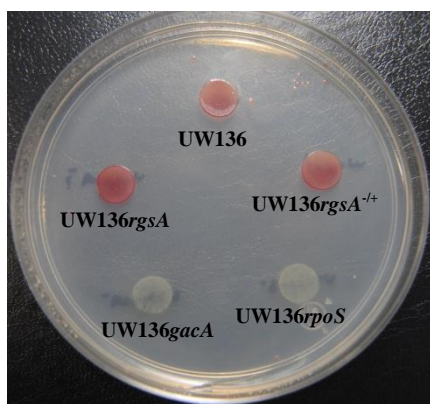


Fig. 15 Placa de las cepas UW136, UW136*rgsA*, UW136*rgsA*^{-/-}, UW136*gacA*, UW136*rpoS* y su producción de AR's.

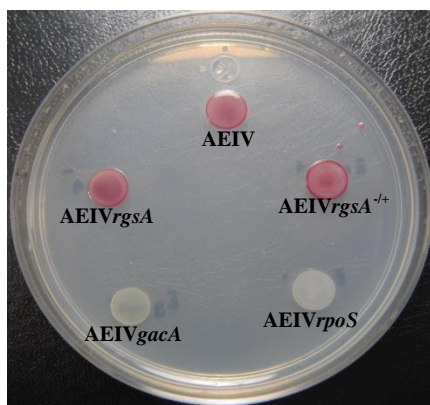


Fig. 16 Placa de las cepas AEIV, AEIV*rgsA*, AEIV*rgsA*^{-/-}, AEIV*gacA*, AEIV*rpoS* y su producción de AR's.

La detección también se realizó en la cepa AEIV y su mutante *rgsA* y como era de esperarse, no se observaron diferencias. En ambos experimentos lo que es claro es la ausencia de los lípidos en mutantes *gacA* y *rpoS*. Dado que este ensayo es cualitativo sería necesario cuantificar la producción de AR's para verificar estos resultados.

7.5 Resistencia a estrés oxidativo

Recientemente en *Pseudomonas* se relacionó a *rgsA* con la tolerancia a peróxido de hidrógeno, por lo que decidimos realizar ensayos de resistencia a estrés oxidativo, para

saber si este ncRNAs juega el mismo papel en *A. vinelandii*. Para esto, se utilizó una concentración alta de peróxido de hidrógeno 300 mM, ya que en concentraciones bajas no permitieron ver diferencia. Los resultados muestran que las mutantes *rgsA* son más susceptibles que las silvestres de ambas cepas UW136 y AEIV.

Las Figuras 17 y 18 muestran las gráficas de sobrevivencia al tratamiento con peróxido de hidrogeno. Las barras en color gris representan a las cepas que no se expusieron a peróxido y en rojo a las que se estresaron, como se observa las que estuvieron en contacto con el peróxido presentaron mayor sensibilidad hasta reducir un 50% o más su viabilidad y las mutantes UW136*rgsA*, AEIV*rgsA* su resistencia fue menor respecto a las cepas silvestres, las complementadas se comportaron igual que las silvestres. Nuestros resultados concuerdan con los observados en especies de *Pseudomonas*.

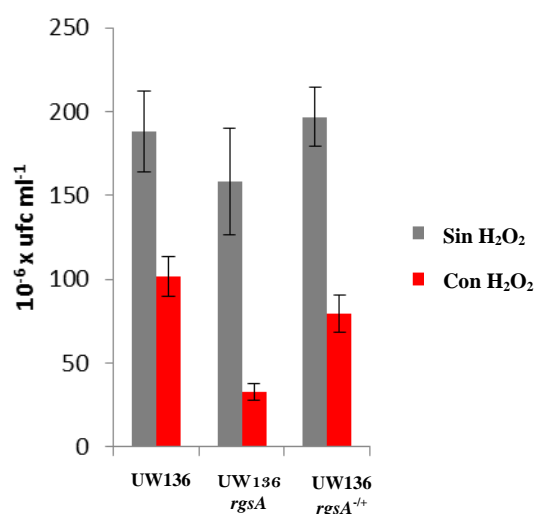


Fig. 17. Resistencia a peróxido de hidrogeno 300mM de las cepas UW136, UW136*rgsA* y UW136*rgsA*^{+/+}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

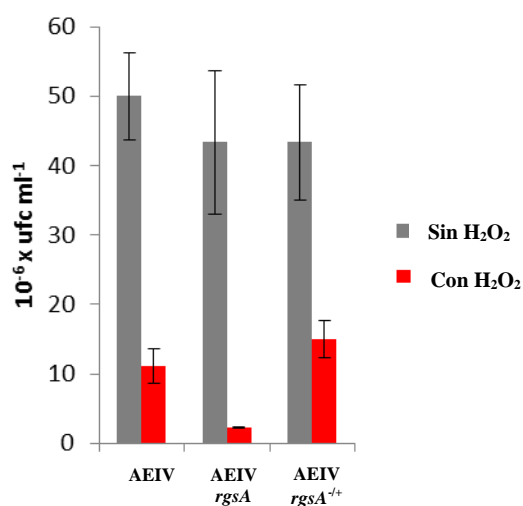


Fig. 18. Resistencia a peróxido de hidrogeno 300mM de las cepas AEIV, AEIV*rgsA* y AEIV*rgsA*^{+/+}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

7.6 Resistencia a estrés por calor

La bacteria se sometió a estrés de temperatura (48 °C) para observar su resistencia y determinar si RgsA participaba en ella. Se realizaron tres ensayos con las cepas silvestres, mutantes y complementadas. Los resultados en las cepas UW136 muestran que las mutantes en *rgsA* resisten más a la temperatura respecto a la cepa silvestre y a la cepa complementada en distintos intervalos de tiempo (0, 30, 60 y 120 minutos). Nuestros

resultados son similares a los observados en *P. syringae* pv. Tomato cepa DC3000 (Fig. 19).

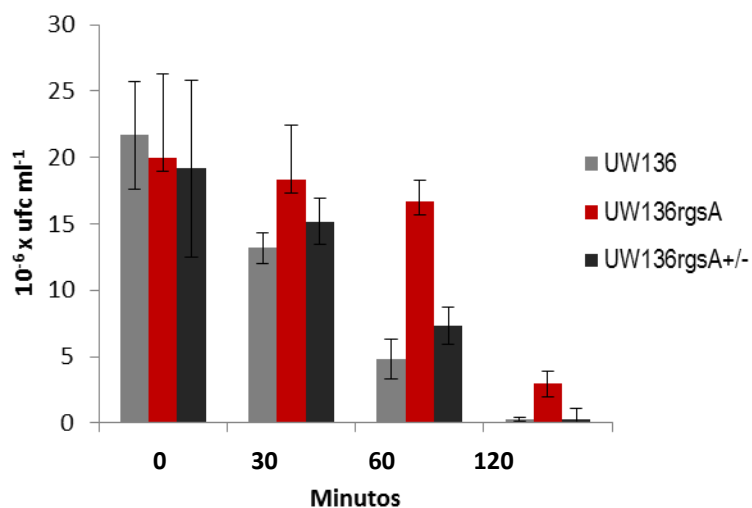


Fig. 19. Resistencia a temperatura (48 °C) de las cepas UW136, UW136rgsA y UW136rgsA^{+/-}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

Respecto a las mutantes en la cepa AEIV, no hay cambios respecto a la silvestre, probablemente influido por la producción de alginato y la menor producción de biomasa. Las mediciones se realizaron por triplicado (Fig. 20).

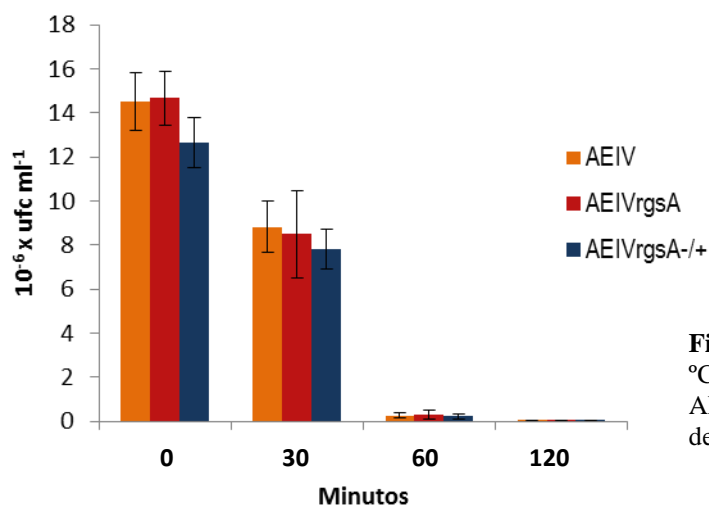


Fig. 20. Resistencia a temperatura (48 °C) de de las cepas AEIV, AEIVrgsA y AEIVrgsA^{+/-}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

7.7 Formación de *biofilm*

Una característica que se presentaba en nuestros cultivos al crecerlos en medio líquido era que en las mutantes *rgsA* presentaban mayor adherencia a las paredes del matraz, lo que podría estar relacionado con la formación de *biofilm*. Por lo anterior decidimos cuantificar la formación de *biofilm*, y aunque en las cepas UW136 no observamos fenotipo (Fig. 21), en las mutantes AEIV*rgsA* observamos una mayor producción de *biofilm* con respecto a la silvestre, ratificando el comportamiento de los cultivos líquidos con agitación. La cepa complementada se comportó como la silvestre, confirmando la participación de RgsA en la capacidad de adherencia en *A. vinelandii* al vidrio y al poli-estireno. Las determinaciones se realizaron en medio BS y PY-Sacarosa, por triplicado (Fig. 22)

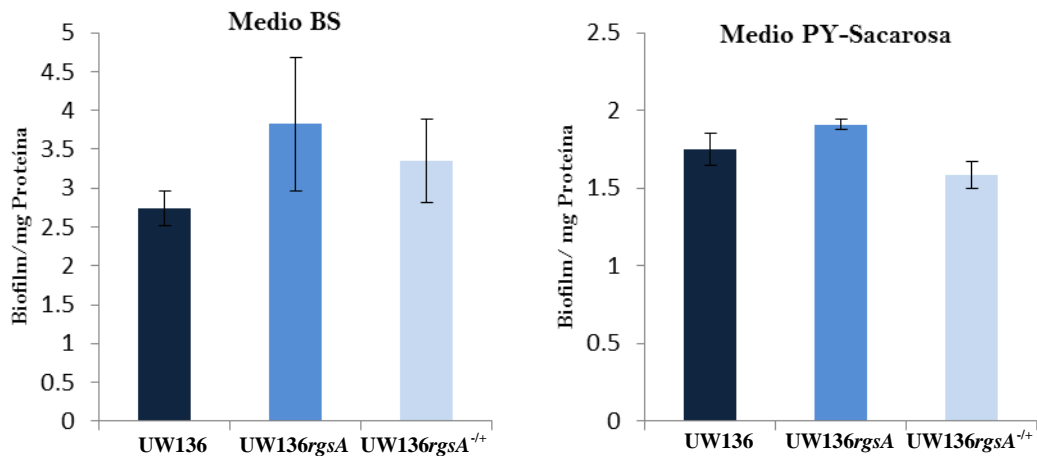


Fig. 21. Producción de *biofilm* en medio BS y PY-Sacarosa en las cepas UW136, UW136*rgsA* y UW136*rgsA*^{-/+}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

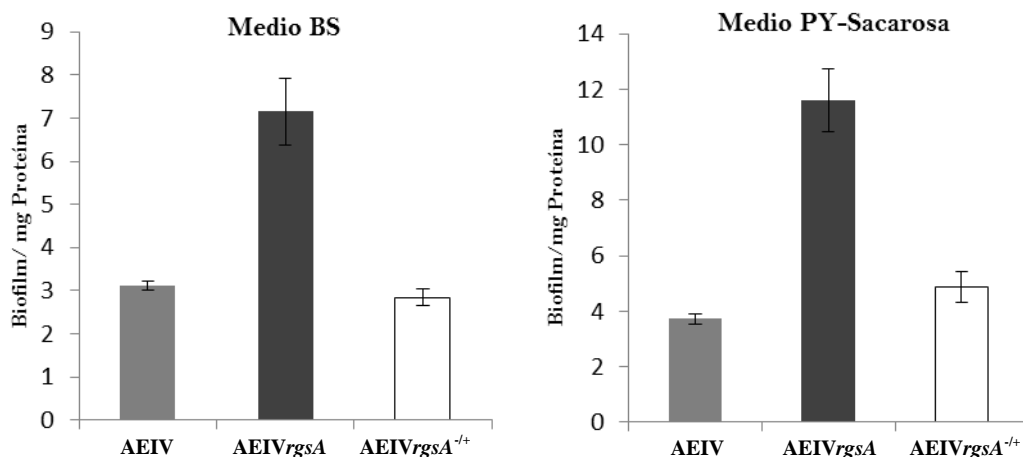


Fig. 22. Producción de *biofilm* en medio BS y PY-Sacarosa en las cepas AEIV, AEIV*rgsA* y AEIV*rgsA*^{-/+}. Las barras muestran la desviación estándar de tres repeticiones.

7.8 Regulación de RpoS y GacA sobre *rgsA*

Para confirmar el posible efecto regulador de RpoS y GacA realizamos ensayos de hibridación tipo Northern-blot, para medir la expresión de RgsA en las mutantes RpoS y GacA. En *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas syringae* se demostró que RpoS regulaba la expresión de *rgsA* directamente, ya que en la secuencia se encontraba la caja -10 y -35 correspondiente a este regulador. También y a pesar de no presentar una secuencia consenso de pegado a GacA la mutación en este regulador también disminuía la expresión de *rgsA*, entonces la regulación puede ser indirecta (González et al., 2008 y Park et al., 2013).

La Figura 23 muestra las hibridaciones de la cepa UW136. En la mutante *rpoS* se abatió completamente la expresión de *rgsA*, ya que no se observó hibridación en comparación a la silvestre, en la mutante *gacA* la intensidad de la hibridación disminuyó respecto a la silvestre y en la mutante en *rgsA* se vio una señal probablemente inespecífica, la que probablemente se deba a una sobrecarga de muestra en el pozo aledaño y la transferencia de la muestra al pozo correspondiente a la mutante *rgsA*. Lo anterior lo proponemos ya que la mutante *rgsA* no presentó copia silvestre en la verificación por PCR. Como control se hibridó contra el RNA ribosomal 16S.

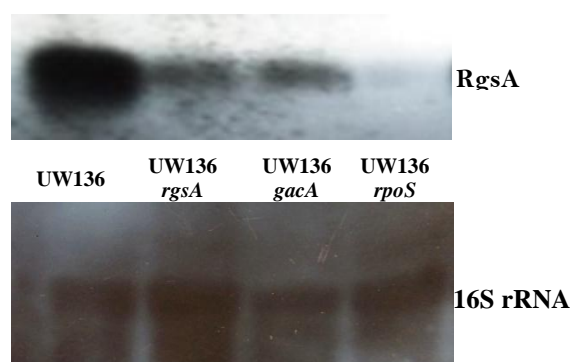


Fig. 23. Detección de la expresión de RgsA en las cepas UW136, silvestre y mutantes *rgsA*, *gacA* y *rpoS*, control gen ribosomal 16S.

En las mutantes de la cepa AEIV se observó lo mismo (Fig. 24). En la hibridación con RpoS se abatió la expresión y en GacA se afectó. En la mutante no se observó hibridación como era de esperarse. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado anteriormente.

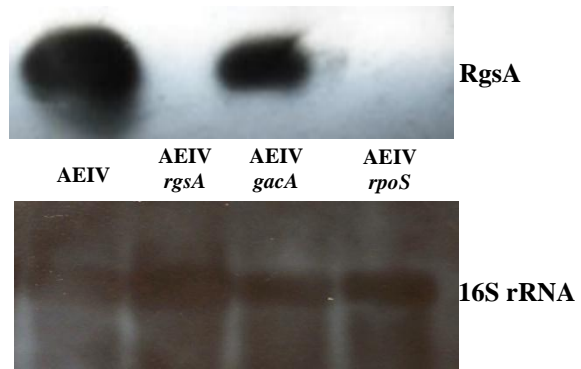


Fig. 24. Detección de la expresión de RgsA de las cepas AEIV, silvestre y mutantes *rgsA*, *gacA* y *rpoS*, control gen ribosomal 16S.

8. DISCUSIÓN

En *A. vinelandii* los pequeños RNAs no codificantes de la familia Rsm ejercen una regulación post-transcripcional, controlando la producción de metabolitos secundarios como alginato, PHB, así como la síntesis de los AR´s (Manzo et al, 2011, Hernández-Eligio, 2009). La participación de RNAs reguladores pequeños en el control de metabolitos secundarios ha abierto el campo para buscar y caracterizar otras moléculas reguladoras similares. Esta búsqueda nos llevó a encontrar otro ncRNA llamado RgsA, un homólogo a un ncRNA presente en especies de *Pseudomonas*, cuya función y regulación aún no están descritas en *A. vinelandii*. En un principio se pensó que podría funcionar de manera similar a los pequeños ncRNAs RsmZ y RsmY ya que presenta un posible sitio de unión a RsmA y podría estar bajo la regulación de GacA, pero con lo reportado y lo encontrado en este trabajo hasta el momento parece que la vía de regulación que ejerce es diferente (Aguilar, 2011, González *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2013).

Para estudiar la regulación y la función de RgsA, se inactivó el gen correspondiente en dos cepas de *A. vinelandii*, la UW136 y AEIV. La UW136 es una cepa no productora de alginato, por la mutación que presenta en el gen *algU*, que es activador de la transcripción del gen *algD* clave en la biosíntesis del alginato. En esta cepa se han realizado casi todos los estudios relacionados con la síntesis de PHB; sin embargo, al no producir el alginato es necesario estudiar la producción del polímero en otra cepa. Por lo anterior se mutó a la cepa AEIV productora de alginato.

Aunque el gen *rgsA* es monocistrónico era importante descartar un efecto de polaridad de la mutación, por lo que se realizó la complementación genética de las mutantes *rgsA*, verificando que la ganancia o pérdida de función observada se debiera a RgsA.

En especies de *Pseudomonas* se demostró que RgsA está regulado positivamente por RpoS. En su secuencia río arriba del inicio putativo de la transcripción se encuentra la caja -10 y -35 correspondiente a este factor sigma. Esto se demostró por análisis de hibridación tipo *Northern* y mediante fusiones transcripcionales. En ambos casos se encontró una menor expresión de *rgsA* en mutantes en *rpoS*. En *A. vinelandii* encontramos cajas -10 y -35 similares a las de *Pseudomonas* por lo que decidimos verificar que realmente la

regulación del homólogo de *rgsA* estuviera a cargo de RpoS. Para probarlo realizamos ensayos tipo *Northern* y claramente observamos que en mutantes *rpoS* de ambas cepas (UW136 y AEIV) no había expresión de *rgsA*. De acuerdo a lo anterior construimos una fusión transcripcional *gusA* con una mutación en la caja -10 del promotor, la cual no mostró actividad; sin embargo, no alcanzamos a generar la fusión control con la caja -10 silvestre (datos no mostrados).

El nombre de RgsA de *Pseudomonas* proviene de las siglas en inglés **Regulated by GacA and stress**, ya que la expresión de *rgsA* se veía afectada en mutantes GacA, aunque en la secuencia no presenta caja de reconocimiento de este factor transcripcional, a diferencia de los ncRNAs *rsmZ* y *rsmY* que si la tienen. En *A. vinelandii* nuestros resultados de los ensayos tipo *Northern* arrojaron resultados similares a los ya reportados por González *et al.* (2008), donde en mutantes *gacA* se ve afectada la expresión de *rgsA*. Probablemente la regulación se establezca de manera indirecta teniendo como intermediario a RpoS, ya que en *A. vinelandii* AEIV GacA está regulando a RpoS, aunque en la cepa UW136 no lo hace, esto nos puede llevar a pensar que la regulación de *rgsA* en ambas cepas es distinta, presentado una vía alterna para la expresión de RgsA.

Se midieron los niveles de alginato de las cepas mucoides las cepas AEIV silvestre, mutante *rgsA* y complementada, ya que GacA a través del sistema Rsm controla la producción del polímero y si *rgsA* contrarrestara la función de RsmA podríamos encontrar afectaciones en la síntesis del polímero. No se observaron diferencias en la producción de alginatos en las cepas probadas. Un caso similar se daría en la síntesis de PHB. La producción de PHB no se vio afectada en las dos cepas UW136 y AEIV y sus mutantes *rgsA*, las mediciones se realizaron tanto en medio rico (PY-sacarosa) como en medio mínimo (BS). La inducción de los AR's y su detección en las mutantes *rgsA* no muestran aumento o disminución en la coloración para detectar los lípidos fenólicos, no así para las mutantes en *gacA* y *rpoS* que no presentan cambio de color cuando se tiñen con el colorante Fast-blue (Segura *et al.*, 2003). Recientemente se encontró que GacA controla la síntesis de AR's controlando la expresión de los ncRNAs RsmZ1 y RsmY y éstos a su vez contrarrestan la función represora de RsmA. Al no observar cambio fenotípico, es probable

que la participación de RgsA no esté relacionada con la misma función que ejercen RsmZ y RsmY.

La fase estacionaria de las bacterias se ha descrito como una fase de estrés, ya que la bacteria resiste a varias condiciones que la privan de fuente de energía y se expone a cambios drásticos en su medio que se desarrolla, como radiaciones UV, desecación, estrés osmótico y calórico, el regulador maestro de esta fase es RpoS. RpoS en *E. coli* controla más de 360 genes relacionados a diferentes estrés que sufre la bacteria; en *P. aeruginosa* RpoS es importante para la resistencia por estrés osmótico, por calor y estrés oxidativo, en *P. fluorescens* se ha relacionado con estrés oxidativo, en *A. vinelandii* RpoS han visto que también participa a la resistencia a estrés oxidativo (Sandercock & Page, 2008).

Al estar regulado por RpoS la función de RgsA se relacionó alguna respuesta a estrés, en *Pseudomonas* se reportó que participa con la resistencia a estrés oxidativo. En particular en *P. syringae* DC3000 se relacionó con el estrés oxidativo y el generado por calor. Por lo anterior decidimos hacer ensayos de resistencia a peróxido de hidrogeno y a temperatura para establecer si la función observada en *Pseudomonas* era la misma en *A. vinelandii*. El estrés oxidativo es causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las que se encuentran aniones superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo, en microorganismos aerobios participan enzimas que degradan a las ROS como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas. En *A. vinelandii* se producen grandes cantidades de especies reactivas debido a su alta capacidad de respiración y por lo tanto sus enzimas catalasas siempre se expresan para que lleven a cabo su función, por ejemplo, los genes housekeeping que codifican para las catalasas Kat1, Kat2 y Kat3 encargados de la regulación de estrés oxidativo en fase estacionaria y fase exponencial (Sandercock & Page, 2008). En los ensayos de estrés oxidativo las mutantes *rgsA* de ambas cepas (UW136 y AEIV), fueron más sensibles al exponerlas a peróxido de hidrogeno, con una resistencia menor del 40% respecto a la silvestre, las complementaciones revierten el fenotipo mutante, los resultados indican que RgsA estaría ayudando a la bacteria a resistir el estrés por peróxidos. Aún no tenemos conocimiento de que manera participa, pero probablemente estaría regulando la expresión de alguna catalasa a nivel post-transcripcional, ya que Kat1, Kat2 y Kat3 están reguladas por RpoS. Al haber poca expresión de estas catalasas en las

mutantes *rgsA* y exponerlas a una fuente alta de ROS la actividad catalasa disminuye y es por eso que la bacteria mutante en *rgsA* se vuelve más sensible a peróxido, esto deja abierta la posibilidad de realizar más estudios sobre la participación de RgsA y de que existe un ncRNAs con otra vía de regulación diferente a las de los ncRNAs Rsm.

A. vinelandii es una bacteria de suelo que está expuesta a muchos eventos adversos como falta de nutrientes, cambios ambientales entre los que se encuentra el calor y la bacteria debe contender a estos. La bacteria forma quistes resistentes a la desecación, entonces es muy probable que un cambio de temperatura en la fase vegetativa lo pueda contrarrestar fácilmente, donde RpoS/RgsA muy probablemente estarían implicados. Sometimos a las bacterias a alta temperatura (48°C) mayor a su temperatura óptima de crecimiento (30°C), nuestros ensayos de estrés calórico mostraron diferentes resultados ya que la cepa UW136*rgsA* resistía más respecto a las mutantes y a las cepas complementadas, no así para la cepa AEIV*rgsA* que no mostró variaciones en comparación a las mutantes y cepas las complementadas. Los resultados observados en la cepa UW136 son similares a los observados en *P. syringae* DC3000, donde observaban un ligero aumento de resistencia a la alta temperatura en las cepas con una delección en *rgsA*, Se ha reportado en otras *Pseudomonas* que la mutación en RpoS hace a la bacteria más sensible a temperaturas elevadas. Probablemente RgsA estaría regulando algún RNAm que afecte la estabilidad de RpoS y que por eso vemos una mayor sensibilidad en nuestras mutantes, la regulación de RpoS se da a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional y que están actuando diferentes reguladores en cada nivel (Battesti *et al.*, 2011). Podríamos pensar que uno de ellos sea RgsA con lo observado hasta el momento, faltan hacer ensayos para verificar nuestra hipótesis y cimentar mejor la información obtenida. En cuanto a la cepa AEIV que no mostro diferencias, podríamos pensar que está influyendo la densidad poblacional y la producción de alginato, ya que al producir alginato hace que el número de bacterias disminuya a diferencia de las cepas no productoras de alginato, en tanto la presencia del polímero podría proteger de alguna manera en la bacteria.

Durante el crecimiento de las mutantes *rgsA* en medio líquido era evidente una mayor adherencia de células a la pared de los matraces, a simple vista se observaba una mayor producción de *biofilm* en las mutantes respecto a la cepa silvestre. El *biofilm*

bacteriano es un grupo de células que crecen en determinada área, ya sea viva o inerte, y se adhieren a ella. El *biofilm* está compuesto en su mayoría de exopolisacárido y le sirve a la bacteria como un medio que hace accesible nutrientes, agua y enzimas. En *P. aeruginosa* la producción de *biofilm* se ha relacionado con la presencia de apéndices extracelulares como el flagelo y pili tipo IV (O'Toole & Kolter, 1998). En *A. vinelandii* aún no se conoce bien la regulación de la formación del *biofilm*. Los resultados de cuantificación de *biofilm* fueron mayores en las mutantes AEIVrgsA, pero solo en la cepa mucoide; sin embargo, las mutantes derivadas de la cepa UW136 no mostraron cambio con respecto a la silvestre. La mutante *A. vinelandii* AEIVrgsA produjo dos veces más respecto a la silvestre, coincidiendo con los reportes de que la formación de *biofilm* aumenta cuando hay mayor cantidad de exopolisacáridos. De acuerdo con esto, la cepa mucoide AEIV produce alginato que probablemente este ayudando a la capacidad de adherencia de la bacteria y no así para la cepa UW136 no productora de alginato. En un estudio en *A. vinelandii* donde se mutó una proteína *like*-rodanasa (tiosulfato cianuro sulfurotransferasa), una proteína antioxidante encargada de controlar el desequilibrio oxidativo en células plactónicas (Remelli *et al.*, 2010), la mutación provocó estrés oxidativo crónico sub-letal, ya que al ser expuesta a fuentes exógenas de ROS se encontró un aumento en la formación de *biofilm* y su estructura presentó características diferentes a las de la cepa silvestre, que también presentaba formación de *biofilm* al exponerla a ROS. Se determinó que una respuesta al estrés oxidativo que sufre la bacteria es la formación de *biofilm* (Villa *et al.*, 2012). Nuestros resultados coinciden con los descritos anteriormente, RgsA está directamente involucrado en la resistencia a estrés oxidativo y la respuesta de este estrés genera una mayor producción de *biofilm*, como lo observaron Villa *et al.*, (2012).

9. CONCLUSIONES

1. RgsA está regulado positivamente por RpoS en *A. vinelandii* AEIV y UW136.
2. RgsA está regulado indirectamente por GacA en *A. vinelandii* AEIV y UW136.
3. RgsA no participa en la producción de alginato, PHB y AR's.
4. RgsA participa en la resistencia al estrés oxidativo en las cepas UW136 y AEIV.
5. RgsA participa en el estrés calórico en la cepa UW136.
6. RgsA controla la formación de *biofilm* en la cepa AEIV.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar el inicio de la transcripción del gen
- Hacer ensayos tipo EMSA para verificar la interacción de RgsA con RsmA y con Hfq
- Realizar Zimogramas para saber si se afecta la actividad catalasa en la mutante RgsA

11. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, O. I. 2011. Diseño de herramientas moleculares para el estudio del pequeño RNA no codificante RgsA en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura biomedicina. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
- Battesti, A., Majdalani, N. and Gottesman, S. 2011. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.*;65:189-213.
- Bergey, D. H., Garrity, G. M., Boone, D. R., Castenholz, R. W. and Brenner, D. J. 2001. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York. Ed. Springer. Pp 384-402.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.
- Campos, M. E., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Nuñez, C., Espín, G., and Soberón-Chávez, G. 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. and Espín, G. 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -Hydroxybutirate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Nuñez, C. and Espín, G. 2001. The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787-6793.
- Clementi, F. 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17:327-361.
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M. and Espín, G. 2014. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology.* 160, 479-487.
- Dawes, A. E. 1990. Novel microbial polymers: an introductory overview. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. Ed. Dawes, E. A. 3-16.
- Fortune, D. R., Suyemoto, M. and Altier, C. 2006. Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Infect Immun.* 74: 331-339.
- Galindo E., Peña, C., Nuñez, C., Segura, D. and Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.* 16: 6:7.
- González, N., Heeb, S., Valverde, C., Kay, E., Reimmann, C., Junier, T. and Hass, D. 2008. Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species. *BMC Genomics*, 9:167.
- Guadapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P. and Romeo, T. 2001. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 6017-6027.

- Haug, A. and Larsen, B. 1971. Biosynthesis of alginate: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*; Carbohydrate Res.; 17: 287-296.
- Heeb, S., and Hass, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. Mol. Plant Microbe Interact. 14:1351-1363. Review.
- Henderson, C., Vincent, H., Casamento, A., Stone, C., Phillips, J., Cary, P., Sobott, F., Gowers, D., Taylor, J. and Callaghan, A. 2013. Hfq binding changes the structure of *Escherichia coli* small noncoding RNAs OxyS and RprA, which are involved in the riboregulation of rpoS. RNA 19:1089–1104.
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S. and Espín, G. 2011. Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. Microbiology 157:3014–3023
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F. and Espin, G. 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology. 158: 1956-1963.
- Hüttenhofer, A. Kiefmann, M., Meier-Ewert, S., O'Brien, J., Lehrach, H., Bachellerie, J. P. and Brosius, J. 2001. RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, nonmessenger RNAs in mouse. EMBO J. 20, 2943–2953.
- Kozubek, A. and Tyman, J. 1999. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity .Chem. Rev.; 99: 1- 26.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B. and Korsatko, W. 1990. Microbial production of Poly-β-hydroxybutyric acid. Rehm H. J., Reed (Eds.) Biotechnology.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. and Haas, D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. Mol. Microbiol. 67: 241-253.
- Law, J. and Slepcky, A. 1961. Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82: 33-36.
- Lenz, D.H., Miller, M.B., Zhu, J., Kulkarni, R.V. and Bassler, B.L. 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 58:1186–1202.
- Lin, L. P. and Sadoff H. A. 1969. Chemical composition of *Azotobacter vinelandii* cysts. J. Bacteriol. 100: 480-486.
- Liu, M. Y., and Romeo, T. 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA binding protein. J. Bacteriol. 179: 4639-4642.
- Lloret, L., Barreto, R., León, R., Moreno, S., Martínez-Salazar, J., Espín, G. and Soberón-Chávez, G. 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. Mol. Microbiol. 21:449-457.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265–275.

- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L. and other authors. 2011. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 21, 147–159.
- Martínez-Salazar, J., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G. and Deretic, V. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA MucB MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178:1800-1808.
- Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., Soberón-Chávez, G. and Espín, G. 1998. Role of the alternative sigma factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180: 2766- 2769.
- Nobutaka, F., Hiroki, O., Aiko, H. and Suehara, H. 2006. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 6356-6361.
- Núñez, C., Moreno, S., Soberón-Chávez, G., and Espín, G. 1999 The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* 181:141-148.
- O’Toole, G. A. and Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30:295–304.
- Park, S. H., Butcher, B. G., Anderson, Z., Pellegrini, N., Bao, Z., D’Amico, K. and Filiatrault, M. J. 2013. Analysis of the small RNA *P16/RgsA* in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000. *Microbiology.* 159: 296-306.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* 184, 5672–5677.
- Rehm, H. and Valla, S. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 281-288.
- Remelli, W., Cereda, A., Papenbrock, J., Forlani, F. and Pagani, S. 2010. The rhodanese RhdA helps *Azotobacter vinelandii* in maintaining cellular redox balance. *Biol Chem* 391:777–784.
- Reusch, R. N. and Sadoff, H. L. 1981. Lipid Metabolism During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 145: 889-895.
- Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol* 29:1321-30.
- Sadoff, H. L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 39:516-539.
- Sandercock, J. R. And Page, W. J. 2008. RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. *J Bacteriol* 190, 946–953.
- Segura, D., Cruz, T. and Espín, G. 2003. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* 179, 437–443.

- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M. and Espín, G. (2009). Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J Bacteriol* 191, 3142–3148.
- Senior, P. J., Beech, G. A., Richie, G. A. and Dawes, E. A. 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 128:1193-1201.
- Stock, J., Surette, M. G., Levit, M. and Park, P. 1995. “Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis.” *Two-component signal transduction*, eds. Hoch and Silhavy, T. J. (ASM, Washington D. C.) 25-51.
- Vázquez, A., Moreno, S., Guzmán, J., Alvarado, A. and Espín, G. 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene.* 232: 217-219.
- Villa, F., Remelli, W., Forlani, F., Gambino, M., Landini, P., and Cappitelli, F. 2012, Effects of chronic sub-lethal oxidative stress on biofilm formation by *Azotobacter vinelandii*, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 28:8, 823-833.
- Vogel, J. and Sharma, C. M. 2005. How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biol Chem*, Vol. 386, No. 12. pp. 1219 1238.