



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA



CICM - ICUAP

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
MICROBIANA**

**CARACTERIZACIÓN DEL REGULADOR POST-
TRANSCRIPCIONAL RsmC EN *Azotobacter vinelandii*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**CON OPCION EN
BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

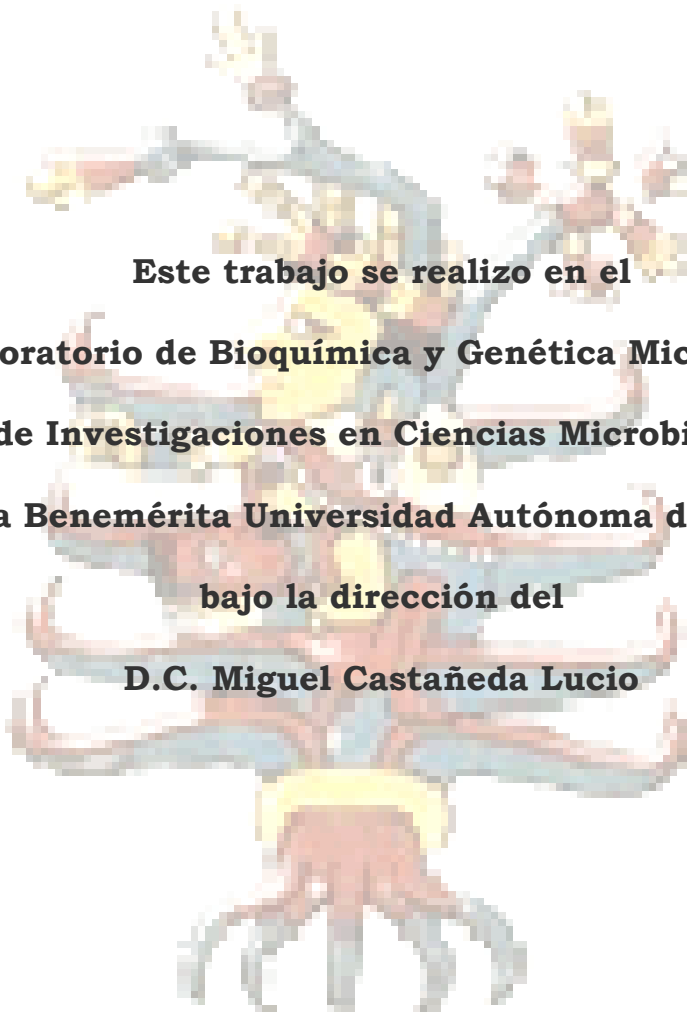
PRESENTA:

Q.F.B. YURI SOLIS CONDE

ASESOR:

D.C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO

H. PUEBLA DE LOS ANGELES, PUE. 27 JULIO 2007



Este trabajo se realizó en el
Laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana
del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM)
de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
bajo la dirección del
D.C. Miguel Castañeda Lucio

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Castañeda Lucio, por la confianza, dedicación, paciencia y consejos que tuvo hacia mí para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado

D.C. Miguel Castañeda Lucio

D.C. Beatriz Eugenia Baca

D.C. Javier Martínez Morales

D.C. Ricardo Carreño López

Por su valioso tiempo y aportaciones hacia este trabajo

A mis amigos y compañeros de trabajo:

Lety, Lili, Eva y Luís por demostrar el compañerismo y amistad. Migue, por echarme la mano incondicionalmente y por las alegrías vividas. A mis compañeros y amigos de generación 2003-2005, que a pesar de ser una generación numerosa fue una gran generación en varios aspectos.

Y a mis amigos de trabajo.

También al CONACYT, por la beca otorgada.

DEDICATORIAS

A mi familia:

Mi hijo, por llegar a mi vida y llenarla de alegría y felicidad, por ser el ser mas maravilloso sobre la tierra y una bendición de Dios.

Mi esposo, por ser parte importante de mi vida y estar conmigo en todo momento.

Mi madre, por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado y por su gran cariño.

Mi sobrina Brittany, por los momentos inolvidables brindados, por dejarme verla crecer, por sus sonrisas, besos y ternura, por ser tan inocente.

Mis Hermanas y Sobrinos, se que cuento con ellos aunque no estén conmigo físicamente

A Dios, por darme la fuerza y la oportunidad de seguir adelante.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
1.2. Ciclo de Vida de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
1.3. Metabolismo Secundario de <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
1.4. Composición, Aplicaciones y Biosíntesis de Alginato en <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
1.5. Composición, Aplicaciones, Función biológica y Biosíntesis de PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	7
1.6. Sistema doble componente.....	9
1.6.1. Sistema doble componente GacS/GacA.....	10
1.7. Sistema GacS/GacA en <i>Azotobacter vinelandii</i>	11
1.8. Generalidades el Sistema de Regulación Post-Transcripcional CsrA/CsrB (RsmA/RsmB).....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
3. HIPOTESIS.....	17
4. JUSTIFICACION.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo General.....	19
5.2. Objetivo Particular.....	19
6. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	20
7. RESULTADOS.....	22
7.1. Generación de la mutante AE IV <i>rsmC</i> y AE IV <i>rsmBC</i>	22
7.2. Cuantificación de alginato y PHB en la AE IV silvestre, AE IV <i>rsmC</i> y AE IV <i>rsmBC</i>	26
7.3. Cuantificación de alginato en diferentes Fuentes de carbono.....	27

7.4. Cuantificación de alginato y PHB en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno.	28
7.5. Expresión de <i>rsmC</i> en condiciones diazotróficas, no diazotróficas y en diferentes fuentes de carbono.	30
7.6. Sobre-expresión del gen <i>rsmC</i> en la mutante <i>gacA</i> en <i>A. vinelandii</i>	32
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	33
9. CONCLUSIONES.	37
10. PERSPECTIVAS.	37
11. MATERIA Y METODOS.	38
11.1. Cepas bacterianas y plásmidos.	38
11.2. Medios y Condiciones de Cultivo.	39
11.3. Amplificación del gen <i>rsmC</i>	39
11.4. Construcción de las cepas AE IV <i>rsmC</i> y AE VI <i>rsmBC</i>	39
11.5. Transformación de <i>A. vinelandii</i> con DNA plásmidico o Cromosomal.	39
11.6. Método de conjugación triparental en <i>A. vinelandii</i>	40
11.7. Hibridación Southern.	40
11.8. Cuantificación de la producción de alginato por el método de Carbazol.	41
11.9. Cuantificación de proteína por el método de Lowry.	42
11.10. Cuantificación del contenido de PHB.	43
11.11. Determinación de actividad de β -glucoronidasa.	43
11.12. Purificación de DNA cromosomal de <i>A. vinelandii</i>	44
11.13. Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	44
11.14. Extracción de plásmido por lisis alcalina.	44
11.15. Manipulación de DNA.	45
12. REFERENCIAS.	46

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa, fijadora de nitrógeno y de vida libre, produce dos biopolímeros de interés industrial como son los alginatos y el poli- β -hidroxibutirato (PHB). Los alginatos una familia de exopolisacáridos usados en la industria farmacéutica y alimenticia como aditivo, en tanto que el PHB es un poliéster natural, usado como materia prima para la síntesis de plásticos biodegradables.

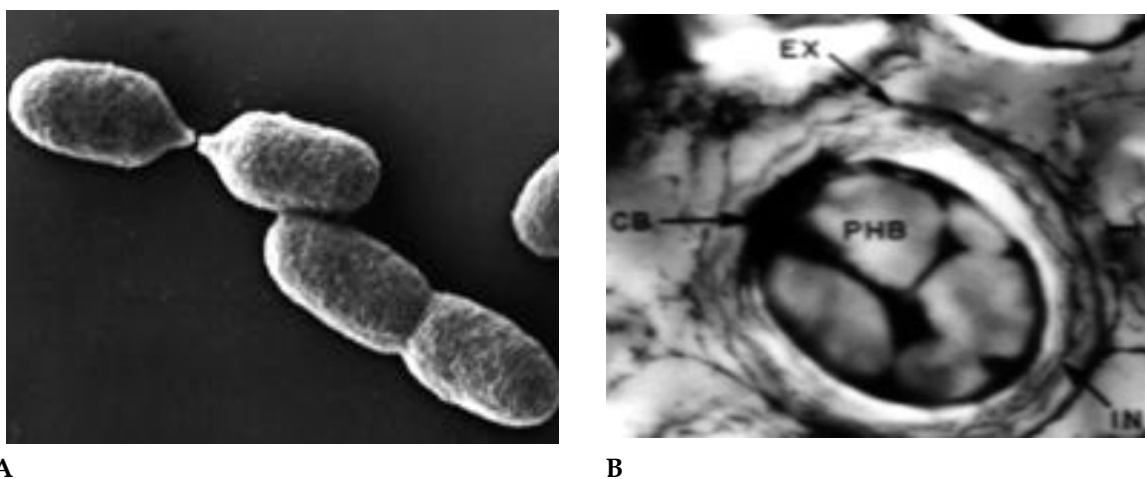
En *A. vinelandii* el sistema de transducción de señales de dos componentes GacS/A controla la biosíntesis del PHB y alginato (Castañeda, 2001). En algunas bacterias GacS/A controla sus blancos modulando a su vez a otros sistemas de regulación como el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/B (Heeb & Haas, 2001). El sistema RsmA/B en *Erwinia* y *Pseudomonas* controla la producción de metabolitos secundarios. El sistema de regulación post-transcripcional RsmA/B esta compuesto por dos elementos, un elemento proteico llamado RsmA que al unirse a una región cercana al sitio de unión a ribosoma de sus RNA mensajeros blancos de regulación impide su traducción y promueve su degradación. El segundo componente RsmB es un RNA regulador no codificante que antagoniza los efectos de RsmA "secuestrándolo", dejando libre así al RNA mensajero, posibilitando su traducción. En *A. vinelandii* se ha establecido una relación entre los sistemas GacS/A y RsmA/B, así como de estos con la síntesis de biopolímeros. En *Pseudomonas fluorescens*, se ha reportado más de un RNA regulador del sistema Rsm (Valverde, 2003) partiendo de la hipótesis de que podría ocurrir algo similar en *A. vinelandii*, se propuso identificar y caracterizar a un nuevo elemento del sistema Rsm. En *P. fluorescens* se reportaron dos homólogos del gen *rsmB*, llamados *rsmZ* (*rsmB*) y *rsmY*, en este sistema RsmY funciona de manera similar a RsmZ (RsmB). Los genes que codifican para el elemento RNA regulador de los sistemas Rsm están poco conservados, sin embargo, los RNA codificados presentan estructuras secundarias características con varios tallos y asas. Por la cercanía filogenética entre *A. vinelandii* y *P. fluorescens* se buscó en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* (www.azotobacter.org) un homólogo a RsmY. La búsqueda fue infructuosa, sin embargo, al utilizar como patrón de comparación el gen *rsmB* de *A. vinelandii*, encontramos un homólogo putativo. Al gen putativo le llamamos *rsmC*, y al predecir la estructura secundaria del RNA presentó los tallos y asas característicos de esta familia de reguladores. Por intercambio de marcadores genéticos, se generaron mutantes *rsmC* y *rsmBrsmC*, las cuales se les evaluó la producción de alginato y PHB. En ambos casos se encontró una mayor producción en la mutante *rsmC* en comparación con la cepa silvestre, demostrando que *rsmC* se encuentra involucrado en la biosíntesis de alginato y PHB. Los datos sugieren que el gen *rsmC* actúa como un represor. Se construyó una mutante doble *rsmBC*, observándose en ésta disminución de un 70% de la producción de alginato y un 90% de la producción de PHB. La disminución en la producción de los polímeros se encuentra en niveles similares a los observados en una mutante *rsmB* (Bustillos, 2004). Además se evaluó en la mutante *rsmC* la producción de alginato y PHB en condiciones diazotróficas y no diazotróficas. Los datos mostraron una mayor producción de alginato en la mutante bajo condiciones de no fijación de nitrógeno, en cuanto a la producción de PHB la mutante presenta mayor producción en condiciones

de fijación de nitrógeno. También se caracterizó la producción de alginato en la mutante crecida en diferentes fuentes de carbono (de tipo glucolíticas y de tipo gluconeogénicas). En la mutante *rsmC* hay mayor producción de alginato cuando crece con fuente de carbono de tipo gluconeogénico, sugiriendo que en la mutante *rsmC* se facilita el flujo de carbono hacia la biosíntesis de alginato en dicha condición de crecimiento. Por otra parte se estudió la expresión de *rsmC* usando una fusión transcripcional *rsmC-gusA*, encontrando una mayor expresión de *rsmC* en condiciones de no fijación de nitrógeno, caso contrario a la expresión de *rsmB* (Bustillos, 2004), lo que sugiere que existe una expresión diferencial de los genes que codifican para estos RNAs. También es mayor la expresión de *rsmC* en crecimiento con fuente de carbono de tipo gluconeogénico. En cuanto a la expresión de *rsmC* en una mutante *rsmB*, ésta decaé en cualquier condición de crecimiento, lo cual sugiere fuertemente que para establecer una expresión eficiente de *rsmC* se requiere de la expresión de *rsmB*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii pertenece a la familia *Azotobacteriaceae*, es una bacteria Gram negativa, fijadora de nitrógeno, de vida libre, móvil por flagelos peritricos, aerobia y puede crecer en concentraciones bajas de oxígeno. Son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro su morfología puede variar de la forma bacilar a células en forma de cocos pudiéndose presentar individual o en díadas (Fig. 1A en forma bacilar) (Nagpal *et al.* 1989). *A. vinelandii* bajo condiciones ambientales adversas sufre un proceso de diferenciación para formar estructuras resistentes a la desecación, desintegración mecánica y radiación ultravioleta, a los que se les conoce como *quistes* (Fig. 1B); cuya formación es influenciada por la fuente de carbono en el medio. *A. vinelandii* puede crecer a partir de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos (Brock *et al.* 1999). *A. vinelandii* ha sido objeto de estudio principalmente por sus capacidades metabólicas y genéticas, I) fija nitrógeno en presencia de oxígeno, II) posee una alta capacidad respiratoria, III) sufre un proceso de diferenciación morfológica y IV) produce una gran variedad de metabolitos secundarios, entre ellos dos polímeros de interés industrial: el alginato y el PHB; aspecto de interés para este trabajo.



A

B

Fig. 1 A. *Azotobacter vinelandii* en forma bacilar. B. *Azotobacter vinelandii* en forma de quiste.

1.2. CICLO DE VIDA DE *A. vinelandii*

En el ciclo de vida de *A. vinelandii* se presentan dos fases, una fase de crecimiento vegetativo y una fase de vida latente; no se conoce hasta el momento cuales son las condiciones ambientales por la cuales concluye la fase vegetativa y se inicia el proceso de diferenciación (fase de vida latente). En el laboratorio se puede inducir este proceso mediante medios de crecimiento con β -hidroxibutirato y n-butanol.

Cuando se inicia el proceso de diferenciación las células pierden sus flagelos y se presenta una última división celular donde se generan dos células esféricas de tamaño

menor, las cuales están formadas por dos capas cubierta por intina y exina (13 y 32% respectivamente), constituidas principalmente de alginato y lipoproteínas (Lin & Sadoff, 1969). Una vez que termina este proceso, se presenta la formación de quistes maduros, que son células de 1.5 μm de largo x 2.0 μm de ancho, constituidos por un cuerpo central o basal, que en su interior contiene gránulos de un polímero de reserva PHB. En condiciones favorables, el quiste inicia un proceso de germinación con el hinchamiento del cuerpo central, y provocando la ruptura de la exina, emergiendo dos células que adquieren nuevamente movilidad (Sadoff, 1975). En la fase vegetativa también hay producción de alginato (Fig. 2) (Clementi, 1998).

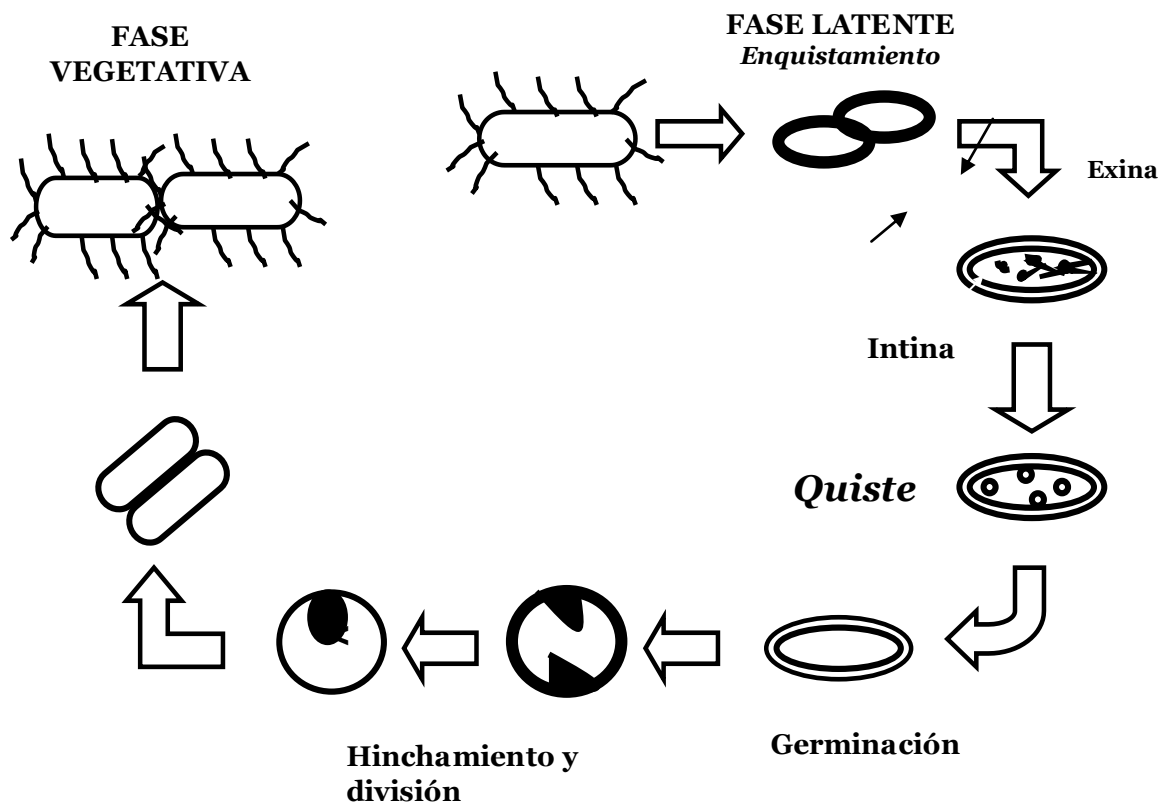


Fig. 2. Ciclo de vida de *A. vinelandii*

1.3. METABOLISMO SECUNDARIO

La gran capacidad metabólica de *A. vinelandii* posibilita la producción de metabolitos secundarios, como ejemplo de ello tenemos la producción de sideróforos, alquilresorcinoles, fitohormonas reguladoras del crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citocininas. Produce además alginato y el PHB, dos polímeros de importancia industrial (Nagpal *et al.* 1989).

1.4. COMPOSICIÓN, APLICACIONES, FUNCIÓN BIOLÓGICA Y BIOSÍNTESIS DE ALGINATO EN *A. vinelandii*.

1.4.1. Composición.

Los alginatos son una familia de heteropolímeros, compuestos por monómeros de ácido glucurónico (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-G-G-M-M) donde el número de monómeros en los bloques es irregular (Fig. 3) (Haug *et al*, 1971). La variabilidad de la distribución y contenido de ácido gulurónico y ácido manurónico permite tener alginatos con diferente capacidad de gelificación, con contenido de ácido glucurónico alto, se generan geles rígidos y resistentes, y un alginato con bajo contenido de este, los geles se presentan suaves y elásticos (Clementi, 1998).

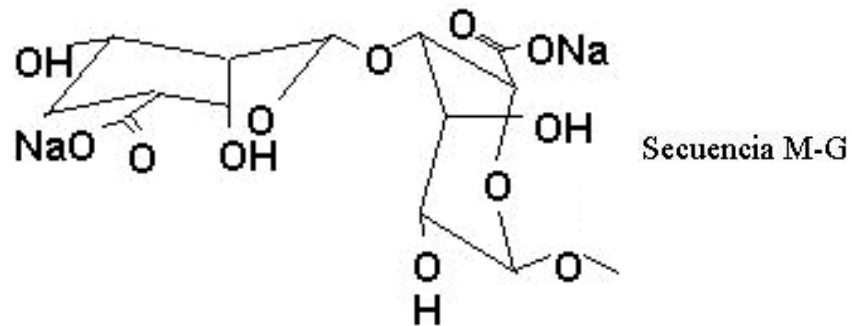


Fig. 3. Estructura del alginato (Haug *et al*, 1971)

1.4.2. Aplicaciones.

Este polímero tiene aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica, usándose como aditivo capaz de viscosificar, estabilizar, emulsionar y gelificar soluciones acuosas. Actualmente se ha estudiado su uso en recubrimiento de heridas, así como en tecnologías de inmovilización de células y enzimas (Clementi, 1998).

Los alginatos usados en la industria actualmente, se extraen de algas cafés del género *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*, se conoce en general la proporción M/G de los alginatos provenientes de estas algas, sin embargo la composición esta sujeta a variaciones ambientales y a la edad del cultivo generando una variación en la calidad del alginato comercial. A esta situación de variedad de la calidad del alginato, la producción de alginatos de origen bacteriano con calidad uniforme se presenta como una alternativa interesante para la producción.

Los alginatos producidos por *A. vinelandii* tienen una composición muy similar a la producida por las algas, presentándose como un candidato para producir alginatos por medios biotecnológicos (Gacesa, 1998).

1.4.3. Función biológica.

El alginato es esencial para la biogénesis del quiste maduro, ya que este polímero constituye el 13 y 32% del peso seco de la intina y exina respectivamente (Lin & Sadoff, 1969). En estado vegetativo, el alginato le sirve a la bacteria para formar películas de adherencia a superficies o bien actuar como barrera contra la difusión del oxígeno o metales pesados (Clementi, 1998). Hasta hace poco se creía que el PHB era esencial para el proceso de diferenciación, sin embargo en condiciones de laboratorio, cepas mutantes no productoras del poliéster enquistan tan bien como la cepa silvestre (Segura & Espin, 2003).

1.4.4. Biosíntesis de alginato.

En la biosíntesis de alginato, son usados los azúcares de seis carbonos como fuente de carbono, los cuales se metabolizan (excepto fructuosa y manosa), por la vía Entner-Duodoroff. Estos azúcares se metabolizan a gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, el gliceraldehído 3-P por medio de la triosa fosfato isomerasa y una aldolasa (condensación aldólica), la bacteria puede sintetizar fructosa 6-P a partir de triosas fosfato (Gacesa, 1998). La fructosa 6-P se utiliza como sustrato por la fosfomanosa isomerasa (PMI) para generar manosa 6-P, ésta a su vez convierte la manosa 1-P por la fosfomanosa mutasa (PMM) (Gacesa, 1998), ésta se activa vía GTP por la GDP-manosa pirofosforilasa (GMP), generando GDP-manosa, ésta se oxida a ácido manurónico por la enzima GDP-manosa deshidrogenada (GMD), el ácido manurónico se polimeriza en la membrana interna formando ácido polimanurónico, algunos residuos del polímero se acetilan por una acetiltransferasa y se exporta fuera de la célula, algunos residuos no acetilados se epimerizan a ácido gulurónico por la enzima C-5 epimerasa y se produce el alginato (Fig. 4) (Haug & Larsen, 1971; Pindar & Bucke, 1975).

1.4.5. Genética molecular de la biosíntesis de alginato.

En *A. vinelandii* los genes *alg* están organizados en tres operones (Lloret *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 1999), uno de los cuales está constituido únicamente por el gen *algD*. El gen *algD* codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa, una enzima clave en la vía de biosíntesis del alginato. El gen *algD* se transcribe a partir de tres promotores: el primero (P1) es dependiente de σ^E , el segundo (P2) es dependiente de σ^S y el tercero (P3) cuya naturaleza se desconoce (Castañeda *et al.*, 2001).

El operón *algUmucABCD* se caracterizó en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*, en ambos casos sus productos controlan la producción de alginato. *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).

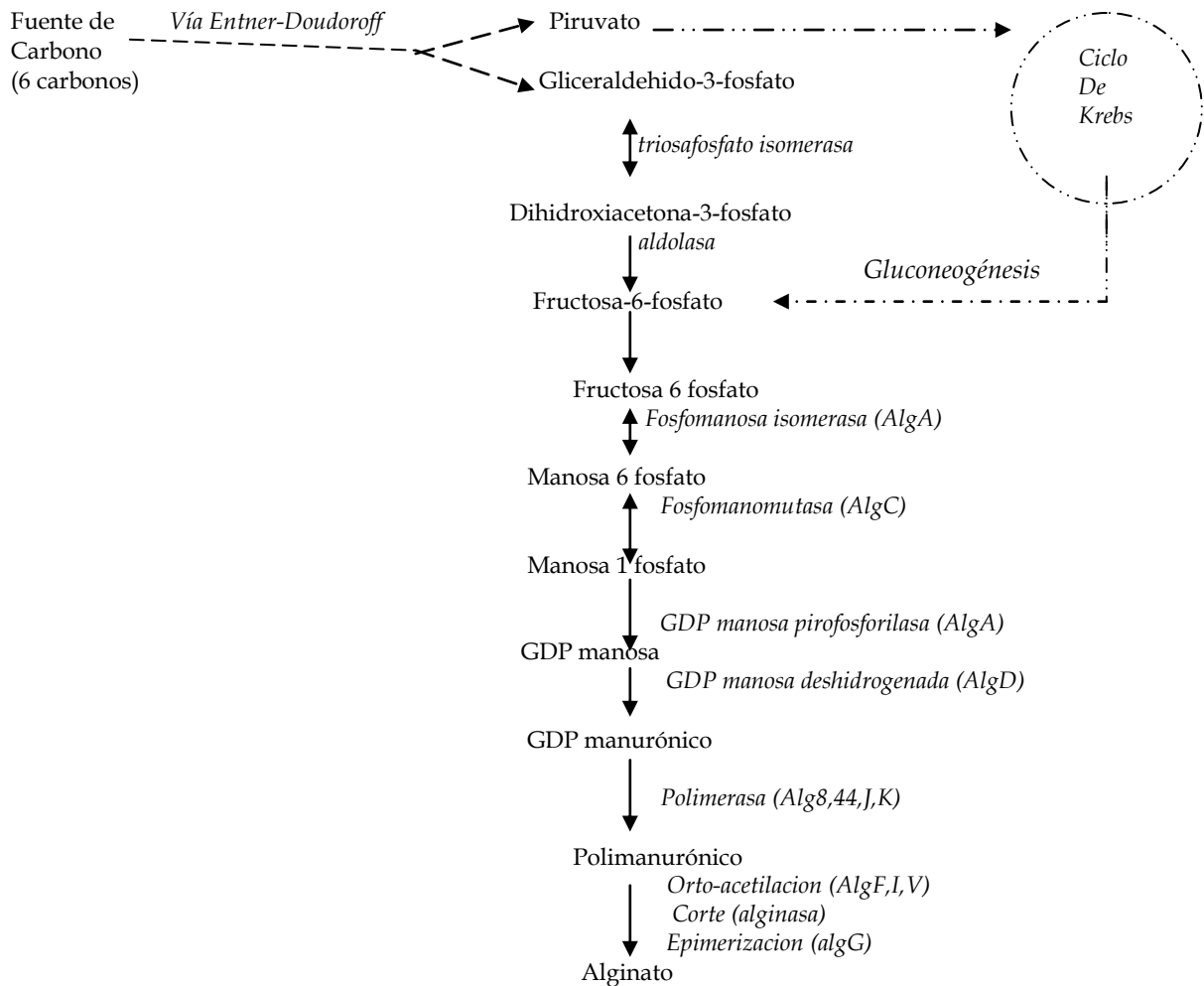


Fig. 4. Ruta biosintética del alginato en *A. vinelandii* (Gacesa, 1998)

1.5. COMPOSICIÓN, APLICACIONES, FUNCION BIOLÓGICA Y BIOSINTESIS DE PHB EN *Azotobacter vinelandii*.

1.5.1. Composición.

El PHB es un homopolímero constituido por monómeros de β -hidroxibutirato, pertenece a la familia de poli-hidroxialcanoatos (PHA's). Por su uso como materia prima alternativa para la fabricación de plásticos biodegradables los PHA's, el estudio de la síntesis de estos polímeros cobró interés durante los últimos años

1.5.2. Aplicaciones

La importancia industrial del PHB radica en su uso como materia prima alternativa para la fabricación de plásticos biodegradables, aunque ha sido poco explotado comercialmente por su alto costo y bajo rendimiento (Steinbuechel & Valentin, 1995). La gran diversidad de PHAs permite obtener plásticos con características que van desde materiales rígidos y quebradizos, hasta productos semejantes al hule que forma un grupo de elastómeros y termoplásticos naturales con propiedades semejantes del

polietileno y propileno obtenidos a partir de una fuente renovable (Steinbuechel & Valentin, 1995).

1.5.3. Función biológica.

Existen reportes de bacterias en las que se ha demostrado que el PHB acumulado puede retardar la degradación de algunos componentes celulares y así aumentar la sobre vivencia del microorganismo bajo condiciones adversas (Anderson & Dawes, 1990).

Otra función que se le ha atribuido al PHB, esta relacionada con la fijación del nitrógeno y la protección de la nitrogenasa que presenta *A. vinelandii* mediante el mecanismo de protección respiratoria, en la que el microorganismo utiliza una velocidad de respiración extremadamente alta para mantener una concentración intracelular de oxígeno baja, proceso que se lleva a cabo a expensas de un alto consumo de carbono y energía fácilmente accesible como el PHB (Senior *et al.*, 1972).

El mayor producto metabólico que se encuentra en el quiste de *A. vinelandii* es el PHB, hay evidencia que sugiere que el PHB podría ser esencial para el proceso de enquistamiento (Reusch & Sadoff 1981), sin embargo, mutantes en los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de PHB muestran que el PHB no es esencial para el proceso de enquistamiento, estas mutantes forman quistes maduros, por lo cual el PHB no juega un papel esencial en la formación y supervivencia del quiste de *A. vinelandii* (Segura *et al.*, 2003).

1.5.4. Biosíntesis de PHB

En la biosíntesis de PHB están involucradas tres actividades enzimáticas (Manchak & Page, 1994). La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA por la enzima β -cetotiolasa para dar aceto-acetyl-CoA. El aceto-acetyl-CoA formado se reduce por la aceto-acetyl-CoA reductasa, utilizando NADPH y produciendo D-(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que finalmente se polimeriza por la actividad de PHB sintasa (Fig. 5)

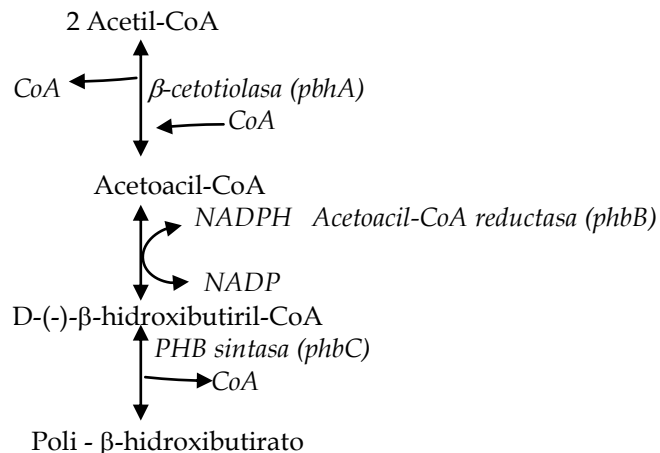


Fig. 5. Biosíntesis del Poli - β -hidroxibutirato en *A. vinelandii* (Manchak & Page, 1994)

1.5.5. Genética molecular de la biosíntesis de PHB.

En *A. vinelandii*, el gene *phbA* codifica para la β -cetotiolasa, el gene *phbB* codifica para la acetoacetyl-CoA y el gene *phbC* codifica para la PHB sintasa (Segura *et al.*, 2003). El gen *phbB* es transcrito a partir de dos promotores que se sobrelapan, p_{B1} y p_{B2} , de los cuales p_{B1} es un promotor más fuerte que p_{B2} , siendo este último un promotor reconocido por σ^S (Peralta *et al.*, 2002). A la fecha se desconoce que tipo de promotor es el p_{B1}

1.6. SISTEMA DE DOBLE COMPONENTE.

El sistema de transducción de señales de dos componentes está ampliamente distribuido en bacterias y en algunos eucariotes, (Brinkman *et al.*, 2001) como es el caso del gene NIK1 de *Candida albicans* y NTR1 de *Arabidopsis thaliana*. (Brinkman *et al.*, 2001).

En bacterias, los sistemas reguladores de dos componentes son el principal mecanismo mediante el cual contienen y responden a cambios o señales del medio ambiente. Estos sistemas están formados por dos proteínas:

1. Primer Componente (Cinasa histidínica). Es una proteína con la capacidad de detectar condiciones o señales de su medio circundante, esta proteína receptora presenta una actividad de cinasa y pertenece a la familia de las cinasas histidínicas.
2. Segundo Componente (Regulador de respuesta). El segundo componente es una proteína reguladora que en la mayoría de los casos es un regulador transcripcional, cuya actividad es controlada por el primer componente. Esta proteína comúnmente es llamada regulador de respuesta.

Bajo una señal específica del sistema, la cinasa histidínica se autofosforila y activa al regulador de respuesta por fosforilación (Fig. 6). Esta proteína, generalmente, es regulador transcripcional que controla la expresión de genes cuyos productos podrán responder a la situación o señal que encendió el sistema. La señal puede ser abiótica (pH, temperatura u osmolaridad) o biótica (densidad de la población) (Heeb & Haas, 2001).

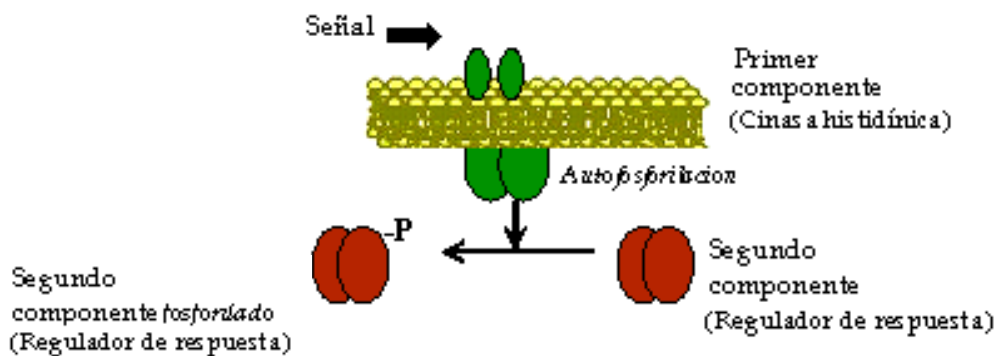


Fig. 6. Modelo del sistema de doble componente

1.6.1. El sistema de doble componente GacS/A

En una amplia variedad de especies bacterianas, GacS/GacA es sistema de doble componente es considerado como un sistema regulador global de metabolismo secundario. En la tabla 1 se muestran algunas características de sistemas Gac ortólogos reportados.

Especie Bacteriana	Cinasa Histidínica	Regulador de Respuesta	Blanco de Regulación	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GacS	GacA	Producción de enzimas líticas y metabolitos secundarios Sist. Quorum -sensing	Reimmann <i>et al.</i> 1997.
<i>P. fluorescens</i>	ApdA	GacA	Producción de antibióticos, HCN y proteasas	Laville <i>et al.</i> , 1992.
<i>P. syringae</i>	LemA		Producción de proteasas y Fitotoxinas	Hrabak, 1992.
<i>P. tolasii</i>	PheN		Producción de proteasas y fitotoxinas	Grewal <i>et al.</i> , 1995.
<i>P. viridiflava</i>	RepA	RepB	Proteasa, peptato liasa y gluco-galacturonidasa.	Liao <i>et al.</i> , 1994.
<i>P. oleovorans</i>	GacS	GacA	Antibióticos, HCN y homoserín-lactonas	Liao <i>et al.</i> , 1994
<i>E. coli</i>	BarA	UvrY	Producción de sideróforos	Nagasawa <i>et al.</i> , 1992
<i>S. typhimurium</i>	BarA	SirA	Expresión de factores de virulencia	Altier <i>et al.</i> , 2000.
<i>Erwinia carotovora subsp. Carotovora</i>	ExpS	GacA	Peptato liasa, pectina liasa, celulasa, protea factores sigma y el sist quorum- sensing	Cui <i>et al.</i> , 2001.
<i>Vibrio cholerae</i>		VarA	Producción de toxina colérica	Wong <i>et al.</i> , 1998.
<i>Azotobacter vinelandii</i>	GacS	GacA	Alginato, PHB	Castañeda <i>et al.</i> 2000.
<i>Salmonella enterica serovar typhimurium</i>	BarA	SirA	virulencia y movilidad	Teplitski <i>et al.</i> , 2003

Tabla 1. Sistema Ortólogos GacS/GacA en bacterias Gram-negativas.

De manera general, se sabe que este sistema controla otros elementos globales de regulación como:

✓ Factor Sigma S (RpoS)

En *Pseudomonas fluorescens* la producción de antibióticos es controlada por GacS/GacA a través del factor σ^S (Whistler *et al.*, 1998). En *A. vinelandii*, GacS/A y σ^S forman parte de una cascada de regulación donde GacA, teniendo como intermediario a σ^S , controla parcialmente la producción de alginato y PHB (Castañeda *et al.*, 2000).

✓ Quorum sensing

En *P. aeruginosa* y *E. carotovora* el sistema GacS/GacA regula la producción de metabolitos secundarios (factores de virulencia) indirectamente controlando el sistema Quorum sensing de la bacteria (Reimann *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 2001).

✓ Sistemas de regulación post-transcripcional RsmA/B (CsrA/B)

En *Erwinia carotovora* la regulación que ejerce el sistema GacS/GacA sobre algunos blancos, la realiza controlando el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmB, particularmente regulando la transcripción del gen *rsmB*. Sin embargo el control transcripcional ejercido por GacS/GacA vía RsmA/RsmB explica el control de sólo una parte de los metabolitos regulados lo que involucraría a otra u otras vías de regulación controladas por GacS/GacA paralelas a la vía RsmA/RsmB.

1.7. SISTEMA DE DOBLE COMPONENTE GacS/GacA EN *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* el sistema GacS/A es un regulador positivo de la síntesis de alginato y PHB (Castañeda *et al.*, 2000). En el caso de la producción de alginatos, este sistema controla específicamente la transcripción del gene *algD* a partir de sus tres promotores. El control transcripcional que GacS/A ejerce sobre el promotor P2 es explicable por la modulación que tiene este par regulador sobre *rpoS*, gen que codifica para el factor σ^S (Castañeda *et al.*, 2001). Sin embargo se desconoce como este sistema regula la transcripción del gen *algD* a partir de los promotores P1 y P3.

Mutantes en el gen *gacA* de *A. vinelandii* tienen completamente abatida la transcripción del gen estructural *phbB* presentando por tanto producción nula de PHB. Como se mencionó anteriormente el gene *phbB* se transcribe a partir de dos promotores siendo el promotor p_{B2} el que es reconocido por el factor σ^S , el cual es regulado por GacA, sin embargo se desconoce cómo el sistema GacS/A controla la transcripción del otro promotor.

También este sistema de doble componente, controla la producción de otros metabolitos secundarios como los sideróforos del tipo de las pioverdinas (azotobactinas) y alquilresorcinoles (datos no publicados).

1.8. SISTEMA DE REGULACION POST-TRANSCRIPCIONAL CsrA/CsrB (RsmA/RsmB).

La regulación de la expresión de un gen se puede ejercer controlando: a) su transcripción (regulación transcripcional), b) el estadio que va desde la generación del mensajero hasta su pegado al ribosoma (regulación post-transcripcional), c) su traducción (regulación traduccional). En *E. coli* el sistema CsrA/B es un mecanismo de control post-transcripcional está constituido de dos componentes: la proteína CsrA y el RNA no codificante CsrB (Romeo, 1998). CsrA es una proteína relacionada estructuralmente con proteínas de unión a RNAm. En *E. coli*, CsrA ejerce un control negativo en la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de glucógeno y gluconeogénesis. Por otra parte, CsrA controla positivamente la glucólisis regulando la expresión de genes que codifican para la isomerasa-6-fosfato, la triosa fosfato isomerasa y la enolasa (Sabnis *et al.*, 1995).

El RNA no codificante (contiene 360 nucleótidos) llamado CsrB, la estructura secundaria de este RNAm presenta varias estructuras de tallo y asa, encontrándose en éstas últimas secuencias repetidas que presentan similitud con secuencias de unión a ribosoma (RBS) (Liu *et al.*, 1997; Romeo, 1998). CsrB es un regulador positivo de genes cuya expresión es reprimida por CsrA.

Existen ortólogos funcionales de *csrB* en otros organismos, estos no presentan identidad significativa a nivel de secuencia nucleotídica, sin embargo las estructuras secundarias de los RNAs codificadas por estos genes son similares y antagonizan el efecto de CsrA (Romeo, 1998).

Se ha propuesto que CsrA se une a los RBS de sus RNAm blanco impidiendo así su traducción y promoviendo su degradación. Por su parte, CsrB secuestra a las moléculas de CsrA, estableciendo interacción con las estructuras de asa que contienen la secuencia repetida similar a los RBS. De esta manera, cuando CsrB secuestra a CsrA, el RNA mensajero queda libre para desarrollar el proceso de traducción (Romeo, 1998).

En *E. carotovora* hay un sistema homólogo al sistema CsrA/B conocido como RsmA/RsmB. De igual forma este sistema es considerado como un regulador metabólico global, donde RsmA ejerce un efecto negativo en la expresión de genes involucrados en la producción de: antibióticos, pigmentos, factores de virulencia, movilidad, síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS), reacciones de hipersensibilidad (HR), mucoidia, mecanismos de señalización involucrados con *Quórum sensing* (Cui *et al.*, 2001).

En *P. fluorescens*, una molécula de RNA, llamada PrrB, homóloga a CsrB, esta involucrada en la regulación de la producción de metabolitos secundarios y exoenzimas (Aarons *et al.*, 2000).

En *P. aeruginosa*, los transcritos RsmA y RsmZ (RsmB) funcionan directamente como reguladores de algunos metabolitos secundarios e indirectamente modulando la producción de otros metabolitos controlando al sistema *Quorum sensing* (Pessi *et al.*, 2001).

En *E. carotovora* y en *P. fluorescens* el sistema GacS/A controla algunos de los genes regulados en paralelo por el sistema RsmA/RsmB. Lo anterior ayudó a determinar que en ambas bacterias los sistemas GacS/A y RsmA/RsmB forman parte de una cascada de regulación (Blumer *et al.*, 1999).

2. ANTECEDENTES

El sistema de traducción de señales GacS/A, está ampliamente distribuido en bacterias, este sistema es un regulador global que controla a otros sistemas, como al sistema de regulación post-transcripcional Rsm. En *E. carotovora* la regulación que ejerce el sistema GacS/A sobre algunos blancos, la realiza controlando el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmB. Lo mismo ocurre en *P. fluorescens* y en *E. coli* (Kazushi *et al.*, 2002).

Los antecedentes descritos despertaron el interés de nuestro grupo en estudiar y caracterizar el sistema RsmA/B de *A. vinelandii*. Los ortólogos CsrA (RsmA) están bastante conservados a nivel de secuencia tanto nucleotídica como de aminoácidos (Romeo, 1998). Usando como patrón de comparación la secuencia del gen *rsmA* de *P. aeruginosa* (Pessi *et al.*, 2001), encontramos en el genoma de *A. vinelandii* (www.azotobacter.org) un marco de lectura abierta que presentó un 85% de identidad con *rsmA* de *P. aeruginosa*. Tal hallazgo nos hizo pensar que en *A. vinelandii* debería existir una molécula funcionalmente homóloga a CsrB (RsmB).

A diferencia de *rsmA/csrA*, los ortólogos *csrB* (*rsmB*) no presentan identidades significativas a nivel de secuencia nucleotídica. Sin embargo, las estructuras secundarias de las moléculas de RNA generadas por su transcripción resultan ser muy parecidas (Romeo, 1998). Con las consideraciones anteriores, tomando como patrón de comparación al gene homólogo *rsmB* de *P. fluorescens* (*prdB*) (Aarons *et al.*, 2000) se realizó la búsqueda de un gen homólogo en la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, encontrando una región que presentó solo 47% de identidad con *prdB*. Analizando detenidamente la secuencia identificamos también un promotor putativo similar al promotor reportado en *P. fluorescens*. Mediante el programa MFOLD (Zuker *et al.*, 1991) se predijo la estructura secundaria del RNA codificado por nuestro gen putativo y se observaron estructuras de tallo y asa similares a las de *prdB*.

Los genes putativos *rsmA* y *rsmB*, en conjunto con sus probables regiones reguladoras, se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector de amplio rango de hospedero pJB3Tc20 (Blatny *et al.*, 1997), generando los plásmidos pJB*rsmA* y pJB*rsmB* respectivamente (Martínez Ortiz, 2004 & Martínez Nuñez, 2004). Cuando se introdujo el plásmido pJB*rsmA* a una cepa silvestre de *A. vinelandii* se observó que *rsmA* reprimía la síntesis de alginato, hecho que concuerda con la naturaleza represora que se ha reportado en ortólogos RsmA en *E. coli*, *E. carotovora*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (Romeo, 1998; Cui *et al.*, 1995; Aarons *et al.*, 2000; Pessi *et al.*, 2001).

La sobre-expresión de *rsmB* en mutantes *gacA* restaura la producción de alginato y PHB, lo cual indica que posiblemente parte de la regulación que GacA ejerce sobre la síntesis de alginato se da por el control que ejerce sobre *rsmB*, un fenómeno de regulación similar se reportó en *P. fluorescens*, donde la sobreexpresión de *prdB* (*rsmB*) restaura fenotipos afectados por la mutación del gen *gacA* (Aarons *et al.*, 2000). En *A. vinelandii*, para probar el efecto regulador de GacA sobre *rsmB* se construyó una fusión transcripcional *rsmB-gusA* (*gusA* gen reportero que codifica para la β -glucuronidasa) en el plásmido pJB3Tc20 (Blatny *et al.*, 1997), la fusión transcripcional se transfirió a una

mutante *gacA* y su cepa padre encontrando que GacA es necesario para establecer una transcripción eficiente de *rsmB*. Los resultados anteriores fueron validados mediante experimentos de hibridación tipo Northern, en los que se evidenció la ausencia del transcrito de *rsmB* en la mutante *gacA* (Martínez-Ortiz, 2004).

Un punto importante en el estudio del sistema RsmA/B, es la generación de mutantes *rsmA* y *rsmB*, para tal efecto se amplificaron por PCR fragmentos de ADN de 2 kb que contienen en su parte central a *rsmA* y *rsmB*, ambos fragmentos se clonaron individualmente en pUC19 y mediante PCR inverso (Heeb *et al.*, 2002) se escindieron tanto a *rsmA* como a *rsmB* generando a su vez sitios de restricción únicos donde posteriormente se clonó el casete Ω Km (Alexeyev *et al.*, 1995). El plásmido generado pUC*rsmA*:: Ω Km se está utilizando para generar por doble recombinación homóloga la mutante AE IV *rsmA*; en cuanto el plásmido pUC*rsmB*:: Ω Km se usó para la generación de la mutante AE IV *rsmB*::Km. La mutante AE IV *rsmB*::Km, presenta un fenotipo menos mucoso en comparación con la silvestre. Al observar este fenómeno. Se cuantificó la producción de alginato en dicha mutante, encontrando que produce solo un 30% de alginato en comparación con la cepa silvestre (Bustillos, 2004).

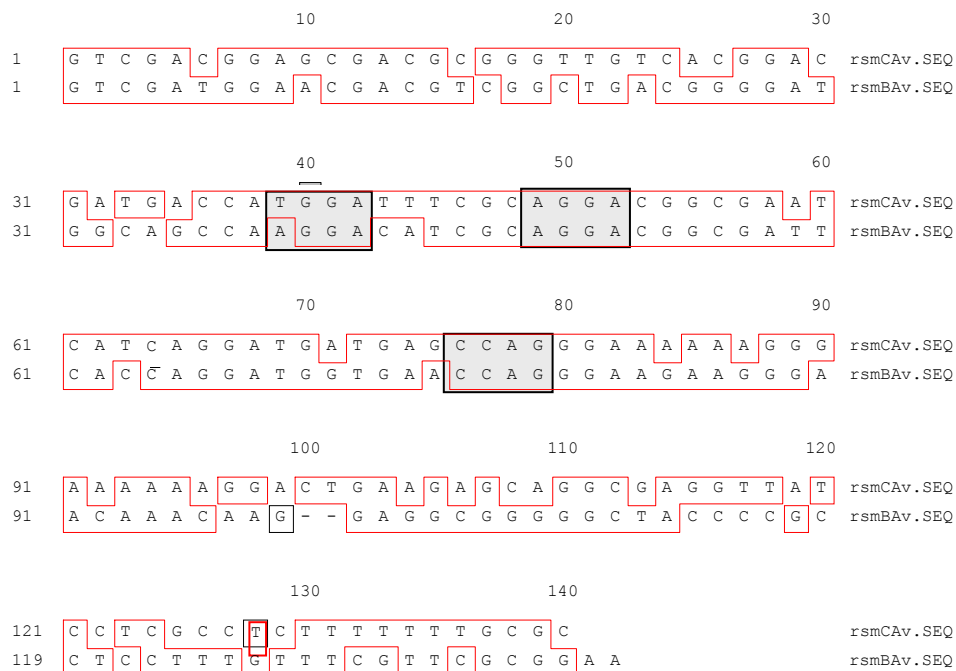
También se construyó una fusión transcripcional *rsmB*::*gusA* a nivel cromosomal (AE IV *rsmB*::*gusA*), esta cepa se utilizó para estudiar la expresión del gen *rsmB* bajo diferentes condiciones de crecimiento, observándose mayor expresión del gen *rsmB* bajo condiciones de crecimiento diazotrófico, en comparación con el crecimiento no diazotrófico. De igual forma se encontró que *rsmB* presenta una mayor expresión cuando la bacteria crece en fuentes de carbono gluconeogénicas (succinato y malato) (Bustillos, 2004).

En 2003 se reportó en *E. coli* un gen homólogo a *csrB*, este gen llamado *csrC*, funciona de manera similar a *csrB* formando parte también del sistema Csr (Weilbacher *et al.*, 2003). De manera similar en *P. fluorescens* un gen homólogo a *rsmZ* (un homólogo a *rsmB*, también llamado *prbB*), gen llamado *rsmY*, en este reporte se ubica a este elemento como parte del sistema Rsm, en donde se indicó que RsmY funciona de manera similar a RsmZ (PrrB o RsmB) (Valverde *et al.*, 2003). Como se mencionó los genes que codifican para el elemento RNA regulador de los sistemas Rsm o Csr están poco conservados, sin embargo, los RNA codificados presentan estructuras secundarias características con varios tallos y asas. Por la cercanía filogenética entre *A. vinelandii* y *P. fluorescens* se buscó en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* un presunto homólogo a RsmY. La búsqueda fue infructuosa, sin embargo, al utilizar como patrón de comparación el gen *rsmB* de *A. vinelandii* encontramos un posible homólogo en un *locus* distinto en el que se encontró el gen *rsmB* presentando un 61% de identidad a nivel de secuencia nucleotídica. A este presunto gen se le llamó *rsmC*. De forma interesante, las regiones reguladoras putativas de ambos genes se encuentran bastante conservadas, difiriendo únicamente por una base, encontrando el mismo hecho en regiones ricas en A y T de la región reguladora (Fig. 7).

En 2005 en *P. fluorescens* CHAO se encontró una proteína homóloga a RsmA, la cual la llamaron RsmE; y ésta también es secuestrada por RsmZ y RsmY, formando el

sistema RsmA/E/Z/Y (Reimann *et al.*, 2005). Se buscó en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* un presunto homólogo a RsmE, tomando como patrón de comparación el RsmE de *P. fluorescens* CHAO, y no se encontró dicha proteína, por lo cual *A. vinelandii* solo tiene una proteína RsmA y no tiene una proteína homóloga a RsmE.

A



B

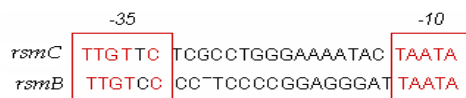


Fig. 7. A. Alineamiento entre *rsmB* y *rsmC* en *Azotobacter vinelandii*. B. Región promotora putativa.

3. HIPOTESIS

En *A. vinelandii* existe un sistema de regulación post-transcripcional constituido por los elementos RsmA, RsmB y RsmC, el cual esta involucrado en la regulación de la biosíntesis de polímeros.

4. JUSTIFICACION

La cascada de regulación GacS/A-RsmA/B/C parece ser una vía común de regulación metabólica, cuando menos en bacterias de la subdivisión γ . El conocimiento generado en este proyecto podría impactar en al menos dos rubros: particularmente, en mejorar el conocimiento que se tiene de la producción de biopolímeros de interés comercial que produce *A. vinelandii*; y de manera general, se generaría conocimiento para contribuir en el estudio de esta cascada de regulación global bacteriana.

5. OBJETIVOS

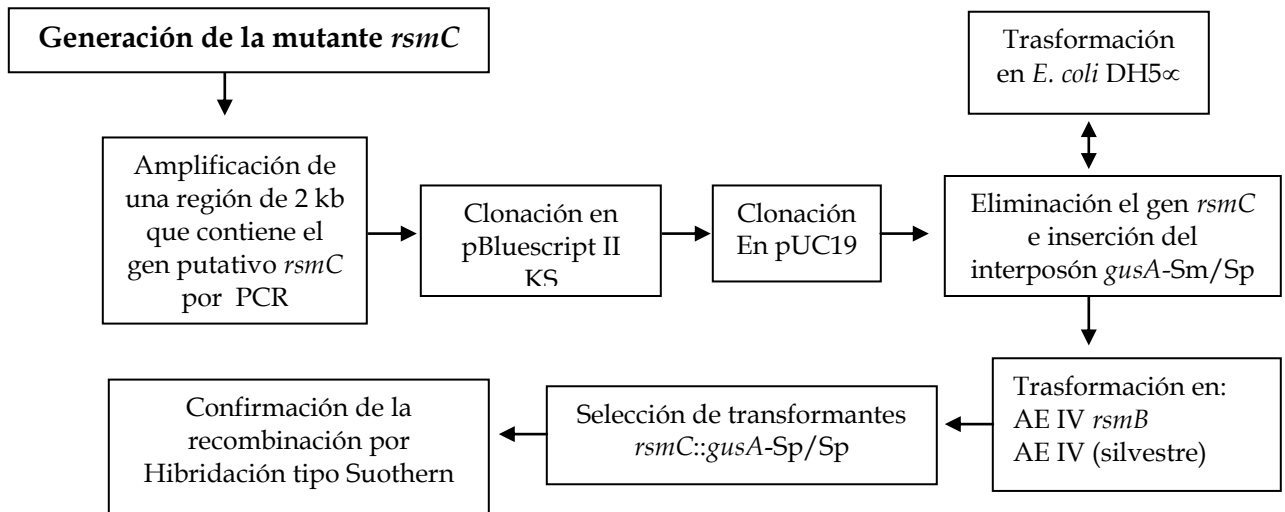
5.1. OBJETIVO GENERAL.

- ✓ Estudiar el sistema de regulación post-transcripcional Rsm en *A. vinelandii*

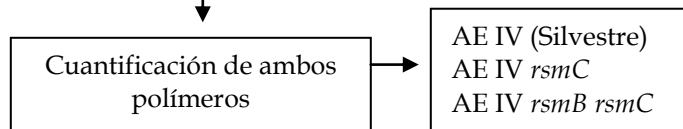
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Generar mutantes AE IV *rsmC::gusA-Sm/Sp* y AE IV *rsmB rsmC::gusA-Sm/Sp*.
2. Determinar si RsmC controla la biosíntesis de alginato y/o PHB.
3. Establecer si RsmC controla diferencialmente la producción de alginato en función de la fuente de carbono.
4. Determinar si RsmC controla diferencialmente la producción de alginato y PHB en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno.
5. Analizar la expresión de *rsmC* en condiciones diazotróficas y no diazotróficas; así como en diferentes fuentes de carbono.
6. Sobre-expresar el gen *rsmC* en la mutante AE IV *gacA*.

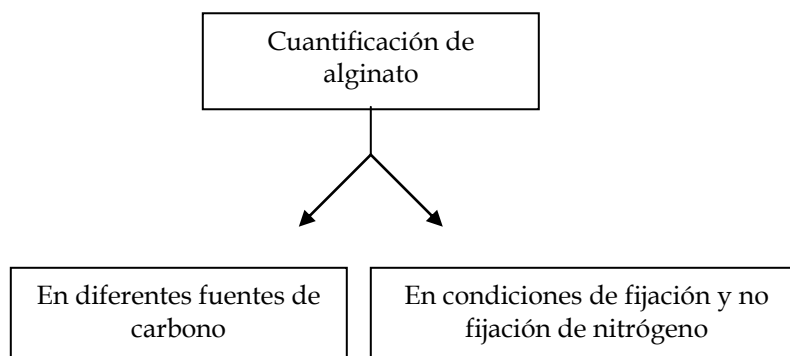
6. DIAGRAMA DE TRABAJO

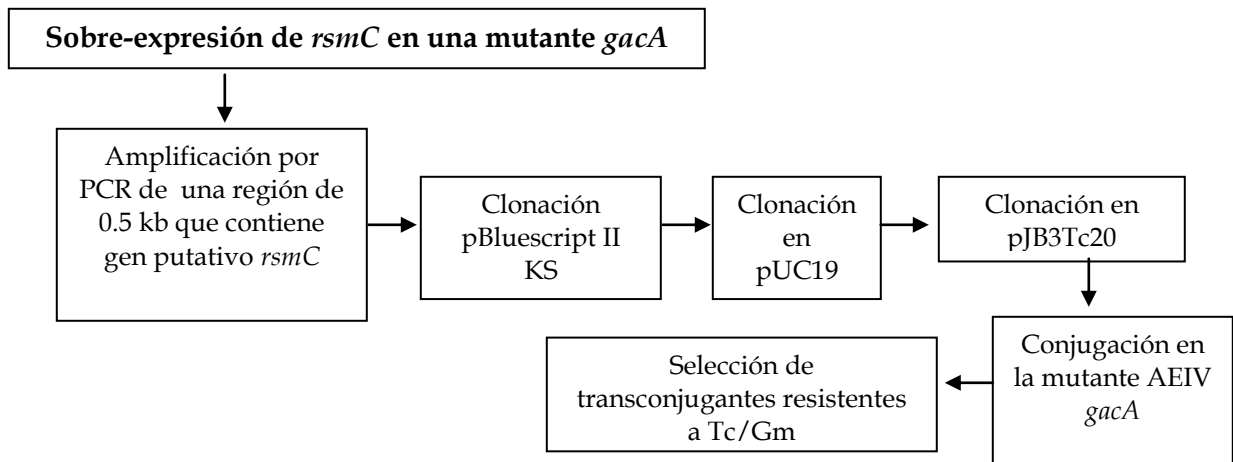
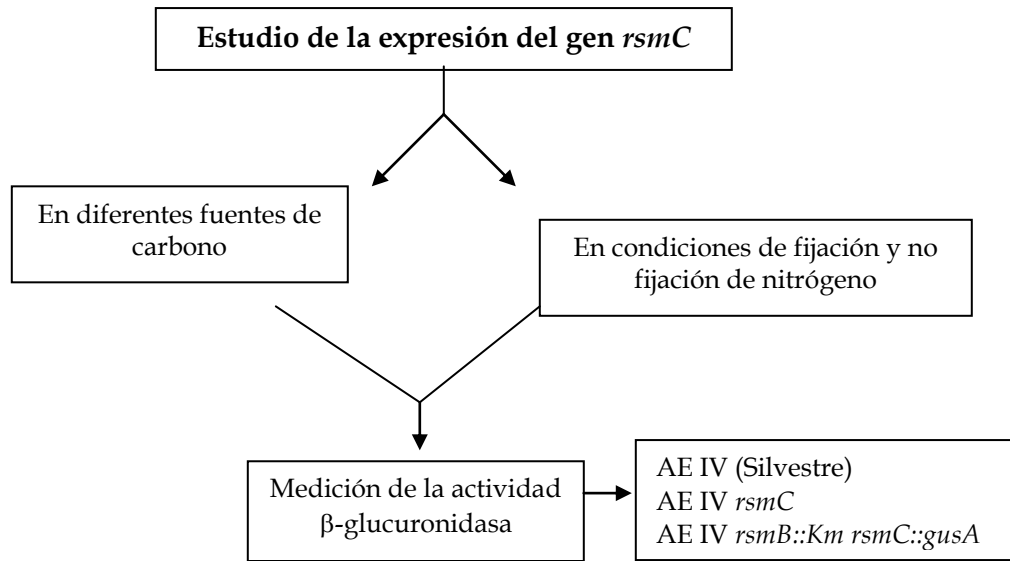


Establecimiento de la relación RsmC -biosíntesis de alginato y PHB



Caracterización de la producción de polímeros en la mutante *rsmC*





7. RESULTADOS

7.1 Construcción de la mutante AEIV *rsmC::gusA-Sm/Sp*.

Para la generación de las mutantes AE IV *rsmC* y AE IV *rsmBC* se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contiene el gen putativo y aproximadamente 1000 pb rió arriba y 1000 pb rió abajo del gen *rsmC* putativo (Fig. 8A), en concordancia con lo anterior se diseñaron primeros (RSMC3 y RSMC4) ubicados en los sitios apropiados. La amplificación se realizó con *Vent DNA Pol* (NEB), generando productos de extremos romos, el producto se ligó en el plásmido pBluescript II KS digerido con *Sma* I, al plásmido se le llamo pBC218. Posteriormente, el fragmento clonado se liberó del vector mediante cortes *Hind* III y *Bam* HI (Fig. 8B) y se clonó en pUC19, lo anterior se hizo con la finalidad de eliminar la secuencia *Sal* I del sitio de multiclonación del vector pUC19, generando el plásmido pUC21/23 (Fig. 8C).

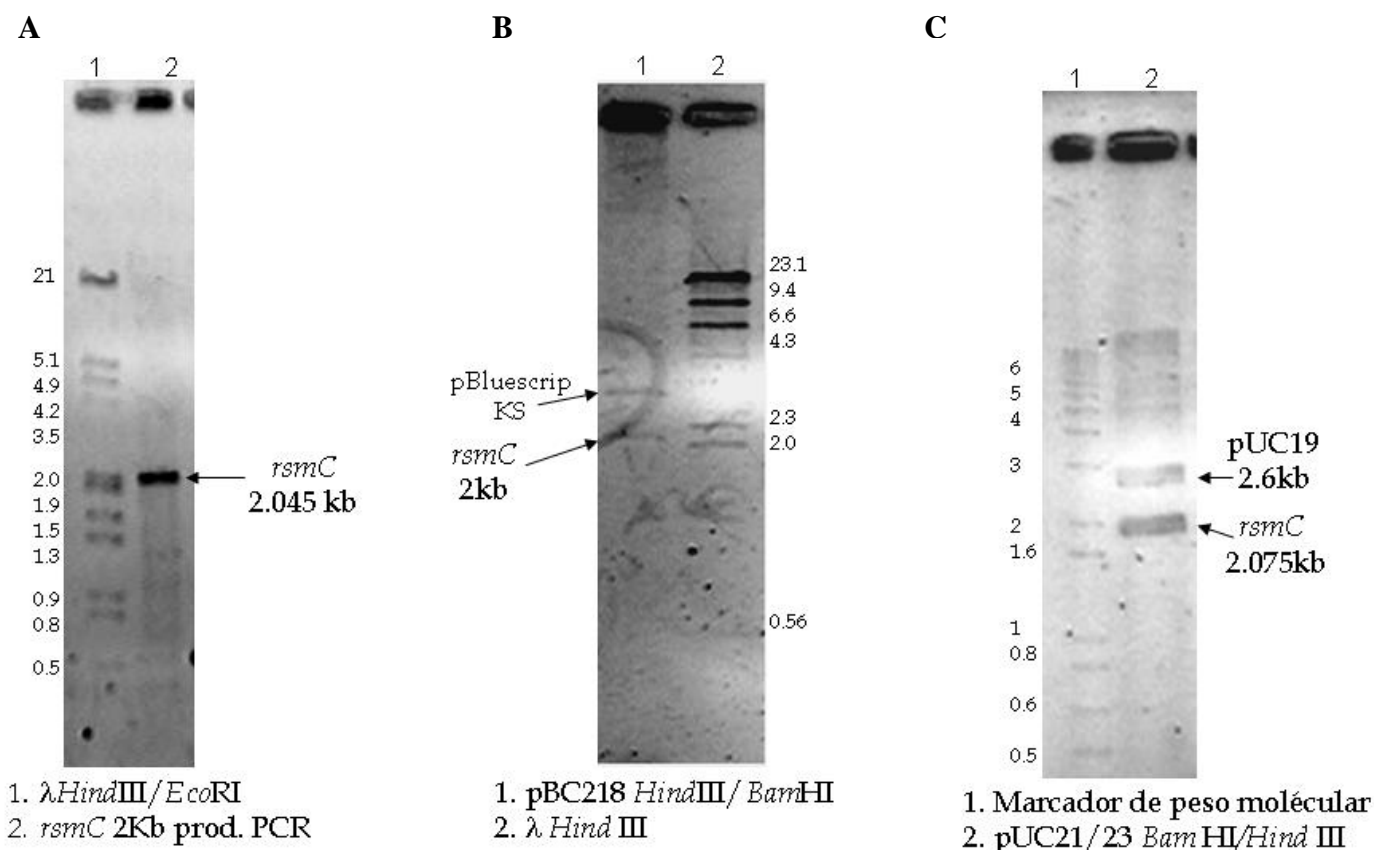


Fig. 8. A. Amplificación por PCR de un fragmento de 2 kb que contiene al gen *rsmC*. B. Patrón de restricción del plásmido pBC218 con sitios de corte *Hind* III y *Bam* HI. C. Patrón de restricción del plásmido pUC21/23 con sitios de corte *Hind* III y *Bam* HI.

El gen *rsmC* se escindió sin su región reguladora del plásmido pUC21/23 mediante cortes con la enzima *Sal* I, y se ligó en su lugar el cartucho *gusA-Sm/Sp* obtenido del plásmido pMPO1 (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Al plásmido generado se le llamó

pUCgA233/234, la construcción fue verificada por patrón de restricción con la enzima *Bam* HI (Fig. 9) y posteriormente se utilizó en la transformación de las cepas AE IV y AE IV*rsmB::km*. El plásmido pUCgA233/234 no es un plásmido de amplio rango de hospedero, por lo cual no puede replicarse en *A. vinelandii*. La única posibilidad de mantener la resistencia a Estreptomicina (Sm) estaría mediada por la integración del gen de resistencia en el cromosoma silvestre. Este evento se establece a través de un proceso de doble recombinación homóloga, intercambiando el locus *rsmC* por el locus *rsmC::gusA-Sm/Sp*.

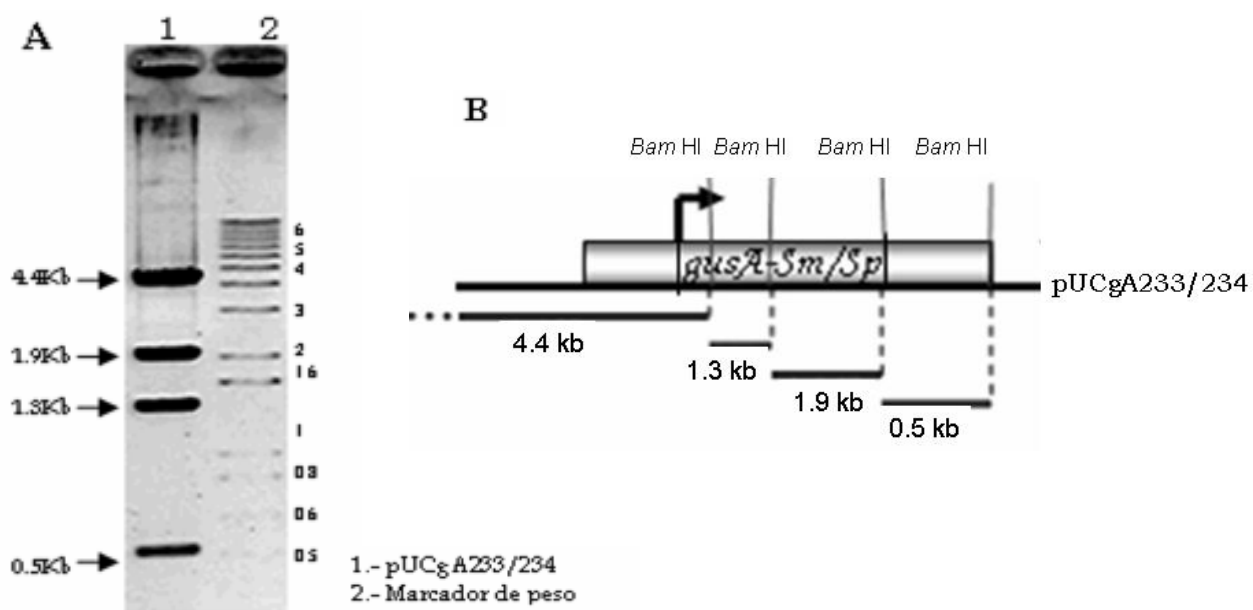


Fig. 9.A. Patrón de restricción con sitios de corte *Bam* HI, carril 1 pUCgA233/234, carril 2 marcador de peso molecular. B. Esquema del patrón de restricción con *Bam* HI del plásmido pUCgA233/234 para generar la fusión transcripcional *rsmC::gusA-Sm/Sp*.

Para la amplificación del gen *rsmC* se diseñaron oligonucleótidos y se usó como templado ADN de la cepa UW 136, una cepa rifampicina resistente derivada de la cepa tipo OP (Bishop & Brill, 1977). La cepa OP fue la cepa cuyo genoma se secuenció en el 2003, esta cepa no produce alginato debido a una mutación que porta el gen *algU*, esencial para la síntesis del alginato. Por lo anterior, esta cepa no es la más adecuada para realizar estudios sobre la producción de alginato. La cepa que se utilizó en este trabajo fue la cepa silvestre AE IV, por lo que en primera instancia fue de vital importancia demostrar la presencia del gen *rsmC* en ésta y otras cepas mucoides, como la cepa ATCC 9046, de *A. vinelandii*.

Lo anterior se probó mediante una hibridación tipo Southern, utilizando una sonda de 0.2 kb donde solo se encuentra la parte estructural del gen *rsmC*. Se observó un patrón de hibridación idéntico en ambas cepas (Fig. 10).

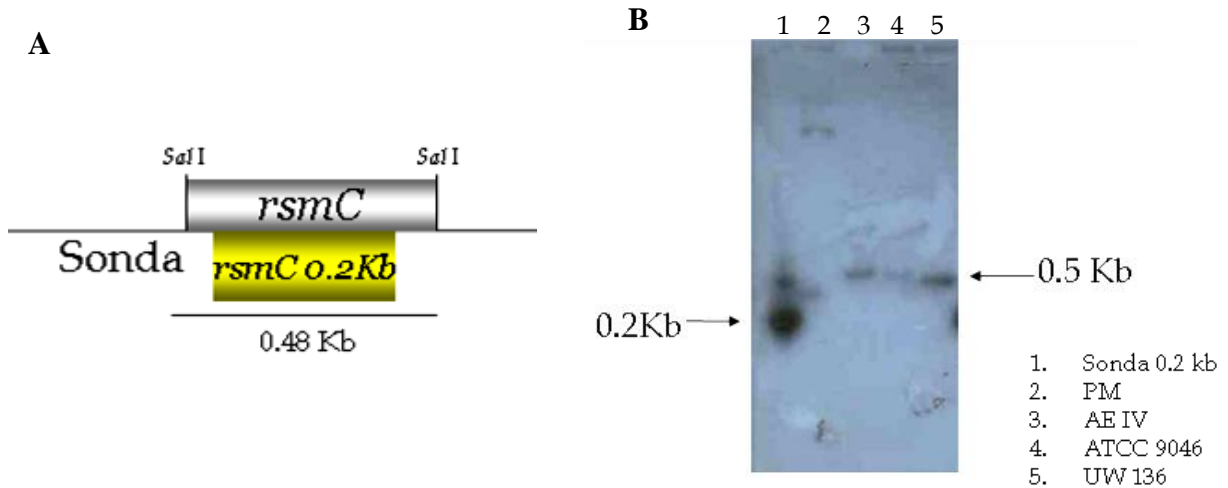


Fig. 10. **A.** Mapa físico de la región de *rsmC* digerido con *Sal I*, hibridado con una sonda de *rsmC* 0.2 kb **B.** Autoradiografía de DNA digerido con *Sal I*. Carril 1, sonda *rsmC* 0.2 kb. Carril 2, marcador de peso molecular. Carril 3, cepa AE IV. Carril 4, cepa ATCC 9046. Carril 5, cepa UW136.

Para corroborar lo anterior se realizó otra hibridación tipo Southern ahora usando como sonda un fragmento de 0.5 kb que contiene al gen *rsmC* y su región reguladora putativa. El patrón de hibridación esperado es de dos fragmentos, uno de 1.5 kb y el otro de 0.5 kb ya que al inicio de la región reguladora del gen *rsmC* existe un sitio *Sal I* que parte a éste en dos fragmentos, lo cual se observa en la Fig. 11.

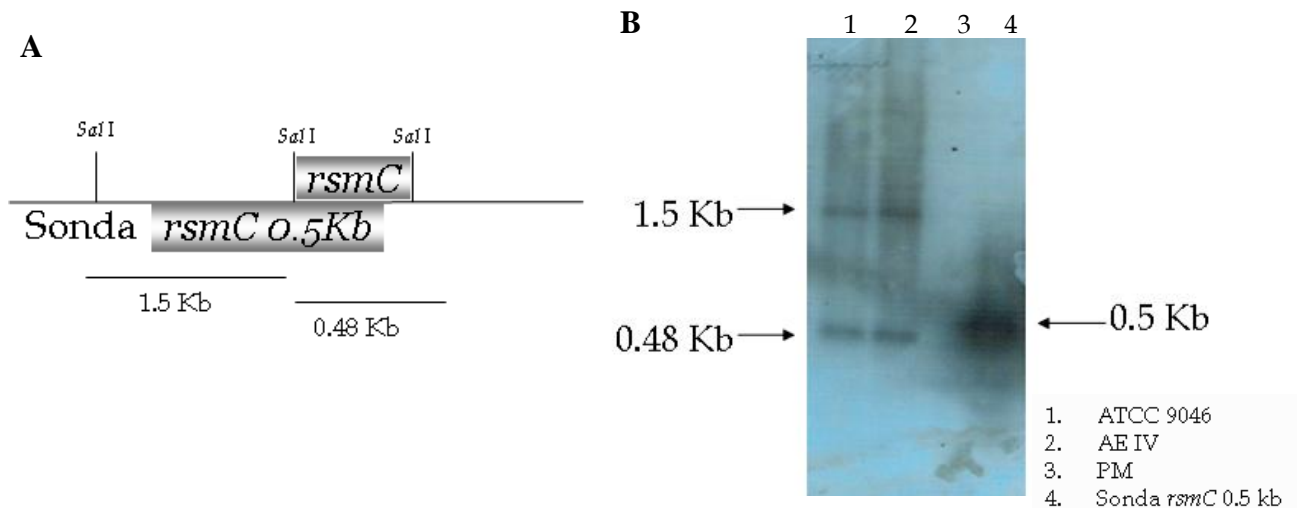


Fig. 11. **A.** Mapa físico de la region *rsmC* digerido con *Sal I*, hibridado con una sonda de *rsmC* 0.5 kb **B.** Autoradiografía de DNA digerido con *Sal I*. Carril 1, cepa ATCC 9046. Carril 2, cepa AE IV. Carril 3, marcador de peso molecular. Carril 4, sonda *rsmC* 0.5 kb.

De acuerdo a la hibridación tipo Southern realizada se demostró que el gen *rsmC* se encuentra en las cepas probadas, y que además el gen se encuentra localizado en los mismos sitios de corte *Sal* I.

Una vez obtenidas las transformantes resistentes a Estreptomicina (Sm) y Espectinomycin (Sp), se verificó la integración del cartucho *gusA-Sm/Sp* en el cromosoma de las probables mutantes. Se realizó un experimento de hibridación tipo southern, el DNA cromosomal se digirió con la enzima *Sal* I y se hibridó contra una sonda de 0.5 kb, que contiene el gen *rsmC* y su región reguladora putativa. El patrón de hibridación esperado es el siguiente: en la cepa AE IV (silvestre) se espera la hibridación de dos fragmentos, uno de 1.5 kb y el otro de 0.5 kb (Fig 12C, carril 1). En la mutante, donde se sustituyó el gen *rsmC* por el cartucho *gusA-Sm/Sp*, la sonda solo reconoce a un fragmento de 1.5 kb, el otro fragmento de 0.5 kb no es reconocido ya que en ese fragmento se encontraba el gen *rsmC* que ahora esta sustituido por el cartucho *gusA-Sm/Sp* (Fig. 12C, carril 11 mutante AE IV *rsmC*::*gusA-Sm/Sp* y carril 13 mutante AE IV *rsmB*::*km rsmC*::*gusA-Sm/Sp*).

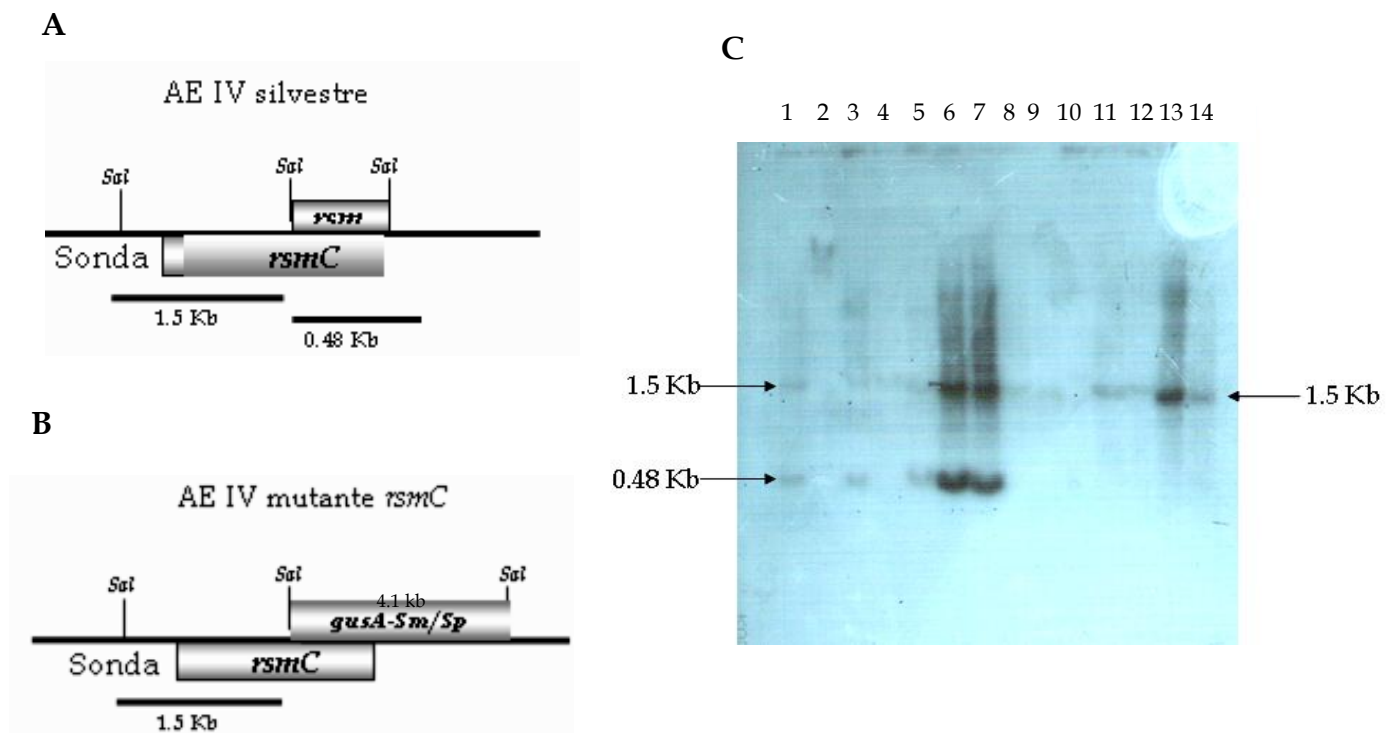


Fig. 12. **A.** Mapa físico de la region de *rsmC* digerido con *Sal*I. **B.** Mapa físico de un fragmento de restricción con *Sal*I que contiene la remoción del gen *rsmC* e inserción del cassette *gusA-Sm/Sp*. **C.** Auto radiografía de DNA digerido con *Sal* I. Carril 1, cepa AE IV. Carril 11, cepa AE IV *rsmC*::*gusA-Sm/Sp*. Carril 13, cepa AE IV *rsmB*::*Km rsmC*::*gusA-Sm/Sp*.

También las probables mutantes se verificaron empleando el DNA digerido con *Pst* I. En la cepa AE IV se espera la hibridación de un fragmento de 1.8 kb (Fig. 13C, carril 1), y en las cepas mutantes AE IV *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp y AE IV *rsmB*::Km *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp la sonda reconoce a un fragmento de 5.4 kb (Fig. 13C, carril 3 y 4 respectivamente).

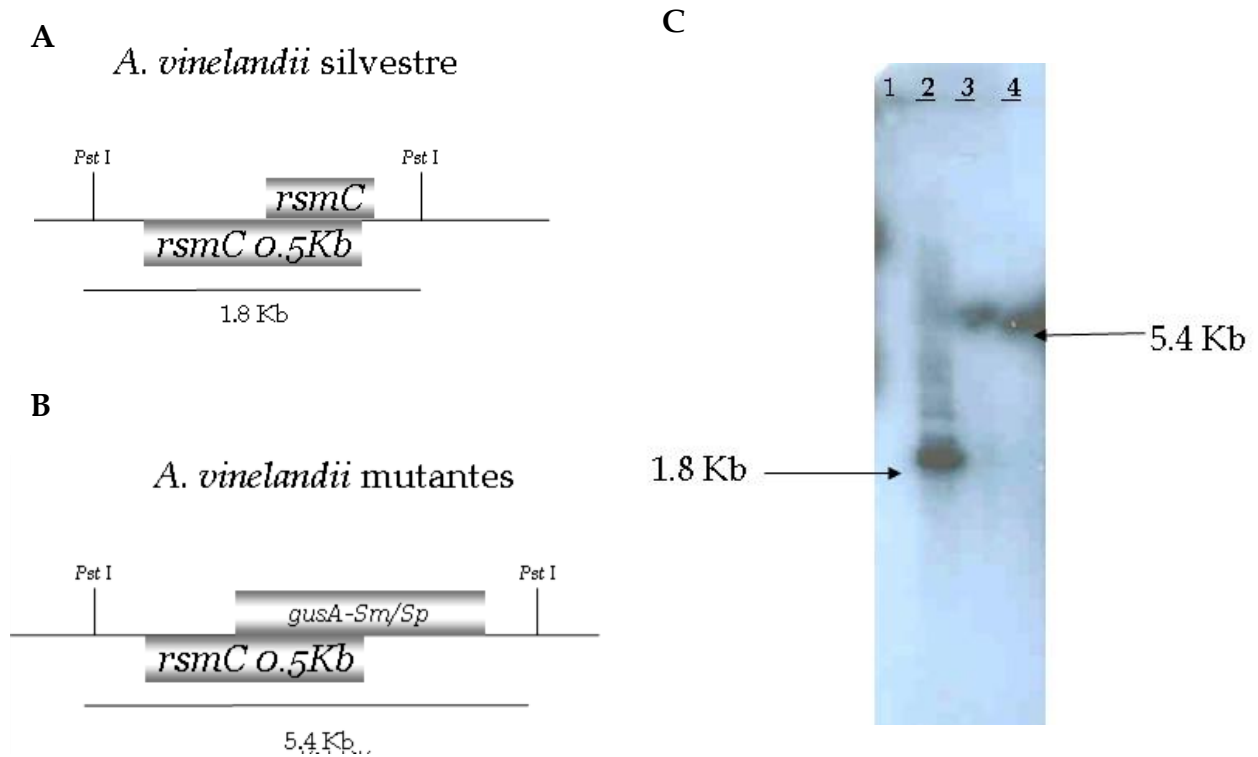


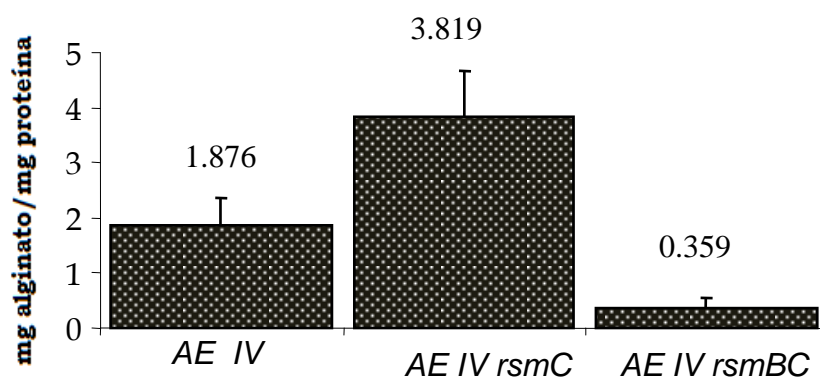
Fig. 13. **A.** Mapa físico de la region *rsmC* digerido con *Pst* I que contiene al gen *rsmC*. **B.** Mapa físico de un fragmento de restricción con *Pst* I que contiene la remoción del gen *rsmC* e inserción del cartucho *gusA*-Sm/Sp. **C.** Autoradiografía de DNA digerido con *Pst* I. Carril 1, marcador de peso molecular, Carril 2, cepa AE IV silvestre. Carril 3, cepa AE IV *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp. Carril 4, cepa AE IV *rsmB*::km *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp

7.2. Cuantificación de alginato y PHB en la AE IV silvestre, AE IV *rsmC* y AE IV *rsmBC*

7.2.1. Cuantificación de la producción de alginato

Para determinar si RsmC estaba relacionado con la síntesis de alginatos, se cuantificó la producción del polímero en las cepas AE IV silvestre, AE IV *rsmC*::*gusA*-Sm/SP y AE IV *rsmB*::km *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp, determinando que la mutante *rsmC* produce una mayor cantidad de alginato que la cepa silvestre, y en la doble mutante *rsmBC* la producción de alginato disminuyó un 70% (Fig. 14).

Cuantificación de Alginato



Cepa	mg alginato/mg proteína
AE IV	1.875 ± 0.477
AE IV rsmC	3.819 ± 0.855
AE IV rsmBC	0.359 ± 0.187

Fig 14. Cuantificación de alginato en las cepas de *A. vinelandii* AE IV, AE IV *rsmC::gusA-Sm/Sp* y AE IV *rsmB::km rsmC::gusA-Sm/Sp*, crecidas en medio Burk sacarosa (BS) en condiciones de fijación de nitrógeno.

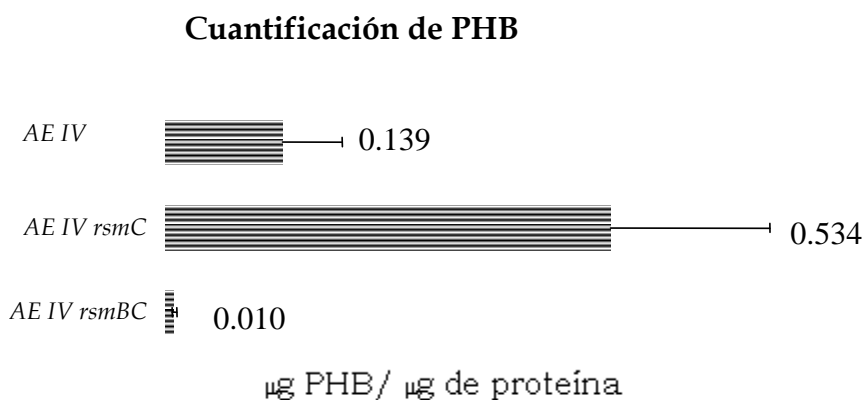
7.2.2 Cuantificación de la producción de PHB

Dentro de los objetivos, estaba determinar si *rsmC* se encontraba involucrado en la producción de PHB, por lo cual se cuantificó este poli-éster en las cepas AE IV, AE IV *rsmC::gusA-Sm/SP* y AE IV *rsmB::km rsmC::gusA-Sm/Sp*. Se cuantificó que la mutante *rsmC* produce una mayor cantidad de PHB que la cepa silvestre, en tanto la mutante doble *rsmBC* produjo menos polímero que la silvestre (Fig. 15).

7.3. Cuantificación de alginato en diferentes fuentes de carbono

En *E. coli*, el sistema CsrABC controla el metabolismo de carbono, donde la proteína CsrA actúa post-transcripcionalmente para balancear la glucólisis y la gluconeogénesis (Pernestig *et al.* 2003). En la generación de la fructosa-6-fosfato, el sustrato inicial de la biosíntesis de alginato, en *A. vinelandii* se encuentran involucradas las enzimas: triosa fosfato isomerasa, aldolasa y fructosa 1-6 bifosfatasa. En *E. coli* estas enzimas se encuentran reguladas por el sistema CsrABC. Por lo anterior es posible que RsmC se encuentre involucrado en el control de los flujos de carbono que generan la fructosa-6-fosfato. Si lo anterior fuera cierto, se podría observar una producción diferencial de alginatos en la mutante *rsmC* cuando crece en fuentes de carbono distintas. Para probar lo anterior se cuantificó el expolisacárido en fuentes de carbono,

glucolítico (glucosa y fructosa) y gluconeogénico (succinato). Los resultados muestran que la producción de alginato en la mutante AE IV *rsmC* en una fuente de carbono gluconeogénico (succinato) es mayor en comparación con la cepa silvestre (Fig. 16).



Cepa	µg PHB/µg proteína
AE IV	0.139±0.073
AE IV <i>rsmC</i>	0.534±0.191
AE IV <i>rsmBC</i>	0.010±0.003

Fig 15. Cuantificación de PHB en las cepas de *A. vinelandii* AE IV, AE IV *rsmC::gusA-Sm/Sp* y AE IV *rsmBC::km rsmC::gusA-Sm/Sp*, crecidas en medio BS en condiciones de fijación de nitrógeno.

7.4. Cuantificación de alginato y PHB en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno

Bustillos (2005), estudio la expresión del gen *rsmB* en *A. vinelandii*, y observó que en condiciones de fijación de nitrógeno *rsmB* se expresa más que en condiciones de no fijación de nitrógeno. Con la finalidad de establecer si la regulación que ejerce RsmC en la producción de alginato y PHB estaba influenciada por la diazotrofia, se cuantificó la producción de alginato y PHB en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno. La mutante AE IV *rsmC* en condiciones de no fijación de nitrógeno, produce 6.007 ± 1.142 mg alginato/mg proteína, 4.8 veces más alginato que la silvestre (Fig. 17).

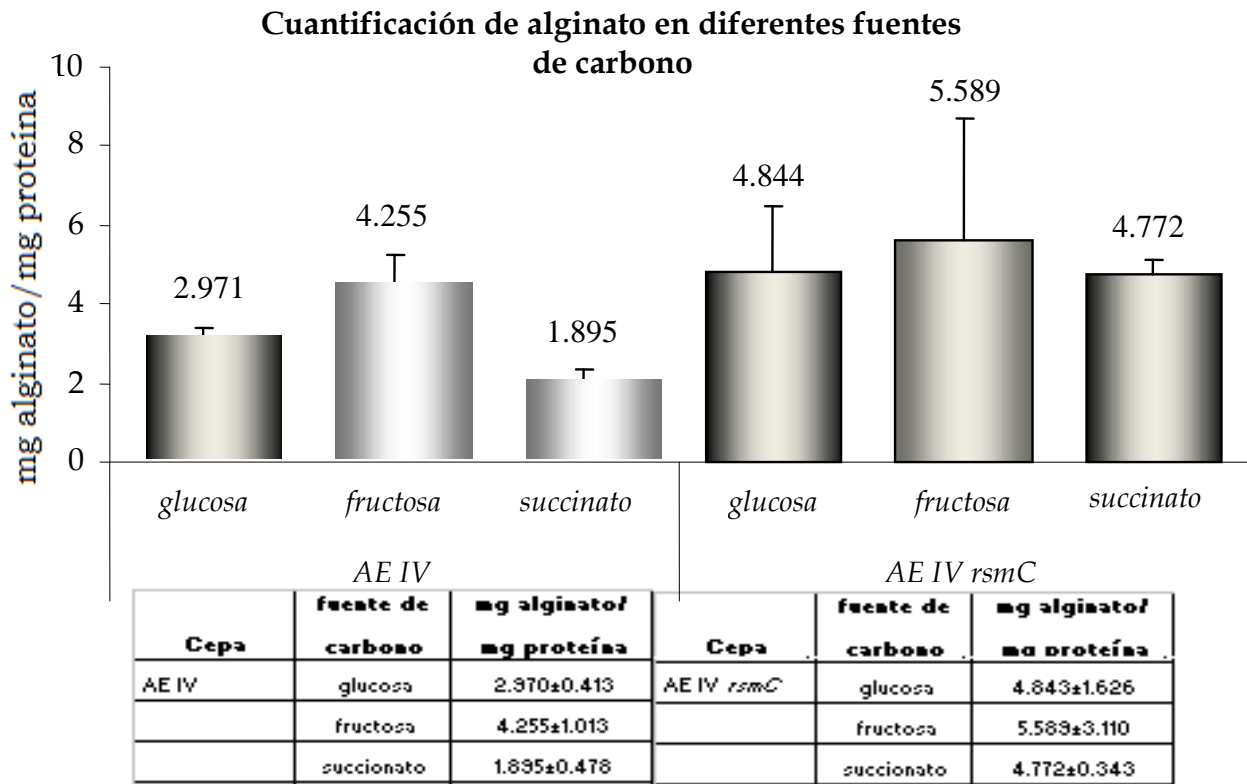


Fig. 16. Cuantificación de alginato *A. vinelandii* AE IV y AE IV *rsmC::gusA-Sm/Sp*, crecidas en medio Burk con diferentes fuentes de carbono, en condiciones de fijación de nitrógeno

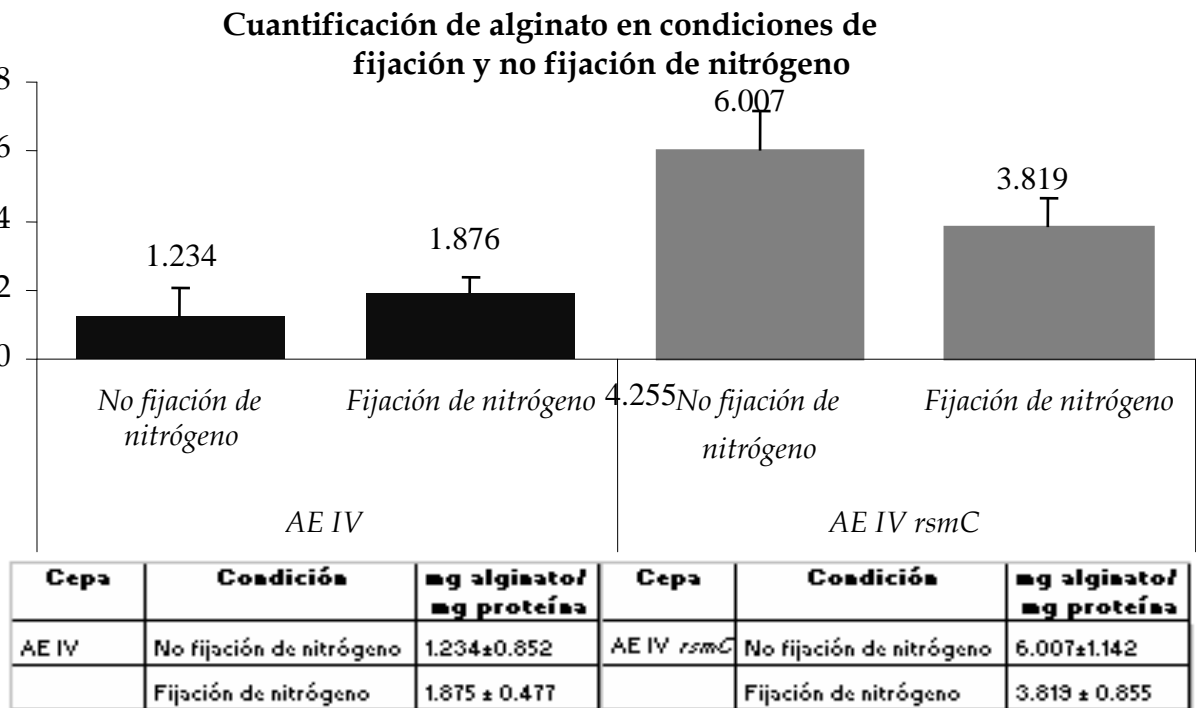
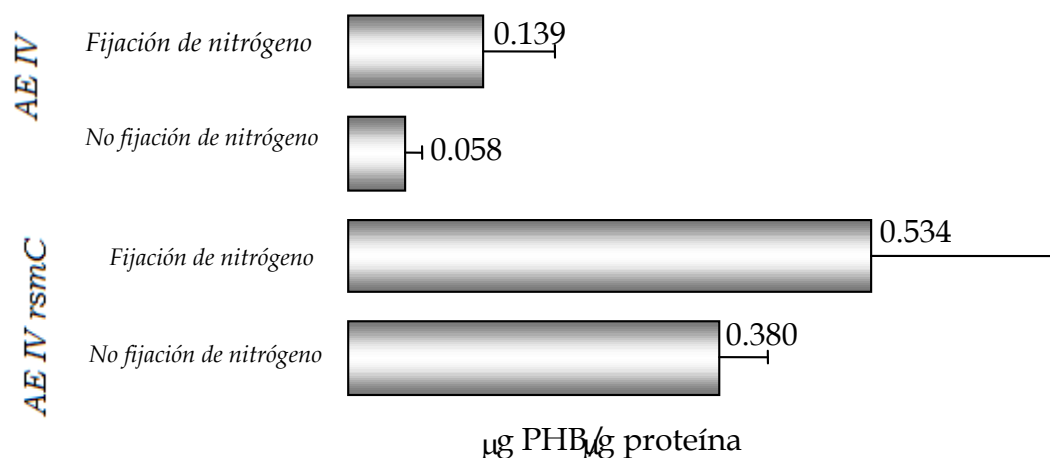


Fig. 17. Cuantificación de alginato en las cepas de *A. vinelandii* AE IV y AE IV *rsmC::gusA-Sm/Sp*, crecidas en medio BS en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno.

También se determinó la producción de PHB, en condiciones de fijación de nitrógeno la AE IV produce $0.139 \pm 0.073 \mu\text{g PHB}/\mu\text{g proteína}$, en tanto la mutante *rsmC* produce una mayor cantidad de PHB ($0.534 \pm 0.191 \mu\text{g PHB}/\mu\text{g proteína}$). En condiciones de no fijación de nitrógeno la producción de PHB en ambas cepas disminuye, en comparación cuando fijan nitrógeno (Fig. 18).

Cuantificación de PHB en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno



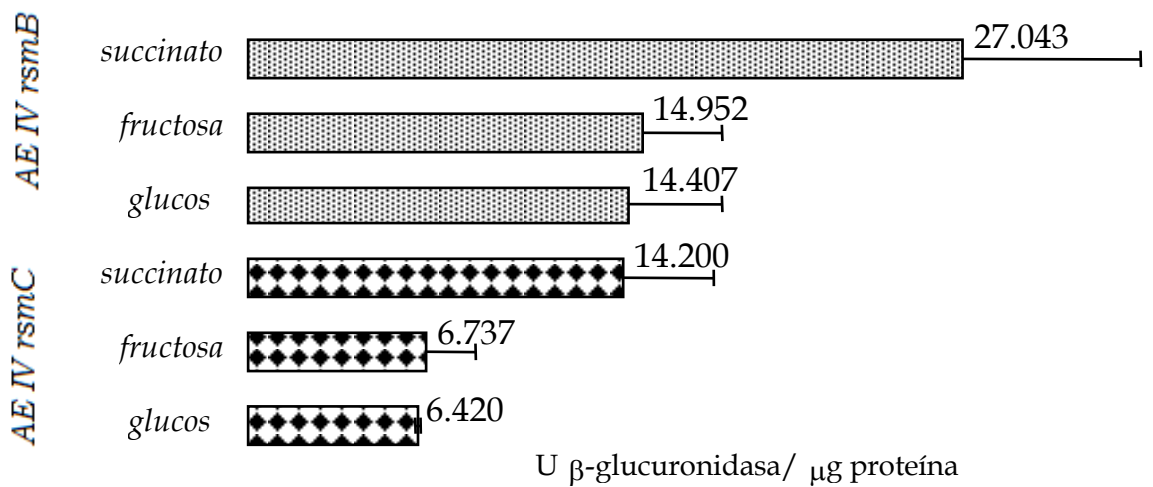
Cepa	Condición	μg PHB/ μg proteína	Cepa	Condición	μg PHB/ μg proteína
AE IV <i>rsmC</i>	No fijación de nitrógeno	0.058 ± 0.017	AE IV	No fijación de nitrógeno	0.380 ± 0.049
	Fijación de nitrógeno	0.139 ± 0.073		Fijación de nitrógeno	0.534 ± 0.191

Fig. 18. Cuantificación de PHB en *A. vinelandii* AE IV y AE IV *rsmC* en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno. la producción específica de PHB se midió en $\mu\text{g PHB}/\mu\text{g proteína}$.

7.5. Expresión de *rsmC* en condiciones diazotróficas, no diazotróficas y en diferentes fuentes de carbono

Al igual que en los estudios de expresión previos del gen *rsmB*, nos dimos a la tarea de estudiar la expresión del gen *rsmC*, en fuentes de carbono glucolítico y gluconeogénico así como en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno. Se midió la expresión de la fusión transcripcional *rsmC-gusA*, encontrando que la expresión de *rsmC*, al igual que la de *rsmB*, se ve aumentada en condiciones de crecimiento con fuentes de carbono gluconeogénicos (Fig. 19).

Expresion de *rsmC* en diferentes fuentes de carbono



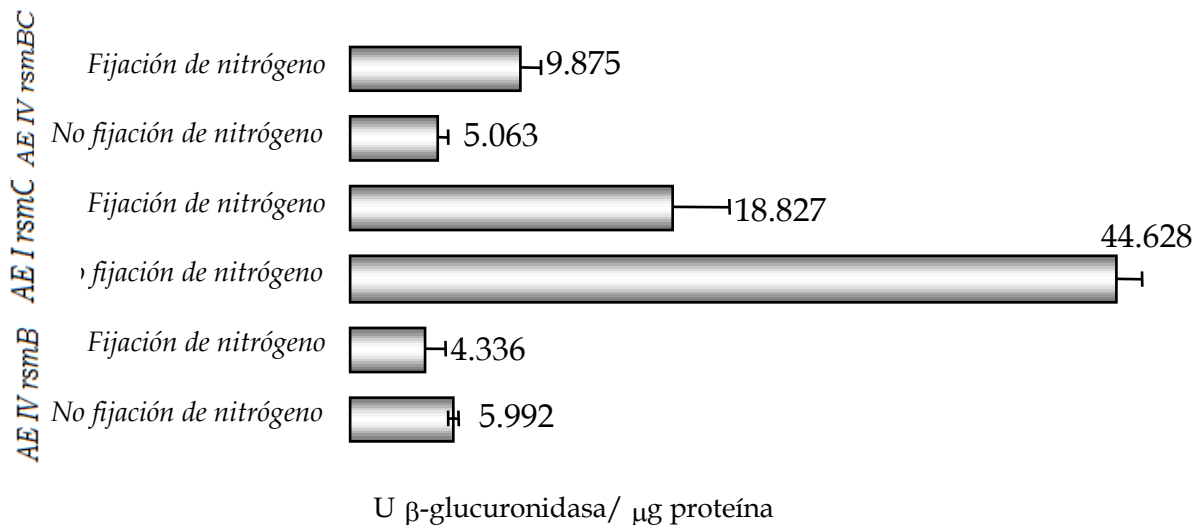
Cepa	Condición	U β-glucuronidasa/ μg proteína	Cepa	Condición	U β-glucuronidasa/ μg proteína
AE IV <i>rsmB</i>	glucosa	6.419±0.118	AE IV <i>rsmC</i>	glucosa	14.407±3.564
	fructosa	6.736±1.838		fructosa	14.952±2.951
	succinato	14.200±3.404		succinato	27.043±6.798

Fig. 19.. Expresión de *rsmC* en fuentes de carbono glucolítico y gluconeogénico, en las cepas AE IV *rsmB*::*gusA*-Sm/Sp y AE IV *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp, crecidas en medio Burk con diferentes fuentes de carbono y condiciones de fijación de nitrógeno. La expresión específica se presenta en Unidades de β-glucuronidasa/μg de proteína.

En las condiciones de fijación de nitrógeno, la expresión del gen *rsmB* es mayor que en condiciones de no fijación de nitrógeno, caso contrario a lo que ocurre con la expresión de *rsmC*, donde es mayor la expresión en condiciones de no fijación de nitrógeno (Fig. 20).

También se estudio la expresión de *rsmC* en una mutante *rsmB*, en este caso en ambas condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno decae la expresión de *rsmC*, lo cual sugiere fuertemente que la expresión de *rsmC* depende de *rsmB*. (Fig. 20).

Actividad B-glucuronidasa



	AE IV <i>rsmB</i>	AE IV <i>rsmC</i>	AE IV <i>rsmBC</i>
No fijación de nitrógeno	5.062-+0.593	44.628-+1.44	5.992-+0.263
Fijación de nitrógeno	9.875-+1.270	18.827-+3.23	4.335-+1.264

Fig. 20. Expresión de los genes *rsmB*, *rsmC* en las cepas AEIV *rsmB*::*gusA*-Sm/Sp, AEIV *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp y AEIV *rsmB*::Km *rsmC*::*gusA*-Sm/Sp, crecidas en medio BS y en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno. Los resultados se muestran en unidades de β-glucuronidasa/μg de proteína.

7.6. Sobre-expresión del gen *rsmC* en una mutante AE IV *gacA*.

La sobre-expresión de *rsmB* en mutantes *gacA* restaura parcialmente la producción de alginato y PHB, lo cual indica que posiblemente parte de la regulación que GacA ejerce sobre la síntesis de alginato se da por el control que GacA ejerce sobre *rsmB*, un fenómeno de regulación similar podría estar ocurriendo con RsmC. Para contestar lo anterior nos propusimos sobre-expresar el gen *rsmC* en una mutante *gacA*. Para lo cual se amplificó por PCR un fragmento de 0.5 kb que contenía el gen, el producto se clonó en pBluescript II KS digerido con *Sma* I, a este plásmido se le llamó pC55, posteriormente el inserto se religó al plásmido pUC19 con sitios de corte *Sal* I y *Bam* HI este plásmido se llamó pU01. Con la finalidad de eliminar la región reguladora del gen *rsmC* en un paso posterior el fragmento *Hind* III-*Bam*HI se ligó al vector de amplio rango de hospedero pJB3Tc20 bajo el promotor constitutivo *lac* este plásmido se llamó pJ01. Este plásmido pJ01 se usó para sobre-expresar el gen *rsmC* en la mutante AE IV *gacA*. Al introducir el plásmido a la cepa AE IV *gacA* disminuyó de manera importante su viabilidad

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los resultados obtenidos en la cuantificación de alginato es claro que el gen *rsmC* se encuentra involucrado en la biosíntesis de alginato, ya que produce el doble de cantidad de alginato comparado con la cepa silvestre. RsmC muy probablemente actúa como un represor de la síntesis de alginato, probablemente éste regulando al gen *algD* que codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa enzima clave para la biosíntesis de alginato, aunque no se podría descartar el que controlará otro gen biosintético.

Aunque fenotípicamente la mutante *rsmC* es mucoide como la cepa silvestre, la mucoidia de la mutante presenta una consistencia diferente cuando es crecida en medio semisólido sugiriendo diferencias en la viscosidad y proponiendo diferencia en el peso molecular del polímero. Otro hecho que sugiere lo anterior, es que al precipitar el alginato de la mutante *rsmC* este no genera hebras macroscópicas que indican que es un polímero de alto peso molecular, como lo hace el alginato de la cepa silvestre. De esta forma no resultaría extraño que RsmC controlara negativamente a la alginato liasa (codificada por el gen *algL*), la enzima que codifica la digestión de la cadena de alginato, lo cual determina el peso molecular. Las características observadas en el alginato de la mutante *rsmC* se sugiere que es alginato de bajo peso molecular probablemente generado por una mayor actividad de la alginasa.

En el caso de la doble mutante *rsmBC* la producción de alginato se ve disminuida a niveles similares a los observados en mutantes *rsmB*. Estudios previos (Martínez-Ortiz, 2004) mostraron que la mutación en *rsmB* disminuye una tercera parte la producción de alginato. Resultados similares se encontraron al cuantificar PHB en las mutantes AEIV *rsmB* y AEIV *rsmBC*. Los resultados anteriores evidencian la interrelación funcional entre RsmB y RsmC además de establecer una dominancia genética de *rsmB* sobre *rsmC*.

Además de la probable regulación genética que RsmC ejerce sobre la producción de alginato, cabe la posibilidad que el efecto regulador de *rsmC* se deba a la canalización de la fuente de carbono hacia la síntesis del polímero, específicamente controlando la producción del sustrato que inicia la síntesis (Fructosa 6-P). Como se recordará en *E. coli* el sistema Ortólogo Csr controla el metabolismo de carbono. De acuerdo a lo anterior, se cuantificó la producción de alginato en la mutante *rsmC* utilizando fuentes de carbono de tipo glucolítico (glucosa y fructosa) y gluconeogénico (succinato), observándose una mayor producción en la fuente de carbono gluconeogénica. El dato sugiere que posiblemente la mutante *rsmC* facilita el flujo de carbono hacia la biosíntesis de alginato. En la generación de la fructosa-6-fosfato, a partir de fuentes de carbono gluconeogénicas, se encuentran involucradas tres enzimas: la triosa fosfato isomerasa, aldolasa y fructosa 1-6 bifosfatasa (Beale & Foster, 1996); estas enzimas a su vez son reguladas por el sistema CsrABC en *E. coli*, por lo que sería interesante determinar si el sistema Rsm de *A. vinelandii* controla la producción de alginato, regulando a las enzimas mencionadas.

Estudios previos sobre de la expresión del gen *rsmB* en *A. vinelandii* realizados por Bustillos (2005), mostraron que la expresión de *rsmB* es mayor en un medio de cultivo mínimo con fuente de carbono gluconeogénica, que en medios con fuentes de carbono de tipo glucolítico. En este trabajo encontramos que condiciones de crecimiento semejantes a las descritas sucede lo mismo con la expresión de *rsmC*.

El estado metabólico de una bacteria fijadora de nitrógeno es diferente cuando esta se crece en condiciones diazotróficas y no diazotróficas. Datos obtenidos por Bustillos (2005) mostraron que la expresión de *rsmB* en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno es distinta. La expresión de *rsmB* decae drásticamente cuando la cepa crece bajo condiciones no diazotróficas. Con este antecedente fue interesante investigar si ocurría lo mismo con *rsmC*. Los resultados de la expresión de *rsmC* muestran lo contrario a lo observado en la expresión de *rsmB*. Lo que se sugiere que existe una regulación de expresión diferencial de los genes que codifican para estos RNAs, modulando su expresión de acuerdo a las condiciones de diazotrofia.

En una mutante *rsmB* la expresión de *rsmC* decae a el 90% de la expresión de la cepa silvestre, lo cual se sugiere que la expresión de *rsmC* requiere de la expresión de *rsmB*. Estos datos evidencian que RsmB regula la transcripción de *rsmC*, y que probablemente el control se establece de manera indirecta ya que RsmB no es un regulador transcripcional. De acuerdo a lo anterior es muy probable que GacA controle la expresión de *rsmC*, ya que GacA controla transcripcionalmente a *rsmB* (Martinez Ortiz, 2004). Por otra parte seria interesante saber si la expresión de *rsmB* se ve alterada de alguna manera en una mutante *rsmC* y establecer la manera en que estos RNA se autorregulan.

También se determinó la producción de alginato en la mutante *rsmC* en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno, los resultados muestran que la mutante produce el doble en condiciones de no fijación de nitrógeno. Este resultado concuerda con lo descrito anteriormente, con respecto a la expresión del gen *rsmC*, como se recordará este se expresa mas en condiciones no diazotróficas de crecimiento, en la mutante *rsmC* a no existir un RsmC funcional que reprima la síntesis del polímero se aumenta la producción de alginato.

En cuanto a los resultados de la cuantificación de PHB en condiciones de fijación de nitrógeno y no fijación de nitrógeno, la cepa silvestre muestra mayor producción de PHB en condiciones de no fijación de nitrógeno. Cuando hay una concentración alta de fuente de carbono y la bacteria no está fijando nitrógeno, se promueve el almacenamiento de la fuente de carbono en forma de PHB. Los resultados obtenidos en la mutante *rsmC* muestran que ocurre lo mismo que en la cepa silvestre, solo que esta produce PHB en mayor cantidad, probablemente en la mutante se este favoreciendo la formación de Acetil-CoA precursor inicial de la biosíntesis de PHB.

En *A. vinelandii*, la sobre-expresión de *rsmB* en mutantes *gacA* restaura parcialmente la producción de alginato y PHB (Martínez Ortiz, 2004). Además de que GacA es necesario para establecer una transcripción eficiente de *rsmB*. Con la finalidad de conocer si RsmC era capaz de restaurar la síntesis de alginato y PHB como lo hace *rsmB*, se sobre-expresó al gen *rsmC* en la mutante *gacA*, estos experimentos mostraron que la mutante *gacA* en presencia del plásmido que contiene el gen *rsmC*, disminuía de manera importante su viabilidad. Esta disminución en la viabilidad celular posiblemente se deba a la sobre-expresión del gen *rsmC* de manera constitutiva y no regulada (a partir del promotor constitutivo *lac*), pudiendo causar una sobredosis tóxica de RsmC.

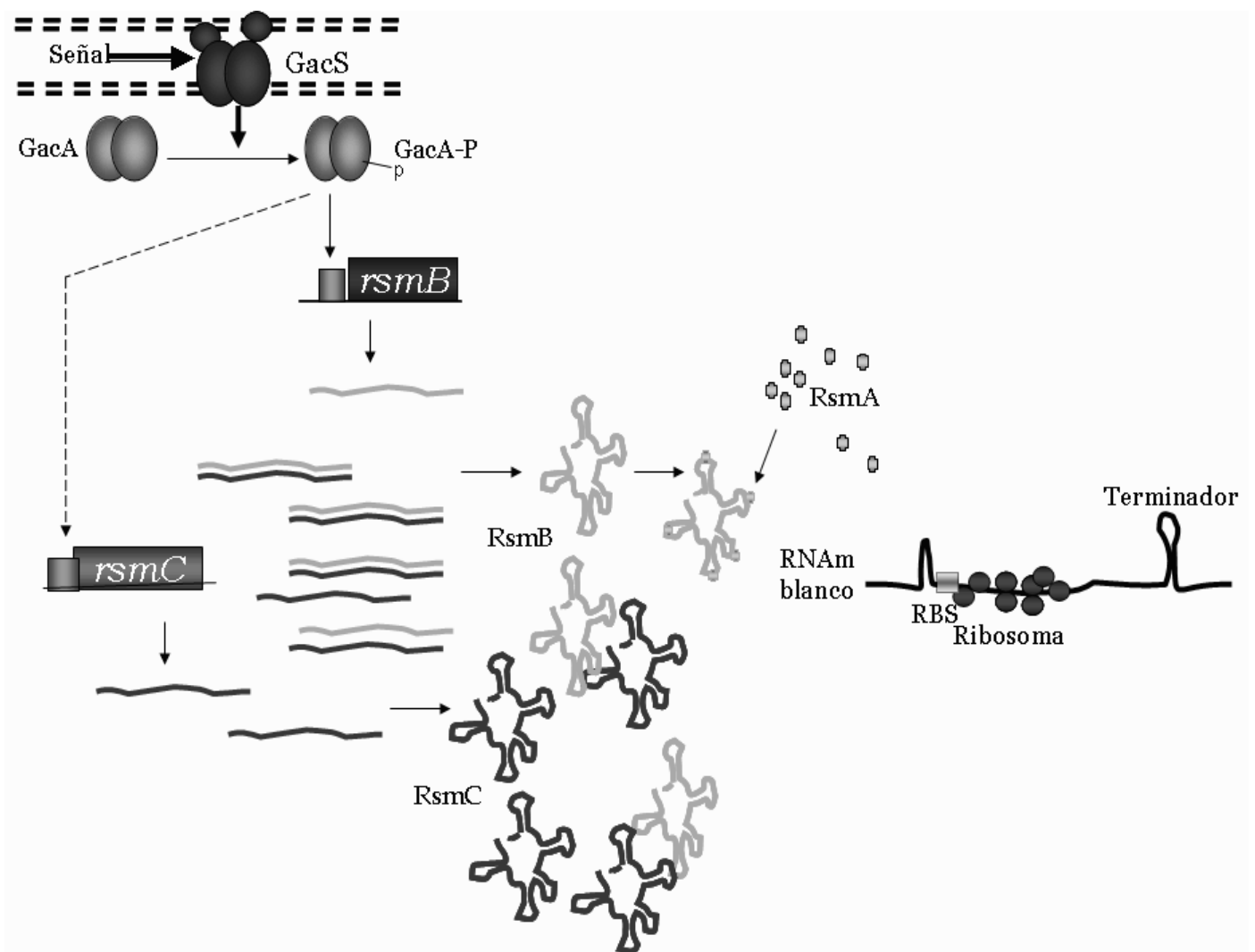


Fig. 21. Modelo de regulación propuesto en *A. vinelandii* por el sistema RsmABC.

En *A. vinelandii* el par regulador GacS/A controla de forma directa la expresión del gen *rsmB*, este genera un RNA no codificante que contiene varias secuencias

repetidas inversas, con las cuales puede formar una estructura secundaria que presenta tallos y asas. Por la similitud de sus regiones promotoras putativas se propone que el sistema GacS/A, al igual que con *rsmB*, regula la expresión del gen *rsmC* de forma directa. El gen *rsmC* presenta un 61% de identidad a nivel secuencia nucleotídica con *rsmB*, en consecuencia RsmC contiene secuencias repetidas inversas que son complementarias a la secuencias repetidas de RsmB, por lo cual, estas pudieran llegar a unirse generando estructuras no funcionales, lo que imposibilitaría el secuestro de RsmA por RsmB. (Fig. 21). Al no estar en la mutante *rsmC* su RNA regulador correspondiente, podría presentarse un desequilibrio estequiométrico entre RsmB y RsmC que permitiría la libre acción de RsmB sobre RsmA.

Respecto a los resultados en donde la expresión de *rsmC* depende de la expresión de *rsmB*, al no estar presente RsmB disminuye la expresión de *rsmC*, quedando libre RsmA para bloquear la traducción de sus blancos de regulación.

9. CONCLUSIONES

- ✓ RsmC regula la producción de alginato y PHB
- ✓ RsmC controla diferencialmente la producción de alginato y PHB en condiciones diazotróficas y no diazotróficas
- ✓ RsmC se expresa diferencialmente en fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas
- ✓ El gen *rsmC* se expresa diferencialmente en condiciones diazotróficas y no diazotróficas
- ✓ La expresión de *rsmC* requiere la expresión de *rsmB*

10. PERSPECTIVAS

- Determinar si RsmC regula negativamente al gen *algD*
- Determinar si RsmC regula negativamente al gen *algL*
- Determinar la participación de RsmC en la regulación de los genes que codifican para la triosa fosfato isomerasa (TPI), la fructosa 1-6 bifosfatasa (FBP) y la aldolasa en la biosíntesis de alginato
- Determinar la expresión del gen *rsmB* en una mutante *rsmC*

11. MATERIAL Y MÉTODOS

11.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 2.

Tabla 2- Cepas y Plásmidos

Cepa	Características	Referencias
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
AE IV	Cepa silvestre	
ATCC 9046	Cepa silvestre	Colección ATCC
AE IV <i>rsmB</i>	Mutante derivada de la AE IV con la delección del <i>rsmB</i> e integración del cassette <i>Km</i>	Martínez-Ortiz 2003
ATCC <i>rsmB</i>	Mutante derivada de la AE IV con la delección del <i>rsmB</i> e integración del cassette <i>Km</i>	Martínez-Ortiz 2003
AE IV <i>gacA</i>	Mutante polar, AE IV <i>gacA</i>	Castañeda, 2000
AE IV <i>rsmC</i> A23	Mutante derivada de la AE IV la cual tiene deletado el gen <i>rsmC</i> y en su lugar el cassette <i>gusA-Sm/Sp</i>	Este trabajo
AE VI <i>rsmBC</i> A31	Mutante derivada de la AE IV <i>rsmB</i> la cual tiene deletado el gen <i>rsmC</i> y en su lugar el cassette <i>gusA-Sm/Sp</i>	Este trabajo
ATCC <i>rsmC</i> #9	Mutante derivada de la ATCC la cual tiene deletado el gen <i>rsmC</i> y en su lugar el cassette <i>gusA-Sm/Sp</i>	Este trabajo
ATCC <i>rsmBC</i> NC II	Mutante derivada de la ATCC <i>rsmB</i> la cual tiene deletado el gen <i>rsmC</i> y en su lugar el cassette <i>gusA-Sm/Sp</i>	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>SupE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, GyrA96, thi-1, relA1</i>	Gibco BRL
Plásmidos	Características	Referencias
pBluescript KS+	Vector de clonación	Stratagene
pJB3Tc20	Vector de clonación	Stratagene
pUC19	Vector de clonación	Stratagene
pBC218	Derivado del pBluescript KS+, Contiene un fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 2 kb en el que se encuentra el gen <i>rsmC</i> y su región promotora	Este trabajo
pUC21/23	Derivado del pUC19, contiene el fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 2 Kb en el que se encuentra el gen <i>rsmC</i> y su región promotora	Este trabajo
pCgA233/2334	Derivado del pUC21 con una mutación por sustitución del gen <i>rsmC</i> con el cassette <i>gusA-Sm/Sp</i>	Este trabajo
pC55	Derivado del pBluescript KS+, Contiene un fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 0.5 Kb en el que se encuentra el gen <i>rsmC</i> y su región promotora	Este trabajo
pU01	Derivado del pUC19, contiene el fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I de 0.2 Kb en el que se encuentra el gen <i>rsmC</i> y sin su región promotora	Este trabajo
pJ01	Derivado del pJB3Tc20, contiene el fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I de 0.2 Kb en el que se encuentra el gen <i>rsmC</i> y sin región promotora, bajo el promotor lac.	Este trabajo

11.2. Medios y Condiciones de Cultivo

Los cultivos de *Azotobacter vinelandii* se realizaron a 30°C, 48hr, en medio Burk Sacarosa (BS) cuya composición es la siguiente:

Sacarosa 0.2 g/l	Na ₂ SO ₄ 0.183 g/l	FeSO ₄ .7H ₂ O 0.005 g/l
KH ₂ PO ₄ 0.2 g/l	CaCl ₂ .2H ₂ O 0.073 g/l	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0.0002 g/l
K ₂ HPO ₄ 0.8 g/l	MgCl ₂ .6H ₂ O 0.16 g/l	

Los cultivos en medio líquidos se llevaron acabo en matraces de 125 ml con 25 ml de medio y en matraces de 250 ml con 50 ml de medio en una incubadora a 30°C con agitación a 200 rpm durante 48 h

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron a 37°C, 24 h, en medio Luria (LB) cuya composición es la siguiente:

Bacto peptona 10 g/L	Extracto de levadura 5 g/L	Cloruro de Sodio 10 g/L
----------------------	----------------------------	-------------------------

11.3. Amplificación del gen *rsmC*

El gen *rsmC* se amplifico por PCR, usando como templado el DNA cromosomal de *A. vinelandii* UW136, con los oligos RSMC1 y RSMC2 un fragmento de 0.5 kb y con los oligos RSMC3 y RSMC4 un fragmento de 2 kb (Tabla 3) ambos bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización 95°C 1 min, alineamiento 68°C 1 min, extensión 72°C 2 min, por 30 ciclos, y un ultimo ciclo 72°C 10 min, los productos resultantes fueron clonados en pBluescript por separado.

Tabla 3.- Oligonucleotidos usados en la amplificación por PCR del gen *rsmC*

Oligonucleotido	Secuencia del oligonucleotido 5' → 3'	Tamaño del amplificado
RSMC1	5' GCCGAGGCCGAAGAGGAAGG 3'	Fragmento de 0.5 kb
RSMC2	5' AGTGCCCAGACCATCAGGAATACA 3'	Fragmento de 0.5 kb
RSMC3	5' GCGCGGCGTTGCTCGTCGTT 3'	Fragmento de 2 kb
RSMC4	5' CGCCGCTCGCCGTTCTCC 3'	Fragmento de 2 kb

11.4. Construcción de las cepas AE IV *rsmC* y AE VI *rsmBC*.

Para obtener las mutantes, se transformaron las cepas con el plasmido pCgA233/234, y se seleccionaron transformantes resistentes a Estreptomina 2 mg/ml (Sm2) y Espectinomicina 100 mg/ml (Sp100), de la siguiente manera:

Cepa	Antibiótico
AE VI <i>rsmC</i>	Sm2, Sp100
AE VI <i>rsmBC</i>	Sm2, Sp100 y Km4 (Kanamicina 4 mg/ml)

En estas transformantes seleccionadas se presento un evento de doble recombinación homóloga, que fue confirmada por hibridación tipo Southern blot.

11.5. Transformación de *A. vinelandii* con DNA plasmídico o cromosomal

La transformación de *A. vinelandii* se llevo acabo con células competentes preparadas en CM (BS sin Fe y Mo) (Page & Tigerstrom, 1978).

- 1.- Utilizar 200 µl de células competentes y mezclar con 1 0µg de DNA plasmidico superenrrollado
- 2.- Inocular la mezcla sobre medio CM solido incubar 30°C 48 h
- 3.- Levantar el tapete celular, y lavar con MgSO₄ 10 mM y resuspender en 1ml de MgSO₄ 10 mM
- 4.- Plaquear 200 µl en medio BS de selección 30°C 48 h
- 5.- Seleccionar transformarmantes.

Medio CM: buffer PO₄, Sacarosa 20%, CaCl₂, Na₂SO₄ y MgCl₂.

Medio BS: buffer PO₄, Sacarosa 20%, CaCl₂, Na₂SO₄, MgCl₂, FeSO₄ y NaMoO₄.

11.6. Método de conjugación triparental en *A. vinelandii*

Se realizó una crusa triparental utilizando el plasmido ayudador pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979) utilizando en un medio de selección BS con el antibiótico de selección.

Resembrar las placas de *A. vinelandii* 30°C 48 h.

Día 1.- Pre-inóculo de *A. vinelandii*, inocular la cepa *A. vinelandii* en 25 ml en BS con el antibiótico 30°C 24 h a 200 rpm

Día 2.- Inocular 1 ml del pre-inoculo en 50 ml de BS sin antibiotico 30°C 48 h 200 rpm

Día 3.- Pre-inóculo de *E. coli*, inocular *E. coli* en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente e incubar 37°C 12 h a 200 rpm

Día 4.- Inocular 500 µl del pre-inóculo de *E. coli* en 4.5 ml de LB, incubar 37°C 3 h a 200 rpm

Los 50 ml de *A. vinelandii* se lavan con MgSO₄ 10 mM de 2 a 3 veces, quitar el alginato y resuspender en 1ml de MgSO₄ 10 mM

En un tubo eppendor agregar 200 µl *A. vinelandii*, 100 µl del plasmido a conjugar y 100 µl del plásmido helper, plaquear en un medio BSLB, e incubar 30°C 48 h

Día 6.- Levantar el tapete celular, lavarlo con MgSO₄ 10 mM, hacer dilusiones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³, e inocular en una placa de BS selección, incubar 30°C 48 h, y posteriormente seleccionar conjugantes.

Medio BSLB: 250 ml BS, 70 ml LB, 3.2 ml glucosa 20% y 3.2 ml de Acetato de amonio 1.5 M.

11.7. Hibridación tipo Southern

1. Corrimiento electroforetico del gel de agarosa 1% con el DNA digerido con la enzima adecuadamente.

2. Teñir el gel, y tomar una foto con una regla a manera de guía.

3. Transferir el DNA a la membrana nylon, con NaOH 0.4 M mínimo 4 h.

4. Posteriormente lavar la membrana 2 veces con la durante 30 min hasta obtener un pH=7

5. Colocar la membrana en el tubo de hibridación con la solucion de pre-hibirdacion.

Solución de pre-hibridación			
Formalmida	2500 µl	TRIS 1.0 M pH 7.5	50 µl
SSC 20X	1250 µl	SDS 10%	50 µl
Denhardts 100X	250 µl	H ₂ O	755 µl
EDTA 0.25 M pH8	20 µl	DNA Timo de ternera	125 µl

El DNA y el agua se colocan en baño Maria durante 5min a 90°C después se pasa en hielo 2 min, y enseguida se agregan el resto de las soluciones

6.- Después de la pre-hibidacion se agrega la sonda marcada radiactivamente, incubando a 42°C toda la noche

7.- Lava la membrana dos veces con la solucion 1 durante 30 min y posteriormente se lava 1 vez con la solucion 2 30 min.

8.- Se expone en un film, y posteriormente se revela el film fotografico.

Solución 1 de lavado (SSC 2X, SDS 0.1%):

H₂O destilada 100ml

SDS 10% 1 ml

SSC 20% 10 ml

Solución 2 de lavado (SSC 0.1 X, SDS 0.1%):

H₂O destilada 100 ml

SDS 10% 1 ml

SSC 20% 500 µl

Marcaje radiactivo (RadPrime DNA labeling System; Invitrogen)

DNA (sonda) 25-50 ng H₂O (Volumen final de 50 µl)

ATP 1 µl

TTP 1 µl

GTP 1 µl

CTP³² 1 µl

Enzima 1 µl

Buffer de la enzima 20 µl

Se descongela los NTP's en HIELO.

Se coloca un termoblock a 95°C y otro a termoblock a 37°C

Se coloca en un Ependorff de 500 µl el H₂O con el DNA a 95°C por 5 min.

Se coloca el ependorff inmediatamente en hielo por 2 min.

Se le agrega los NTP's excepto el CTP³²

Se le agrega el CTP³² junto con la enzima, en el cuarto de radiactividad..

Se incuba a 37°C por 30 min.

Toda la mezcla se incuba a 95°C por 5 min.

Se coloca en hielo por 2 min.

Se agrega a los tubos de prehibridación, incubar a 42°C durante 12h (o toda la noche) en el horno de hibridación.

11.8. Cuantificación de la producción de alginato por el método de Carbazol

1.- inocular 25 ml del medio BS con una asada de un cultivo fresco de *A. vinelandii* incubar 30°C 48 h 200 rpm

2.- Apartir de ese cultivo inocular 50 ml del medio BS (por triplicado) estandarizando el preinoculo para partir de una misma cantidad de celulas, incubar 30°C 48 h 200 rpm

3.- Centrifugar 30 ml de cada cultivo, coleccionar el sobrenadante en tubos falcon, lavar las celulas con EDTA 0.01 M para eliminar el alginato, y recolectarlo en los mismos tubos falco

4.- separar las celulas y determinar proteina por el método de Lowry

- 5.- Una porcion del sobrenadante de precipita con 2 vol de isopropanol, se observa un precipitado blanco, secar, resuspender en agua y cuantificar alginato por el metodo de Carbazol
- 6.- Los 20 ml restantes, se toma 1ml del cultivo para cuantificar PHB

La producción del polisacárido se midió después de precipitar el alginato con isopropanol y resuspendido en agua.

- 1.- Alicuotar 3 ml de una solución de Acido sulfurico-Boratos en tubos de ensaye de vidrio previamente sumergidos en hielo
- 2.- Cuidadosamente colocar 350 µl de la solucion problema de alginato sobre la superficie de la solucion sulfúrica
- 3.- Correr paralelamente a las muestras una curva estandar de alginato con las siguientes concentraciones 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg alginato/ml de solucion
- 4- Añadir 100 µl de Carbazol al 0.1% em etanol, vortexear cuidadosamente.
- 5.- Colocar la reaccion em um baño maria a 55°C durante 30 min. (se desarrolla um color violeta-bugambilia cristalino y brillante, si el alginato esta contaminado el color es café)
- 6.- retirar del baño, y dejar q tome la temperatura ambiente, el colore s estable de 1-2 h
- 7.- Medir la absorvancia de lãs muestras en um espectrofotômetro a uma longitudud de onada de 530 nm.

Solucion de acido sulfúrico-Boratos 1 L: 975 ml de Acido slfurico + 25 ml de Boratos

Solucion de Boratos: 10.09 gr de KOH em 45 ml Agua + 24.7 gr Acido borio aforar a 100 ml con agua.

Carbazol 0.1% em etanol: 10 mg de carbazol em 10 ml de etanol 100%

11.9. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

1. Tomar 5 ml del inoculo 48 h. de *A vinelandii*
2. Bajar células y lavar con MgSO₄ 10 mM
3. Resuspender nuevamente el paquete celular en 1ml de MgSO₄ 10 mM
4. Tomar 50 µl de muestra y agregar 20 0µl de reactivo de Bradford
5. Agregar agua a llegar a un volumen final de 1 ml (750 µl)
6. Medir D.O. a 595 nm
7. Para calcular los µg prot/ml se obtiene realizando una curva de calibración de albumina:

Albúmina (µg/µl)	H ₂ O(ml)
2	998
4	996
8	992
16	984
32	968
64	936

11.10 Cuantificación del contenido de PHB

- 1.- Tomar 1 de cultivo, lavar con MgSO_4 10 mM
- 2.- Agregar 1 ml de Hipoclorito 30% e incubar 1-1½ h, 30°C 200 rpm
- 3.- Centrifugar y decantar, lavar con 1 ml de agua, centrifugar y decantar
- 4.- Lavar con 1 ml de etanol 100%, centrifugar y decantar
- 5.- Lavar con acetona, centrifugar y decantar
- 6.- dejar secar
- 7.- Disolver el paquete celular en 1ml de H_2SO_4 concentrado y transferir en un tubo de cristal + 1 ml H_2SO_4 para tener un volumen final de 2 ml
- 8.- incubar a 90°C 10 min
- 9.- Leer en un espectrofotometro a una longitud de onda de 235 nm

11.11. Determinacion de actividad de β -glucoronidasa (miller)

- 1.- Preinoculo de 18 h de cepa *A vinelandii*.
- 2.- Inocular 50 ml BS con 1 ml de preinoculo anterior, incubar a 30°C por 48
- 3.- Tomar 1 ml de cultivo o más dependiendo de la densidad celular. Centrifugar para obtener el paquete celular.
- 4.- Resuspender 20 μl y agregar 710 μl de Buffer Z. Preparar al mismo tiempo el blanco que contenga 730 μl de buffer Z y procesarlo junto con las muestras. (Vol tRx)
- 5.- Agregar 10 μl de solución de lisozima 10 mg/ml e incubar los tubos 5 minutos a 37°C en baño maria
- 6.- Agregar 10 μl de solución de Triton 10%
- 7.- Agregar 100 μl de solución ONPG, cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
- 8.- Transferir los tubos inmediatamente a un baño de agua a 28°C por 15 minutos (tRx).
- 9.- Agregar 150 μl de solución de Na_2CO_3 para detener la reacción.
- 10.- Leer la absorbancia a 420 nm contra el blanco.

$$U \beta\text{-glucoronidasa} = \frac{\text{DOact (420) (1000)}}{(0.018)(\text{tRx min})(\text{VolRx l})(\mu\text{g prot/ml})}$$

* cuantificar por Método de Bradford

1U β -gluc (=) nmoles de PNPG min-1/ μg proteína

Lisozima: Disolver 10 mg de lisozima en 1 ml de agua destilada (10 mg/ml), guardar en congelación.

PNPG: Disolver 40 mg de PNPG(P-nitrofenil- β -D-glucoronido) en 10 ml de agua destilada.

Na_2CO_3 : Disolver 12.72 g de Na_2CO_3 en 100 ml de agua destilada.

Triton 100X: Solucion 10% v/v de triton en agua destilada esteril.

buffer "Z"

	g/10 ml		Stock	ml Stock /50 ml
K_2HPO_4	0.87	0.03 M	0.5 M	3.0 ml
KH_2PO_4	0.68	0.02 M	0.5 M	2.0 ml

EDTA	0.001 M	0.25 M	0.2 ml	0.5 ml
DDT*	0.385	0.005 M	0.25 M	1.0 ml

11.12 Purificación de DNA cromosomal de *A. vinelandii*

- 1.- Crecer *A. vinelandii* en 5 ml de BS en un tubo falcon de 50 ml o en 50 ml en un matraz de 250 ml 30°C 48 h a 200 rpm
- 2.- Recuperar el paquete celular por centrifugacion a 4000 rpm 10 min
- 3.- Lavar las celulas con MgSO₄
- 4.- Resuspender el paquete celular en 450 µl de buffer TE 50/20
- 5.- Agregar 50 µl de lisozima 10 mg/ml e incubar a 37°C 30 min
- 6.- Agregar 50 µl de proteasa 10 mg/ml e incubar a 37°C 30 min
- 7.- Agregar 50 µl de SDS 10%, incubar 15 min 37°C
- 8.- Agregar 100 µl de NaCl 5 M, e incubar a 65°C 10 min
- 9.- Adicionar 80 µl de la solucion CTAB 10% NaCl 0.7 N (preciamente incubada a 65°C) e incubar a 65°C de 15 a 20 min
- 10.- Extraer 1 vez con 1 volumen de la solucion de cloroformo-alcohol isoamilico 24:1
- 11.- Extraer 1 vez con 1 volumen de la solucion de Fenol-cloroformo-alcohol isoamilico
- 12.- Extraer 1 vez con 1 volumen de la solucion de cloroformo-alcohol isoamilico 24:1
- 13.- Añadir 0.6 volumen de isopropanol
- 14.- Centrifugar, decantar e añadir 1ml de etanol al 70%, centrifugar 3 min 1200 rpm
- 15.- Lavar 3 veces con 1 ml de etanol al 70%
- 16.- Secar y resuspender la pastilla en una solucion de RNAsa diluida
- 17.- Incubar 1hr 37°C

Medio BS: buffer PO₄, Sacarosa 20%, CaCl₂, Na₂SO₄, MgCl₂, FeSO₄ y NaMoO₄.

Buffer TE: 2.5 ml de Tris 1 M + 4 ml de EDTA 0.25 M aforar con agua a 50 ml.

CTAB 10% NaCl 0.7 M: 1 g de CTAB + 0.409 g de NaCl aforado con agua a 10 ml.

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

- 1.- Subcultivar la cepa de *A. vinelandii* 2 veces en medio CM (Competence medio) incubando 30°C 48 h
- 2.- Recolectar todas las celulas para inocular 50 ml de CM líquido en un matraz de 250 ml incubando 30°C 48 h a 200 rpm
- 3.- Recuperar las celulas por centrifugacion a 4000 rpm 10 min
- 4.- Lavar las celulas con MgSO₄ 10 mM
- 5.- Resuspender las celulas en 360 µl de CM líquido y 160 µl de MgSO₄ 0.01 M.

Medio CM: buffer PO₄, Sacarosa 20%, CaCl₂, Na₂SO₄ y MgCl₂

11.14. Extracción de plasmido por lisis alcalina

- 1.- Inoculan 5 ml del medio adecuado con antibiótico de selección, incubar 18 h, 37 °C y 200 rpm

- 2.- Se vierte el cultivo en tubos Eppendorf, se centrifuga y se desecha el sobrenadante hasta que el total del volumen del tubo sea transferido y centrifugado.
- 3.- Lavar la pastilla con 1 ml de MgSO₄ 10 mM (resuspender), centrifugar y eliminar sobrenadante.
- 4.- Resuspender la pastilla en 200 µl de solución 1 fría, se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Agregar 200 µl de solución 2 recién preparada. Mezclar suavemente por agitación invertida de 20 a 25 veces, dejar reposar en hielo 5 minutos.
- 6.- Agregar 200 µl de solución 3, agitar por inversión unos 10 segundos, se deja reposar en hielo por 20 minutos.
- 7.- Centrifuga por 10 minutos, transferirse el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
- 8.- Agregar 500 µl de fenol-cloroformo, agitar en vórtex y centrifugar por 3 minutos.
- 9.- Transferir el sobrenadante a otro tubo, agregar 500 µl de cloroformo isoamílico, agitar en vórtex y centrifugar 3 minutos.
- 10.- Transferir el sobrenadante a otro tubo, añadir 1ml de etanol absoluto, centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm.
- 11.- Drenar el etanol y se lava la pastilla con etanol al 70% 2 veces.
- 12.- Secar la pastilla y resuspender en solución RNAsa diluida (20 mg/ml), incubar por 1 h a 37°C.

Solucion 1. glucosa 10 mM 1.801 g, EDTA 2 mM, 0.744 g, TrisCl 5 mM 1.788 g pH 8.0 Agua destilada 200 ml

Solucion 2: NaOH 5 N 120 µl, SDS 10% 300 µl, Agua destilada 2.58 ml.

Solucion 3: Acetato de Na o K (5 M) 60 mg, Ac. Acético Glacial 11.5 ml y Agua destilada 28.5 ml pH 4.8

Fenol - cloroformo-isoamilico (relación 24:1)

Cloroformo- isoamilico (relación 24:1)

11.15. Manipulación de DNA

Los procedimientos estándar para la purificación de DNA total y de plasmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de DNA de geles de agarosa, ligación de DNA y transformación de *E. coli*, se realizaron según lo descrito por Sambrook *et al*, (1989).

12. REFERENCIAS

1. **Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, and F. O'Gara.** 2000. A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **182**: 3913-3919.
2. **Alexeyev M. F., Shokolenko I. N., and T. P. Croughan.** 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in nitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* **160**: 63-7.
3. **Altier, C., Suyemoto, M. Ruíz, A. I., Burnham, K. D., and Maurer, R.** 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol. Microbiol.* **35**: 635-646.
4. **Anderson, A. J., and E. A. Dawes.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
5. **Beale J. M. Jr., and J. L. Foster.** 1996. Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry*; **35**: 4492-4501.
6. **Bishop E. Paul and Brill J. Winston.** 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* Mutant strains Unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol* **130**: 954-956.
7. **Blatny J. M., brautaset T., H. C. Winther-Lasen, Haugan K., and S Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 370-379.
8. **Blumer, C., S. Heeb, G. Pessi, and D. Haas.** 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 14073-14078.
9. **Blumenkrantz, N and G. Asboe-Hansen.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* **54**: 484-489.
10. **Brock, Madigan, Martinko, Parker.** 1999. *Biología de los microorganismos*; 8va. Edición; Ed. Prentice Hall.
11. **Brinkman, F.S.L., E. Macfarlane, P. Warrener, and R. E. W. Hancock.** 2001. Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. *Infection and Immunity.* **69**: 5207-5211.
12. **Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno and G. Espín.** 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**: 2624-2628.
13. **Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Núñez and G. Espín.** 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.
14. **Clementi F.** 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*; *Crit.Rev.Biotech.* **17**: 327-361.
15. **Cui Yaya, A. Chatterjee, and K. Chatterjee.** 2001. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpin_{Ecc}. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* **14**: 516-526.
16. **Gacesa P.** 1998. Bacterial alginate biosynthesis recent progress and future prospects. *Microbiol.* **144**: 1133-1143.

17. **Grewal, S. I., Han, B., and Johnstone, K.** 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. J. Bacteriol. **177**: 4658-4668.
18. **Haug A Larsen B.** 1971. Biosynthesis of alginate: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*; Carbohydrate Res.; **17**: 287-296.
19. **Heeb S, C. Blumer, and D. Haas.** 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. J. Bacteriol. **184**: 1046-56.
20. **Kazushi ;S., Wang, X. Wang, T. Weilbacher, A.K. Pernesting, Ö. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo.** 2002. Regulatory circuitry or the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **184**: 5130-5140.
21. **Lafferty, R. M., B. Korsatko, W. Korsatko.** 1990. Microbial production of Poly-β-hydroxybutyric acid. Rehm H. J., G. Reed (Eds.) Biotechnology.
22. **Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G., and Haas, D.** 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic shynthesis and suppression of black root rot of tobacco: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**: 1562-1566.
23. **Law, J. H., and R. A. Alepecky.** 1961. Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. **82**: 33-36.
24. **Liao C. H., MacCullus D. E. y Fett W. F.** 1994. Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. Mol Plant-Microbe Intract. **7**: 391-400.
25. **Lin L.P., H.L. Sadoff.** 1969. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β-hidroxibutyrate; Journal Bacteriology. **98**: 1335-1341; 1969.
26. **Liu, M. Y., and T. Romeo.** 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a especific mRNA binding protein. J. Bacteriol. **179**: 4639-4642.
27. **Lloret L., R. Barreto, R. Leon, S. Moreno, J. Martínez-Salazar, G. Espin, G. Soberón-Chavez.** 1966. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosyntetic genes: identifiacion of two independent promotores; Mol. Microbiol. **21**: 449-457.
28. **Manchak J., W. J. Page.** 1994. Control of poly hidroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* cyst; sequence are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD* promoter; Gene. **113**: 841-846.
29. **Martínez Muñoz. N. B.** 2004. Caracterización del gen *rsmA* de *Azotobacter vinelandii*". Tesis de Licenciatura un Biomedicina Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
30. **Martínez Ortiz V. M.** 2004. Caracterización del regulador post-transcripcional RsmB implicado en la regulación metabólica en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Microbiología. Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
31. **Martínez-Salazar, J., S. Moreno, R. Nájera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez, and V. Deretic.** 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA, MucB, MucC, and MucD and *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. J. Bacteriol. **178**: 1800-1808.

32. **Moreno, S., J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1998. Role of the alternative *s* factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**: 2766-2769.
33. **Nagasawa, S., Tokishita, S., Aiba, H., and Mizuno, T.** 1992. A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 799-807.
34. **Nagpal, P., S. Jafri, M. A., Reddy, and H. K. Das.** 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3133-3138.
35. **Nuñez C., S. Moreno, L. Cárdenas, G. Soberon-Chavez.** 2001. Inactivation of the *ampDE* operon increase transcription of *algD* and affects morphology and encystment in *Azotobacter vinelandii*; *J. Bacteriol.* **182**: 6550-6.
36. **Parkinson J.S., Kofoid E.C.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins; *Annual Rev. Gene.* **26**: 71-112.
37. **Peralta, G. M., Segura, D., Guzmán J., Servín-González, L. and Espín, G.** 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β - hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. Bacteriol.* **184**: 5672-5677.
38. **Pernestig, A.K., Ö. Melefors, and D. Georgellis.** 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *The J. of Biol. Chemistry.* **276**: 225-231.
39. **Pessi, G., Williams, F., Hindle, Zoe., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Cámara, M., Haas, D. and Williams, P.** 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 6676-6683.
40. **Pindar, D. F. and C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**: 617-622.
41. **Reimmann C. M., Beyeler M., Lafiti A., Winteler H., Foglino M., Lazdunski A., and Haas D.** 1977. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserin lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. *Mol. Microbiol.* **24**: 309-319.
42. **Reimmann C. M., Valverde C., Kay E. and Hass D.** 2005. Posttranscription repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J. bacterial.* **187**: 276-285.
43. **Reush R.N., Sadoff H.L.** 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*; *J. Bacteriol.* **145**: 889-895.
44. **Romeo, Tony.** 1998. MicroReview:Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **24**: 309-319.
45. **Sabnis, N. A., H. Yang and T. Romero.** 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *crsA*. *J. Biol. Chem.* **270**: 29296-29104.
46. **Sambrook J.K., E.F. Fristch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
47. **Sadoff H.L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*; *Bacteriology Rev.* **39**: 519-539.

48. **Segura, D., Cruz, T. and Espin, G.** 1972. Encystment and alkylresorcinols production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol.* **179**: 437-443.
49. **Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. Richie, and E. A. Dawes.** 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.
50. **Senior, P. J. and Dawes E. A.** 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**: 225-238.
51. **Steinbüchel, A., and H. E. Valentin.** 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.
52. **Heeb Stephan and Haas Dieter.** 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two component-system in plant-associated and other gram negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* **14**: 1351-1363.
53. **Stock J. B., G. Surette, M. Levit, and P. Park.** 1995. Two component signal transduction systems: structure function relationship and mechanism of catalysis. p.25-51 in two component signal transduction. Hoch, J.A. and T.J. Silhavy, eds. American Society of microbiology, Washington, D.C.
54. **Teplitski M, Goodier R, and Ahmer B.** 2003. Pathways Leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **185**: 7257-7265.
55. **Wilson K.J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A.D. Akkermans and R.A. Jefferson.** 1995. β -Glucuronidase(GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram negative bacteria. *Microbiology.* **141**: 1691-705.
56. **Whistler, C. A., N. A. Corbell, A. Sarniguet, W. Ream, and J. E. Loper.** 1998. The two component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigma S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol* **180**: 6635-6641.
57. **Campos, M.E., J.M. Maetinez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Nuñez, G. Espin, and G. Soberon-Chavez.** 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **178**: 1799.
58. **Valverde, C., S. Heeb, C. Keel and D. Haas.** 2003. RsmY. A small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Mol. Microbiol.* **50**: 1361-1379.
59. **Vazquez, A., S. Moreno. J. Guzmán, A. Alvarado and G. Espín.** 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* algXLVIFA gene: characterization of *algF* mutants. *Gene.* **232**: 217-219.
60. **Hrabak E.M., and D.K. Willis.** 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol.* **174**: 3011-20.
61. **Weilbacher, T., H. Suzuki, A. K. Dubey, X. Wang, S. Guadapaty, I. Morozov, C. S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo.** 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**: 657-670.

62. **Wong, S. M., Carroll, P. A., Rahme, L. G., Ausubel, F. M., and Calderwood, S. B.** 1998. Modulation of expression of the ToxR regulon in *Vibrio Cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infect. Immun.* **66**: 5854-5861.
63. **Zuker, M., J. A. Jaeger and D. H. Turner.** 1991. A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structure predicted by free energy minimalisation with structures determined by phylogenetic comparison. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2707-2714.