



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Medicina

Instituto de Ciencias BUAP

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Laboratorio de Genética Molecular Microbiana

Título de la tesis

**“Estudio de la expresión de los genes involucrados en la
producción de sideróforos en *Azotobacter vinelandii*”**

Que para obtener el título de

Licenciada en Biomedicina

Presenta

Thalía Barrientos Millán

Director Experto

D.C. Miguel Castañeda Lucio

Director Metodológico

M.C. Liliana López Pliego

Puebla, Pue. 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, el doc Miguel, por sus invaluable consejos y enseñanzas que me “deformaron” como estudiante, gracias por mostrarme cómo es una persona de ciencia cuando en verdad ama lo que hace.

A Lily, gracias por ayudarme a llegar hasta este momento, por ser una gran amiga, consejera y, sobre todo, un modelo a seguir.

A mi mamá, el pilar inamovible que sostiene a nuestra familia, gracias por salvarme en mis peores momentos y ayudarme a llegar a los mejores, por ti llegué a ser la persona que soy ahora.

A mi papá, por tu apoyo incondicional y por creer en mí cuando nadie más lo hizo, gracias por darme siempre todo lo que necesité y, muchas veces, más de lo que necesitaba.

A mis compañeros de laboratorio que se fueron, que se quedan y que fueron adoptados: Vale, Gama, Inés, Gis, Chucho, Lau, Flor, Pau, Dalia, Lari, David, Jimena, Miauricio, Ram, Judith, Gaby, Vicky, Ara, gracias por hacer que la estancia en el laboratorio fuera de los momentos más divertidos del día.

A mis amigos biomédicos: Coral, Ceci, Emilio, Carlos, Iris, Denisse, Toño, Bubu, Óscar, Nacho, Ángel y Rosy, que me acompañaron la mayor parte de la carrera y algunos, más que mis amigos, se convirtieron en mis hermanos. Gracias por todo lo que pasamos y por lo que nos falta.

A mis amigos no pertenecientes a la carrera: Alan, Arturo, Caro, Eliel, Gilberto, Ignacio, Laura, Martín, Kike, Óscar, Raúl, Yair y tal vez falten pero no quiere decir que sean menos importantes, sino que me faltó tiempo para mencionarlos a todos. Gracias por no dejarme caer en el estrés tan pronto y gracias a Alan y Raúl por soportarme cuando al fin caí en él. Agradezco en especial a Laurita, porque gracias a ella aprendí el verdadero valor de las cosas.

A mi hermana, por enseñarme el valor de la responsabilidad, aunque de forma indirecta. Te quiero, personaje.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 GENERALIDADES DE <i>Azotobacter vinelandii</i>	5
2.2 SIDERÓFOROS.....	6
2.2.1 Aplicaciones biotecnológicas.....	6
2.2.2 Clasificación.....	7
2.3 SIDERÓFOROS EN <i>A. vinelandii</i>	8
2.3.1 Catecoles.....	9
2.3.2 Síntesis de catecoles.....	9
2.3.3 Pioverdinas.....	10
2.3.4 Síntesis de pioverdinas.....	11
2.4 SISTEMA DE DOBLE COMPONENTE GacS/GacA.....	13
2.5 SISTEMA DE REGULACIÓN POST- TRANSCRIPCIONAL Rsm.....	15
2.6 CASCADA DE REGULACIÓN Gac-Rsm EN <i>P. aeruginosa</i>	16
3. ANTECEDENTES.....	18
3.1. SISTEMA Gac-Rsm EN <i>A. vinelandii</i>	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21

6. OBJETIVOS.....	22
6.1. GENERALES.....	22
6.2. ESPECÍFICOS.....	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES pUMATcgusAT y pUMATcgusAPT CON LAS REGIONES REGULADORAS DE LOS GENES <i>pvdS</i> , <i>pvdI</i> , <i>csbX</i> y <i>csbC</i>	23
7.2 GENERACIÓN DE LAS FUSIONES TRANSCRIPCIONALES Y TRADUCCIONALES <i>pvdS-gusA</i> , <i>pvdI-gusA</i> , <i>csbX-gusA</i> y <i>csbC-gusA</i>	26
7.3 GENERACIÓN DE LAS MUTANTES <i>rsmA::Gm</i>	26
7.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS FUSIONES <i>pvdS-gusA</i> Y <i>csbC-gusA</i>	28
8. DISCUSIÓN.....	30
9. CONCLUSIONES.....	33
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
10.1 OLIGONUCLEÓTIDOS, CEPAS y VECTORES.....	34
10.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	36
10.2.1 Luria Bertani (LB).....	36
10.2.2 Burk-Sacarosa (BS).....	36
10.2.3 Medio de competencia (CM).....	36
10.2.4 Preparación BS y CM.....	37

10.3 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.....	37
10.3.1 Perclorato.....	37
10.3.2 Maxiprep.....	38
10.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	39
10.5 ELECTROFORESIS.....	40
10.6 DIGESTIÓN CON <i>Sacl</i>	40
10.7 LIGACIÓN CON T4 DNA Ligasa.....	41
10.8 TRANSFORMACIÓN EN <i>E. coli</i>	42
10.8.1 Preparación de células competentes exprés.....	42
10.8.2 Transformación por electroporación.....	42
10.9 TRANSFORMACIÓN EN <i>A. vinelandii</i>	43
10.9.1 Preparación de células competentes.....	43
10.9.2 Transformación.....	43
10.10 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY.....	44
10.11 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD β -GLUCORONIDASA.....	45
11. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram negativa perteneciente a las γ -Proteobacterias y a la familia *Pseudomonadaceae*. Es una bacteria poliploide que bajo condiciones adversas tiene la capacidad de diferenciarse en quistes resistentes a la desecación y fija nitrógeno en presencia de oxígeno. Además, tiene la capacidad de producir, entre otros metabolitos: poli- β -hidroxibutirato (PHB), alginatos, y sideróforos.

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular capaces de solubilizar y quelar hierro. *A. vinelandii* produce cuatro diferentes sideróforos del tipo catecolatos y un sideróforo mixto del grupo de las pioverdinas. El gen *csbC* codifica para una enzima clave en la síntesis de catecoles, mientras que el gen *pvdS*, homólogo a un gen de *Pseudomonas aeruginosa* (muy cercana filogenéticamente a *A. vinelandii*), codifica para un factor sigma que activa la transcripción de genes involucrados en la síntesis de pioverdinas.

Además, la cascada de regulación Gac-Rsm, formada por el sistema de doble componente GacS/GacA y un sistema de control post-transcripcional conformado por pequeños RNA's reguladores y la proteína represora RsmA, se ha visto involucrada en la regulación de la producción de sideróforos en *A. vinelandii*. Esto se ha observado con mutantes en GacA que no producen pioverdinas y aumentan la producción de catecoles con respecto a la cepa silvestre y en mutantes en RsmA que presentan sobreproducción de pioverdinas con respecto a la cepa silvestre.

En el presente trabajo se generaron fusiones transcripcionales y traduccionales *csbC-gusA* y *pvdS-gusA* en *A. vinelandii* con el fin de estudiar la regulación que ejerce la proteína represora RsmA sobre la expresión de estos genes. Se observó que la regulación de la expresión es a nivel de la traducción, sin embargo, aún queda por dilucidar si la regulación que ejerce RsmA sobre *csbC* se lleva a cabo de forma directa o indirecta.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 GENERALIDADES DE *A. vinelandii*

A. vinelandii es una bacteria gram negativa perteneciente a las γ -Proteobacterias y a la familia *Pseudomonadaceae* que habita en suelo y agua. Es una bacteria poliploide, es decir, que presenta múltiples copias de su propio cromosoma (Punita *et al.*, 1989) y, dependiendo del medio y la fase de crecimiento en la que se encuentre, puede presentar desde 4 hasta más de 100 copias (Maldonado *et al.*, 1994). Bajo condiciones adversas, tiene la capacidad de diferenciarse morfológicamente en quistes (Figura 1) (Sadoff, 1975) que pueden resistir a la desecación por más de 10 años (Vela, 1974). Otra característica de *A. vinelandii* es que fija nitrógeno en presencia de oxígeno por lo que posee una tasa respiratoria muy alta a comparación de otras bacterias (Poole & Hill, 1997).

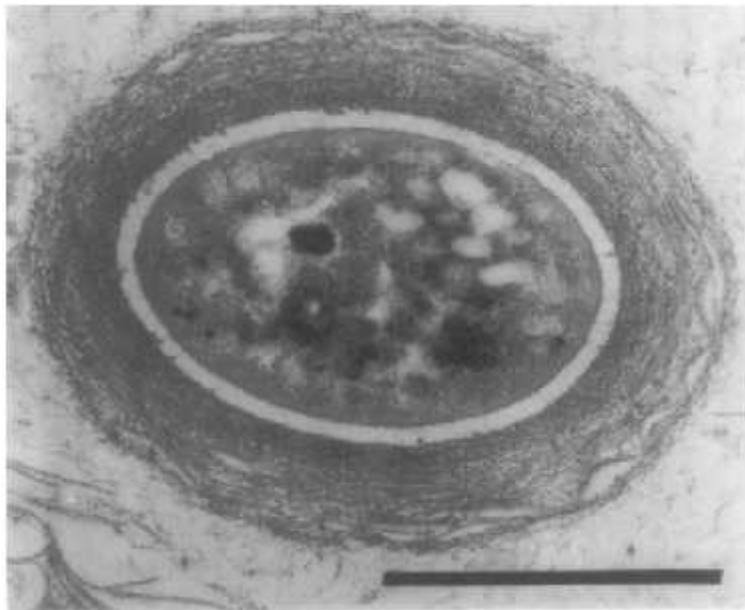


Figura 1. Quiste de *A. vinelandii*. La marca representa 1 μ m (Sadoff, 1975).

A. vinelandii posee un metabolismo secundario bastante versátil teniendo la capacidad de producir, entre otros metabolitos: poli- β -hidroxibutirato (PHB),

alginatos, y sideróforos. El PHB y los alginatos son polímeros de interés industrial, el primero es utilizado para fabricar plásticos biodegradables (Cho *et al.*, 2001), mientras que el segundo es utilizado como viscosante en la industria farmacéutica y alimenticia (Sabra *et al.*, 2001); en tanto, los sideróforos son compuestos importantes en la interacción que este microorganismo establece en su hábitat, así como su supervivencia en el mismo (Knosp *et al.*, 1984).

2.2 SIDERÓFOROS

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que tienen la capacidad de solubilizar y quelar hierro (Ahmed & Holmstrom, 2014). El hierro es un elemento esencial para la sobrevivencia bacteriana (así como de cualquier organismo) ya que se utiliza como cofactor para varias proteínas que participan en distintos procesos celulares como fijación de nitrógeno y respiración, y aunque es uno de los elementos químicos más abundantes es poco accesible para estos microorganismos por su rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Andrews *et al.*, 2003; Boukhalfa & Crumbliss, 2002). Las bacterias de suelo tienen que competir por el hierro disponible por lo que una herramienta fundamental para su sobrevivencia son los sideróforos (Faraldo-Gomez & Sansom, 2003). También, los sideróforos cumplen diversas funciones en el medio ambiente, tales como intemperización de rocas haciendo disponible el hierro a las bacterias de suelo, y contribución en el ciclo biogeoquímico del hierro en los océanos (Ahmed & Holmstrom, 2014).

2.2.1 Aplicaciones biotecnológicas

Además del papel que juegan en la naturaleza, los sideróforos han cobrado importancia en otras áreas por sus potenciales aplicaciones. En medicina se les ha dado diversos usos, como quelantes para prevenir efectos secundarios del exceso de hierro después de una transfusión, como acarreadores de antibióticos aprovechando los sistemas de transporte que poseen muchas bacterias y como

inhibidores de metaloenzimas involucradas en enfermedades inflamatorias y algunos tipos de cáncer (Kurth *et al.*, 2016). En la agricultura se ha visto que los sideróforos son capaces de controlar el crecimiento de hongos patógenos y promover el crecimiento de ciertas plantas beneficiando los cultivos, además muchos son capaces de descontaminar suelos y aguas de metales pesados e hidrocarburos y actúan como agentes de biocontrol contra ciertas algas y patógenos de peces (Kurth *et al.*, 2016; Ahmed & Holmstrom, 2014)

2.2.2 Clasificación

Los sideróforos, se clasifican de acuerdo al grupo funcional que interactúa con el hierro en tres tipos: carboxilatos, hidroxamatos y catecolatos (Ahmed & Holmstrom, 2014). Además de esos tipos hay algunos sideróforos que presentan diferentes grupos funcionales y a esos sideróforos se les llama de tipo mixto (Figura 2) (Miethke & Marahiel, 2007).

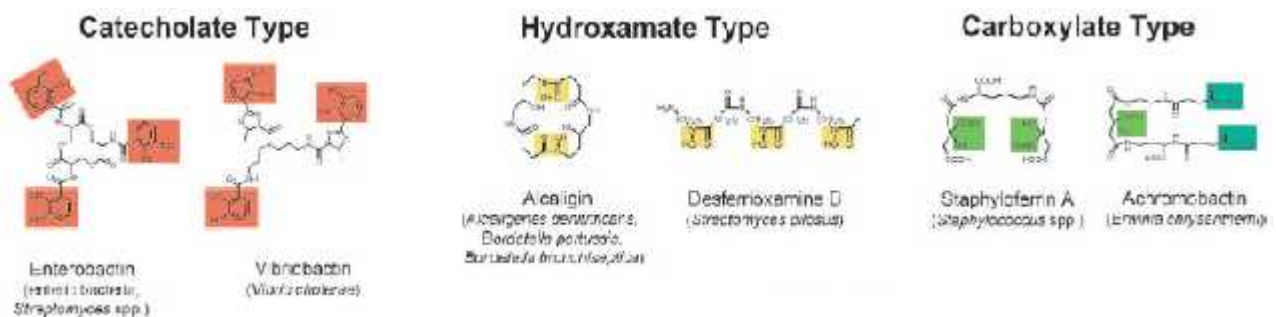


Figura 2. Tipos de sideróforos que muestran el grupo funcional que interactúa con el hierro (Miethke & Marahiel, 2007).

Algunos ejemplos de sideróforos del tipo de los catecolatos son la enterobactina producida por enterobacterias y vibriobactina producida por *Vibrio cholerae*; ejemplos de hidroxamatos son la putrebactina de *Shewanella putrefaciens* y coleliquelina de *Streptomyces coelicolor*; algunos carboxilatos son estafiloferrina producida por bacterias del género *Staphylococcus* y entre los sideróforos mixtos se encuentran la aerobactina (carboxilato-hidroxamato)

producida por algunas cepas de *Escherichia coli* y las pioverdinas (catecolato-hidroxamato) producidas por las pseudomonadaceas (Andrews *et al.*, 2003; Miethke & Marahiel, 2007; Visca *et al.*, 2006)

2.3 SIDERÓFOS EN *A. vinelandii*

A. vinelandii produce sideróforos de dos tipos diferentes: 4 del grupo de los catecolatos: azotoquelina, aminoquelina, protoquelina y DHBA (Ácido dihidroxibenzoico) en cuya estructura tienen el grupo catecol característico y son sintetizados a concentraciones ambientales de hierro $\leq 10 \mu\text{M}$. Si la concentración de hierro baja hasta $\leq 3 \mu\text{M}$ empieza la síntesis del otro sideróforo, la azotobactina (Tindale *et al.*, 2000); que pertenece al grupo de las pioverdinas, es un sideróforo mixto que posee una cadena peptídica unida a un cromóforo, el cual tiene la característica de emitir fluorescencia al ser sometido a luz ultravioleta (Figura 3) (Yoneyama *et al.*, 2011).

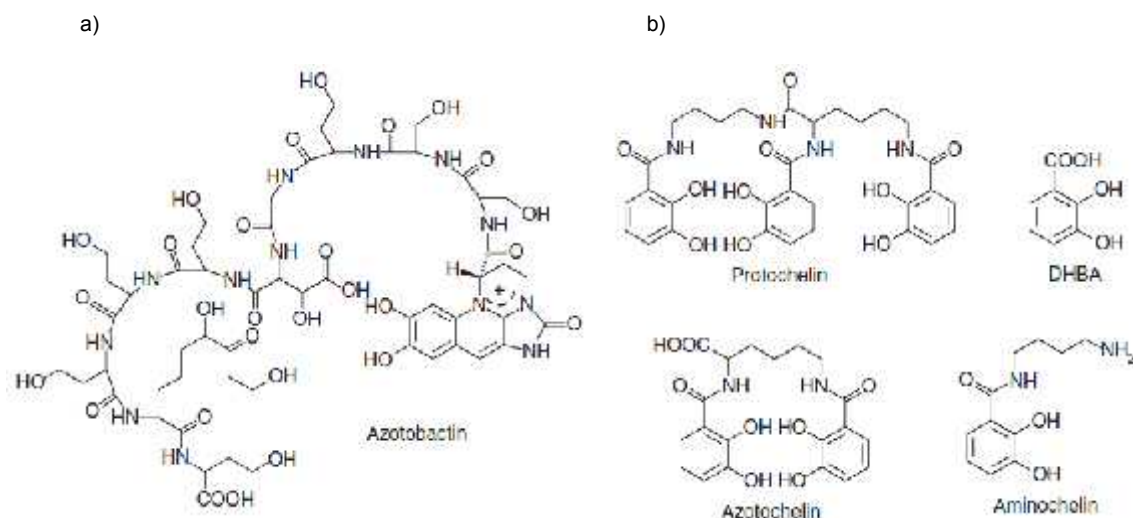


Figura 3. Estructura de los sideróforos producidos por *A. vinelandii*. (a) Pioverdinas. (b) Catecoles (Yoneyama, *et al.*, 2011).

2.3.1 Catecoles

En *A. vinelandii* se ha descrito un grupo de genes relacionados con la producción de catecoles (Figura 4), entre los cuales, los más estudiados, son una isocorismato sintasa codificada por el gen *csbC* (Tindale *et al.*, 2000) y una bomba de eflujo codificada por el gen *csbX* (Page *et al.*, 2003).

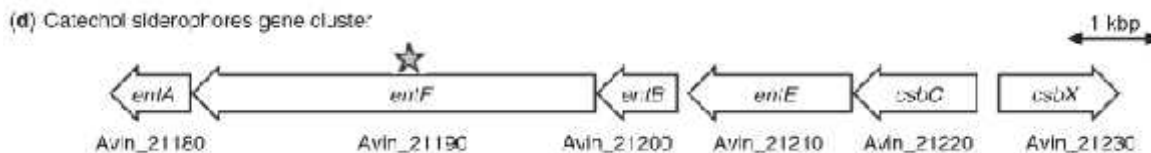


Figura 4. Grupo de genes relacionados con la síntesis de catecoles en *A. vinelandii*. (Yoneyama *et al.*, 2011).

Además de los anteriores, *A. vinelandii* posee genes homólogos a *entE*, *entB*, *entF* y *entA*, utilizados por *E. coli* para producir enterobactina (Yoneyama *et al.*, 2011).

2.3.2 Síntesis de catecoles

La síntesis de la mayoría de sideróforos se lleva a cabo a través de péptido-sintasas no ribosómicas (NRPS), sin embargo, como los catecoles no son polipéptidos, se sintetizan por Síntesis Independiente de NRPS.

Las rutas conocidas de síntesis de catecoles inician con la conversión de corismato en DHBA a través de tres enzimas: isocorismato sintasa, isocorismatasa y 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa (Balado, 2009). Como ya se dijo, *A. vinelandii* posee homólogos a los genes *entB* y *entA*, de *E. coli*, que codifican para las últimas dos enzimas; y posee también el gen *csbC* que codifica para la isocorismato sintasa (Tindale *et al.*, 2000). Este último gen sería el más importante del grupo al codificar para la enzima que cataliza el primer paso de la conversión (Figura 5).

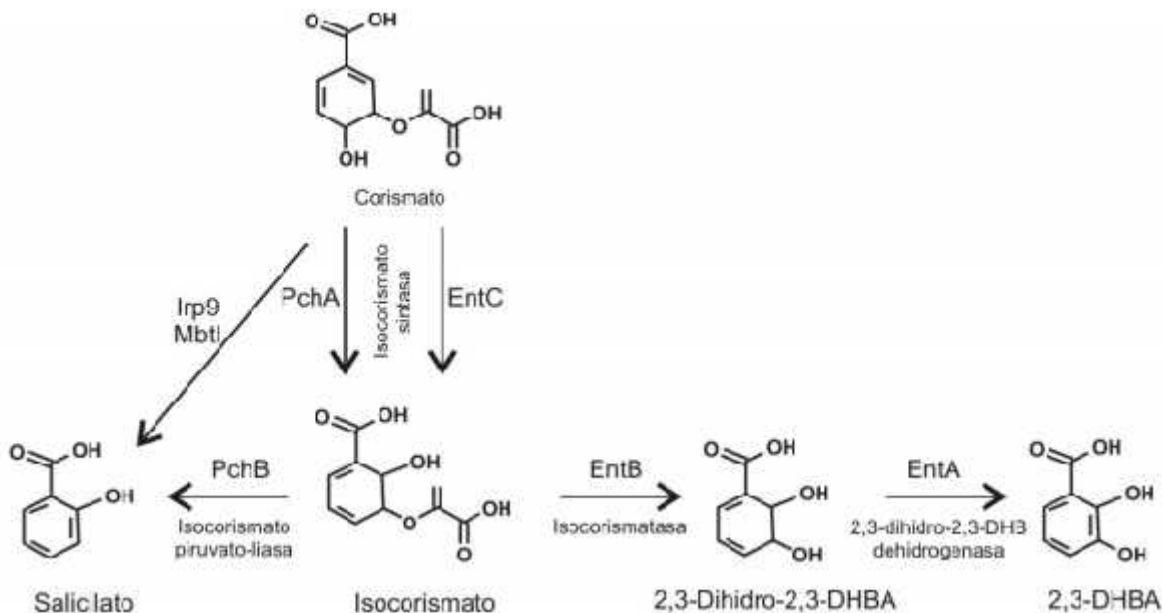


Figura 5. Conversión de corismato en DHBA por EntC, EntB y EntA. (Balado, 2009)

2.3.3 Pioverdinas

Respecto a los genes involucrados en la producción de pioverdinas en *A. vinelandii* se ha identificado, al igual que en el caso de los catecoles, una agrupación de genes involucrados con la síntesis de pioverdinas (Figura 6), que incluye genes homólogos a *pvdS*, *pvdI*, *pvdD* y *pvdA* de *Pseudomonas aeruginosa*. Entre estos genes, destaca *pvdS*, que codifica para un factor transcripcional que activa la expresión de los demás genes involucrados en la producción de pioverdinas tales como *pvdD* y *pvdI*, que, en *P. aeruginosa* codifican para NRPS (Yoneyama et al., 2011).

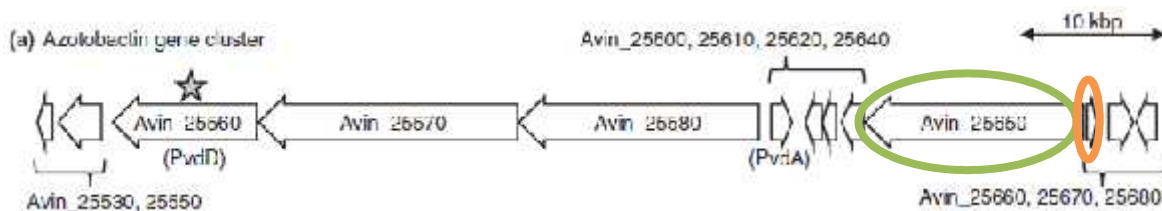


Figura 6. Grupo de genes relacionado con la síntesis de pioverdinas en *A. vinelandii*, se destacan *pvdS* (naranja) y *pvdI* (verde). (Yoneyama et al., 2011)

2.3.4 Síntesis de pioverdinas

La azotobactina es un sideróforo del grupo de las pioverdinas, que se caracterizan por tener una cadena polipeptídica. Este tipo de sideróforos es sintetizado por NRPS (Balado, 2009).

Las NRPS son enzimas multifuncionales muy grandes que se encargan del ensamblaje de polipéptidos que cumplen funciones muy específicas, estas enzimas poseen distintos dominios, de acuerdo a la reacción que catalizan, los cuales se encuentran organizados en módulos (Marahiel *et al.*, 1997).

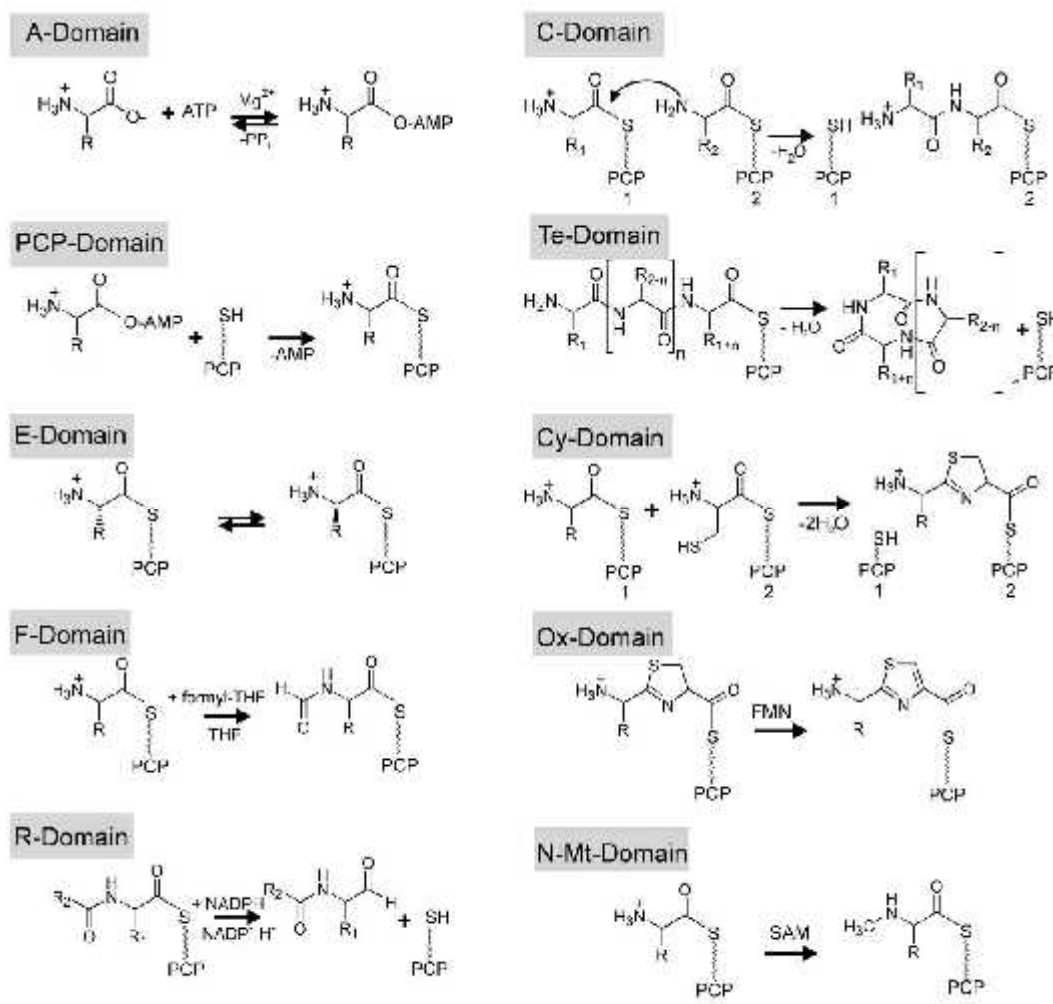


Figura 7. Dominios de las NRPS y reacciones que catalizan. (Schwarzer *et al.*, 2003)

A pesar de que en las NRPS existen muchos dominios que catalizan diferentes reacciones (Figura 7), los dominios esenciales son tres: el dominio A de adenilación, que reconoce el primer aminoácido y lo activa para iniciar la síntesis; el dominio PCP por proteína peptidil-acarreadora o dominio T, que permite el transporte de los aminoácidos activados para la elongación, y el dominio C de condensación, que se encarga de formar el enlace peptídico; otro dominio importante es el dominio Te de tioesterasa, que se encarga de liberar el polipéptido sintetizado (Schwarzer *et al.*, 2003).

Aunque en *A. vinelandii* no se ha descrito la ruta de síntesis de las pioverdinas, se puede tener una idea de cómo se lleva a cabo porque posee muchos genes homólogos a los de *P. aeruginosa*, en la que se sabe que el proceso de síntesis se lleva a cabo a través de NRPS (Yoneyama *et al.*, 2011) (Figura 8).

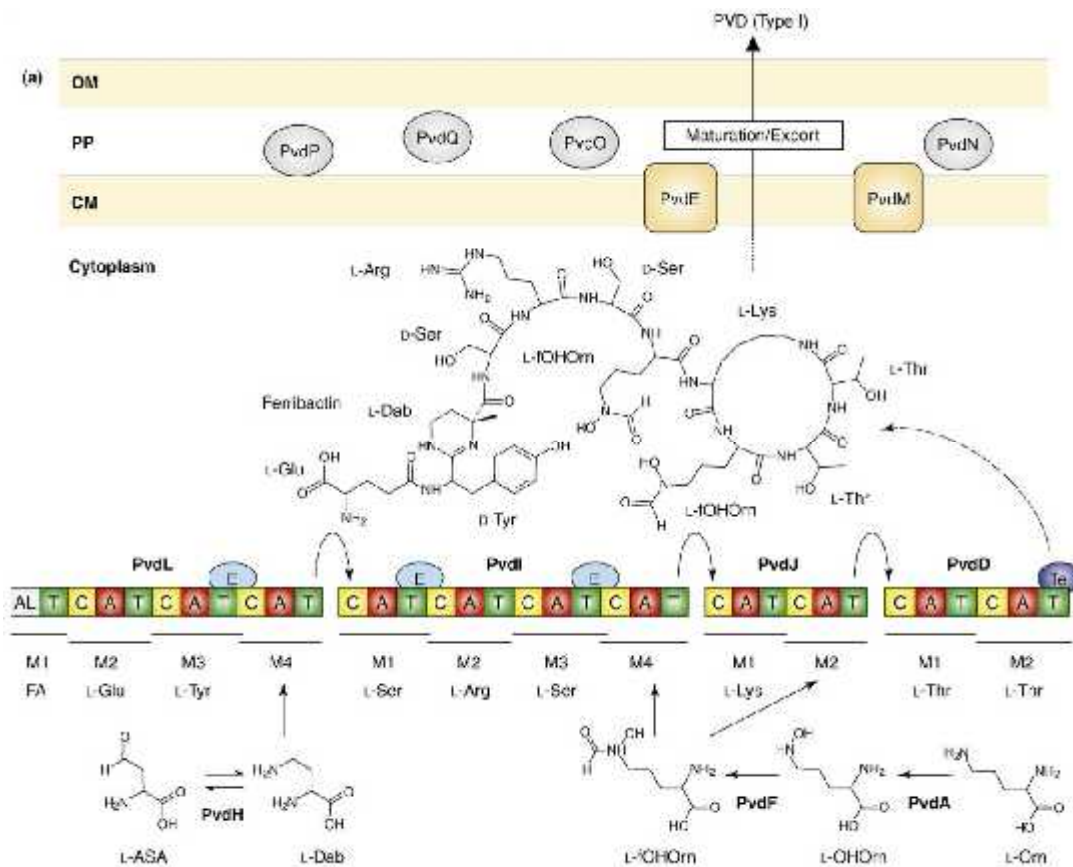


Figura 8. Vía de síntesis de pioverdinas en *P. aeruginosa*. (Visca *et al.*, 2006)

La síntesis de la cadena polipeptídica de las pioverdinas en *P. aeruginosa* se lleva a cabo en el citoplasma a través de una serie de NRPS, incluyendo a PvdI, esta cadena está unida a un cromóforo que se sintetiza de igual forma en el citoplasma y madura en el periplasma (Figura 9). Una vez unido el compuesto, se transporta al periplasma donde ocurre la maduración a través de otras enzimas y, posteriormente, se exporta el sideróforo maduro al espacio extracelular (Visca *et al.*, 2006).

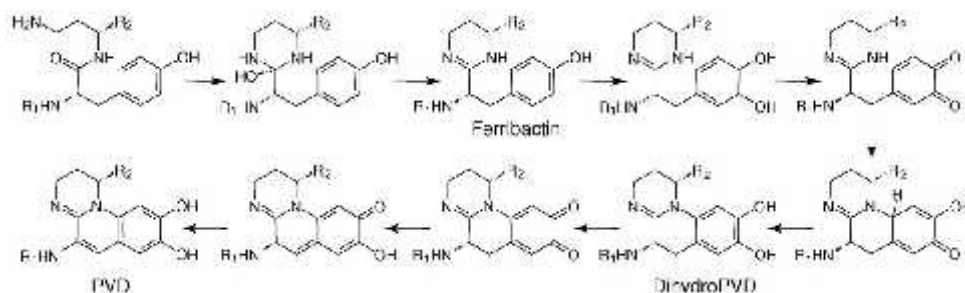


Figura 9. Esquema propuesto para la maduración del cromóforo de pioverdinas en *P. aeruginosa*. (Visca *et al.*, 2006)

En *A. vinelandii*, se cree que la síntesis de pioverdinas podría ocurrir de forma similar, ya que posee genes homólogos a los que codifican para las NRPS de *P. aeruginosa*.

2.4 SISTEMA DE DOBLE COMPONENTE GacS/GacA

Los sistemas de doble componente son mecanismos de transducción de señales a través de los cuales, los microorganismos responden a cambios en el medio ambiente. Generalmente, estos sistemas están formados por dos componentes. El primero es una proteína cinasa transmembranal con un dominio de unión a ATP que cataliza la fosforilación de una histidina al dimerizarse, esta cinasa histidínica tiene un dominio externo que funciona como sensor a los cambios ambientales y modula la actividad del dominio histidín-cinasa. El segundo componente es una proteína denominada regulador de respuesta con un residuo

aspartato al que el dominio de cinasa histidínica le transfiere el grupo fosfato y posee también un dominio efector que, generalmente, tiene sitios de unión a DNA y actúa como regulador transcripcional, activando o reprimiendo la expresión de genes blanco (Stock *et al.*, 1995).

Un ejemplo de sistemas de doble componente es el sistema GacS/GacA, que se encuentra ampliamente distribuido en bacterias de la clase de las γ -Proteobacterias (Goodier & Ahmer, 2001). Este sistema comprende la cinasa histidínica transmembranal GacS que se encarga de sensor señales del medio y, al recibir una señal y fosforilarse, activa a su regulador de respuesta GacA mediante fosfotransferencia (Figura 10).

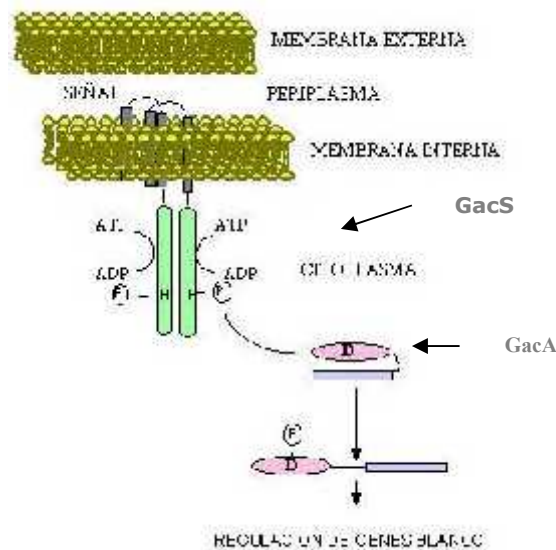


Figura 10. Sistema de doble componente GacS/GacA. (Reyes, 2009)

En muchas bacterias, la producción de metabolitos secundarios y otros procesos, están regulados por el sistema GacS/GacA. Se han descrito cerca de 20 homólogos a este sistema, y se ha observado que algunos ortólogos al sistema controlan la producción de sideróforos en bacterias cercanas filogenéticamente a *A. vinelandii* (Heeb & Haas, 2001) (Tabla 1).

Bacteria	Sistema ortólogo	Blancos de regulación
<i>A. vinelandii</i>	GacS/GacA (Castañeda <i>et al.</i> , 2001)	Alginato y poli- β -hidroxibutirato
<i>P. fluorescens</i>	GacS (ApdA)/GacA (Corbell & Loper, 1995)	Producción de antibióticos, HCN y proteasas, fosfolipasa C, ác. Indol acético y movilidad
<i>P. viridiflava</i>	PheN (Liao <i>et al.</i> , 1994)	Proteasas, pectato liasa, glucoronidasa, alginato y sideróforos
<i>P. aeruginosa</i>	GacS (LemA)/GacA (Reimann <i>et al.</i> , 1997)	Piocianina, HCN, lipasa, autoinductores (lactonas homoserínicas) y sideróforos
<i>P. marginalis</i>	LemA (GacS) (Liao <i>et al.</i> , 1997)	Pectato liasa, exoproteasa, levana y sideróforos
<i>E. coli</i>	BarA/SirA (Zhang & Normak, 1996)	Sideróforos , y receptores para complejo sideróforo-Fe, expresión de factores de virulencia implicados en invasividad y movilidad

Tabla 1. Sistemas de doble componente y sus blancos de regulación en distintas bacterias.

El sistema GacS/GacA, generalmente, ejerce regulación sobre diversos genes a través de sistemas de regulación post-transcripcional, como es el caso del sistema Rsm.

2.5 SISTEMA DE REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL Rsm

El sistema Csr fue descrito por primera vez en *E. coli*, es un sistema de regulación global de metabolismo secundario llamado Csr (por sus siglas en inglés carbon storage regulator) que controla algunas enzimas involucradas en glucólisis, gluconeogénesis, síntesis y degradación de glucógeno y ciclo del glioxilato. Este sistema consiste en la proteína CsrA con motivos de unión a DNA que reprime la expresión de ciertos genes y CsrB, una molécula de RNA no codificante que forma un complejo antagonizando los efectos de CsrA (Romero, 1998).

En varias especies de *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* existe un sistema homólogo al de *E. coli*, denominado Rsm (repressor of stationary phase metabolism) que está involucrado en distintos procesos como expresión de factores de virulencia, producción de metabolitos

antifúngicos y compuestos de almacén de fuentes de carbono (Sonnleitner & Haas, 2011).

Este sistema comprende de dos partes: una es RsmA, una proteína de unión a RNA y la otra son pequeños RNA's no codificantes de la familia Rsm que tienen motivos de unión a RsmA. Funciona con RsmA que se une cerca del sitio de unión a ribosoma de sus RNA's mensajeros blanco reprimiendo su traducción y promoviendo su degradación. Sin embargo, al activarse la transcripción de los pequeños RNA's no codificantes, éstos secuestran a la proteína RsmA, lo que elimina la represión promoviendo la traducción del RNA mensajero (Figura 11) (Sonnleitner & Haas, 2011).

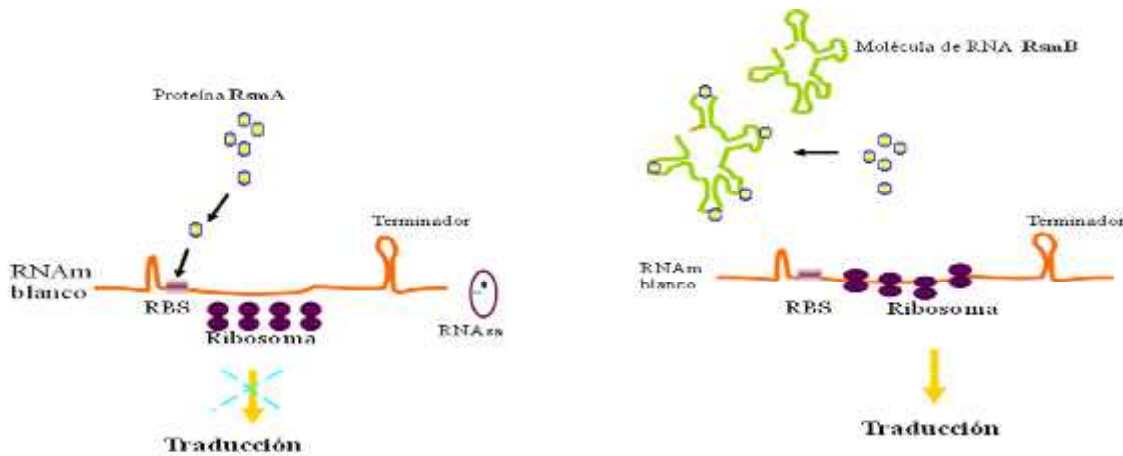


Figura 11. Modelo del sistema de regulación post-transcripcional Rsm. (Reyes, 2009)

2.6 CASCADA DE REGULACIÓN Gac-Rsm en *P. aeruginosa*

En *P. aeruginosa*, que es la bacteria filogenéticamente más cercana a *A. vinelandii* (Rediers et al., 2004), el sistema GacS/GacA regula varios factores de virulencia en conjunto con el sistema de regulación post-transcripcional Rsm, (Figura 12) (Nadal et al., 2012).

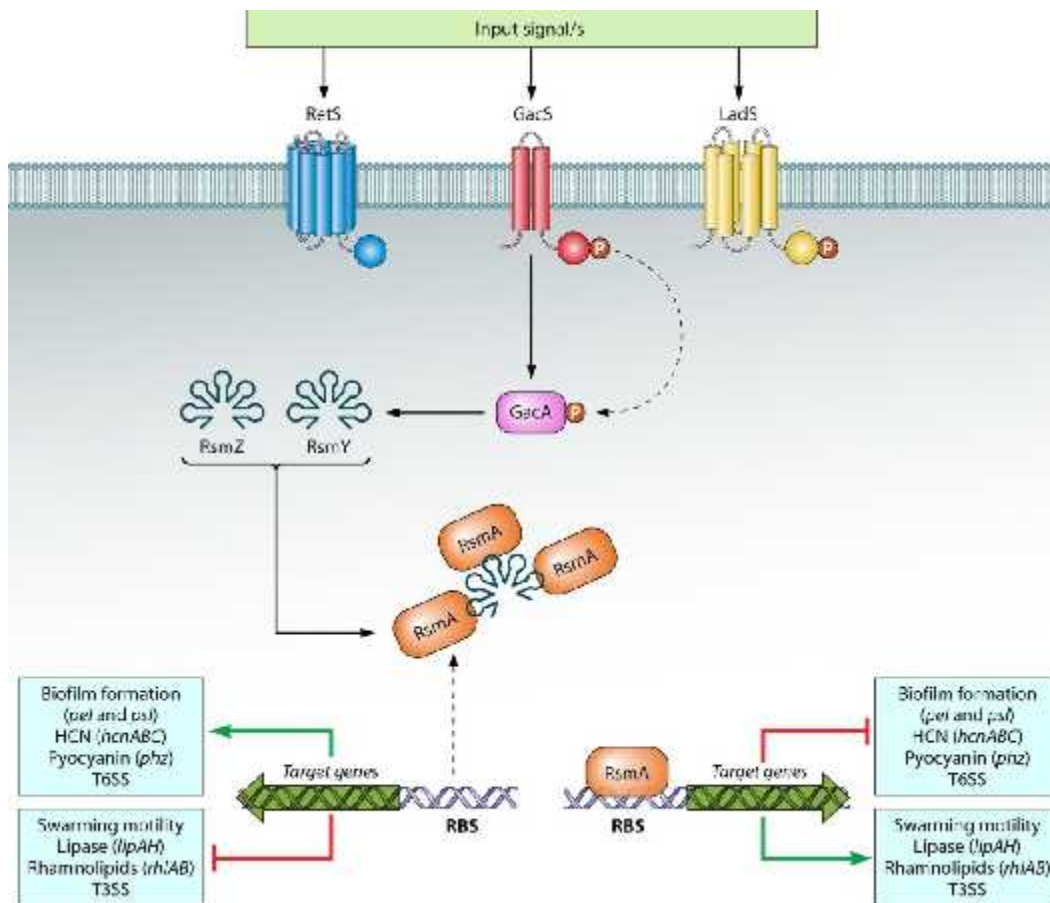


Figura 12. Regulación de genes de virulencia a través del sistema Gac-Rsm en *P. aeruginosa* (Nadal *et al.*, 2012)

Entre los factores de virulencia controlados por el sistema GacS/GacA de *P. aeruginosa* se encuentran los sideróforos; particularmente, la expresión de los genes de pioverdinas es controlada por la proteína PvdS, un regulador transcripcional que activa la transcripción de dichos genes (Tiburzi *et al.*, 2008) y se ha visto que la expresión de PvdS disminuye por el aumento en las concentraciones de la proteína RsmA (Burrowes *et al.*, 2006) lo que indica que la producción de pioverdinas está siendo regulada por el sistema Gac-Rsm, a través de PvdS aunque aún no está claro si RsmA ejerce su regulación de manera directa o indirecta.

3. ANTECEDENTES

3.1 SISTEMA Gac-Rsm EN *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* la cascada de regulación Gac-Rsm se ha visto involucrada en la regulación de la expresión de diversos genes de metabolismo secundario como alginato y PHB (Manzo *et al.*, 2011; Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la regulación sobre la producción de sideróforos en esta bacteria.

Debido a que en el grupo de trabajo se estudia el sistema de regulación Gac-Rsm, ya se tenían mutantes *EgacA* y *ErsmA* (mutantes en los genes que codifican para el regulador de respuesta GacA y la proteína represora RsmA, respectivamente) y se observó que en una mutante *EgacA* hay una disminución en la producción de pioverdinas, mientras que en una mutante *ErsmA* hay un aumento en su producción, ambas con respecto a la cepa silvestre E. Además, se observó que en la mutante *EgacA*, que no produce pioverdinas, hay una sobreproducción de catecoles con respecto a la cepa silvestre E (Figura 13).

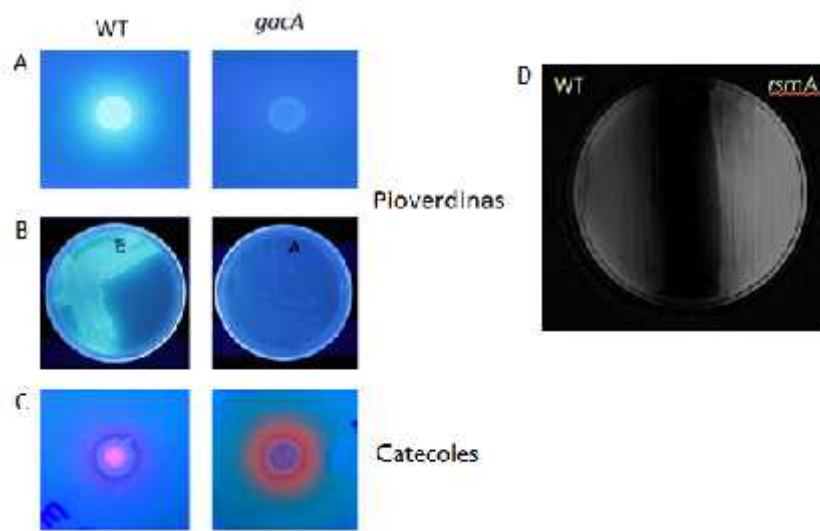


Figura 13. Visualización de sideróforos de *A. vinelandii*. Fotografía iluminada con luz UV donde se observa la fluorescencia emitida por las pioverdinas en la cepa silvestre E y en la mutante *gacA*,

(A) en colonia y (B) en placa. (C) Tinción de cromo azurol donde se observan los catecoles en color rojo en la cepa silvestre E y en la mutante *gacA*. (D) Fotografía iluminada con luz UV donde se observa un aumento en la producción de pioverdinas en la mutante *rsmA* con respecto a la cepa silvestre E (Morales, 2013).

Anteriormente, también en el laboratorio, se describieron sitios consenso de unión a la proteína RsmA en el genoma de *A. vinelandii* (López, 2011) y se encontró que existe un sitio de pegado a RsmA en la región reguladora del gen homólogo a *pvdS*, mas no se encontraron sitios de pegado a los genes involucrados en la producción de catecoles.

Todo lo anterior sugiere fuertemente que la producción de sideróforos podría estar siendo regulada por el sistema Gac-Rsm, sin embargo, queda por dilucidar de qué forma se regula.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se ha despertado el interés en los sideróforos tanto en la industria minera como en la agricultura, e incluso se les ve potencial en la medicina, por su capacidad como quelantes de hierro y otros metales, así como su gran afinidad por los mismos; pudiendo usarlos como antifúngicos y como potencial tratamiento para el envenenamiento por metales pesados. La realización de este trabajo tendrá como beneficio la generación de conocimiento sobre la regulación de los sideróforos producidos por *Azotobacter vinelandii*, lo que, posteriormente, podría facilitar la manipulación de su producción y mejorar los sectores antes mencionados.

5. HIPÓTESIS

La expresión de los genes involucrados con la síntesis de sideróforos en *Azotobacter vinelandii* es controlada por el sistema de regulación post-transcripcional Rsm.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del regulador RsmA sobre la expresión de los genes *pvdS* y *csbC* en *Azotobacter vinelandii*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar fusiones transcripcionales y traduccionales *pvdS-gusA* y *pvdI-gusA*
- Generar fusiones transcripcionales y traduccionales *csbC-gusA* y *csbX-gusA*
- Determinar la expresión de los genes *pvdS* y *csbC* en la cepa JGDEP y su derivada JGDEP*rsmA::Gm*.

7. RESULTADOS

7.1 GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES pUMATcgusAT y pUMATcgusAPT CON LAS REGIONES REGULADORAS DE LOS GENES *pvdS*, *pvdI*, *csbX* y *csbC*

En el laboratorio se diseñaron, previamente a este trabajo, vectores integrativos al cromosoma de *A. vinelandii* ya que no mantiene plásmidos (Figura 14). Estos vectores, que recombinan en un locus neutro *melA*, contienen el gen reportero *gusA* y son usados para construir fusiones transcripcionales con el vector en el que *gusA* no tiene promotor, y traduccionales, en el que *gusA* no tiene promotor ni sitio de unión a ribosoma (Cocotl-Yanez *et al.*, 2014).

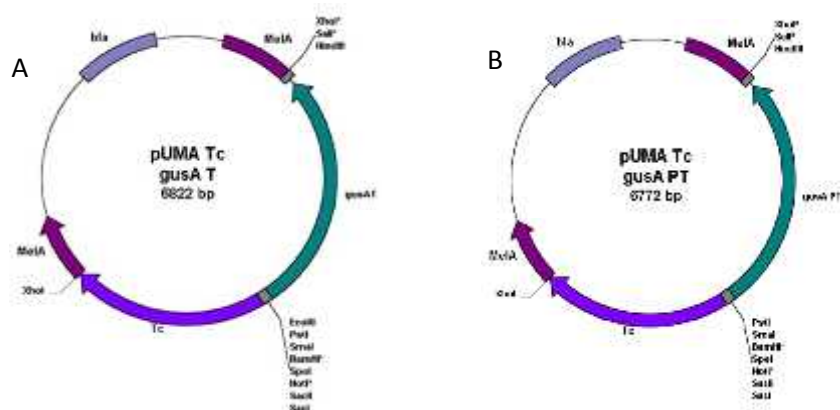


Figura 14. Vectores integrativos al cromosoma de *A. vinelandii* utilizados para hacer fusiones (A) transcripcionales y (B) traduccionales (Cocotl-Yanez *et al.*, 2014).

Se amplificó, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la región intergénica de los genes *pvdS* y *pvdI* para obtener las regiones reguladoras de ambos genes ya que son divergentes entre sí, y lo mismo se realizó para los genes *csbC* y *csbX* que también son divergentes entre sí (Figura 15).

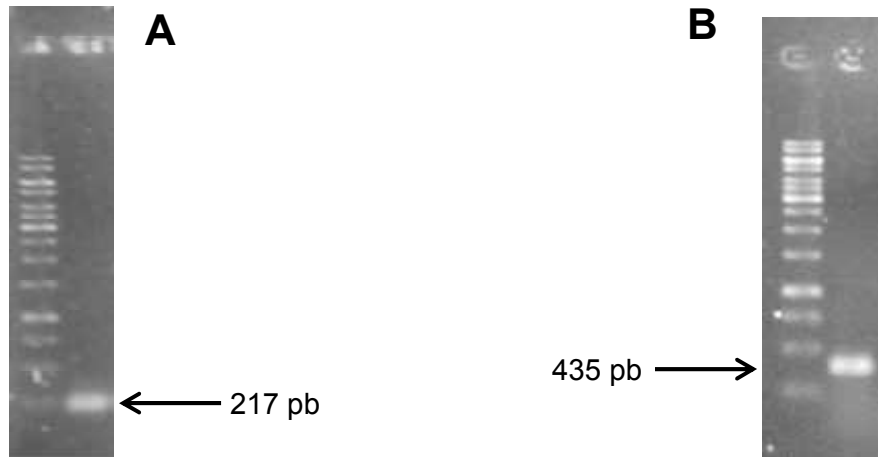


Figura 15. Amplicón de las regiones reguladoras (A) *csbC/cbsX* y (B) *pvdS/pvdI* con sus respectivos tamaños.

Los iniciadores RRpvdS_SacI contienen sitios de restricción artificiales SacI para poder clonar el amplificado en el vector (Figura 16).



Figura 16. Regiones reguladoras e iniciadores de los genes (A) *pvdS* y *pvdI* y de los genes (B) *csbC* y *csbX*.

Una vez obtenidas, las regiones reguladoras se sometieron a digestión con la enzima *SacI* (Apartado 10.6), al igual que los vectores pUMATcgusAT y pUMATcgusAPT, para posteriormente clonarlas en dichos vectores.

La cepa DH5α de *E. coli* se transformó con las ligaciones (Apartado 10.7) por electroporación (Apartado 10.8.2) y se sembró en placas de selección con Tetraciclina (20 mg/ml), posteriormente se extrajo DNA plasmídico (Apartado 10.3.1) para corroborar la orientación en que se ligaron las regiones reguladoras.

La orientación de la región reguladora clonada se comprobó por PCR utilizando los iniciadores específicos de cada región reguladora como oligonucleótidos delanteros y un iniciador dentro del marco de lectura del gen *gusA* como oligonucleótido reverso (Figura 17). Los oligonucleótidos utilizados deben amplificar 671 pb en el caso de las regiones reguladoras *pvdS* y *pvdI*, y 453 pb en el caso de *csbC* y *csbX*.

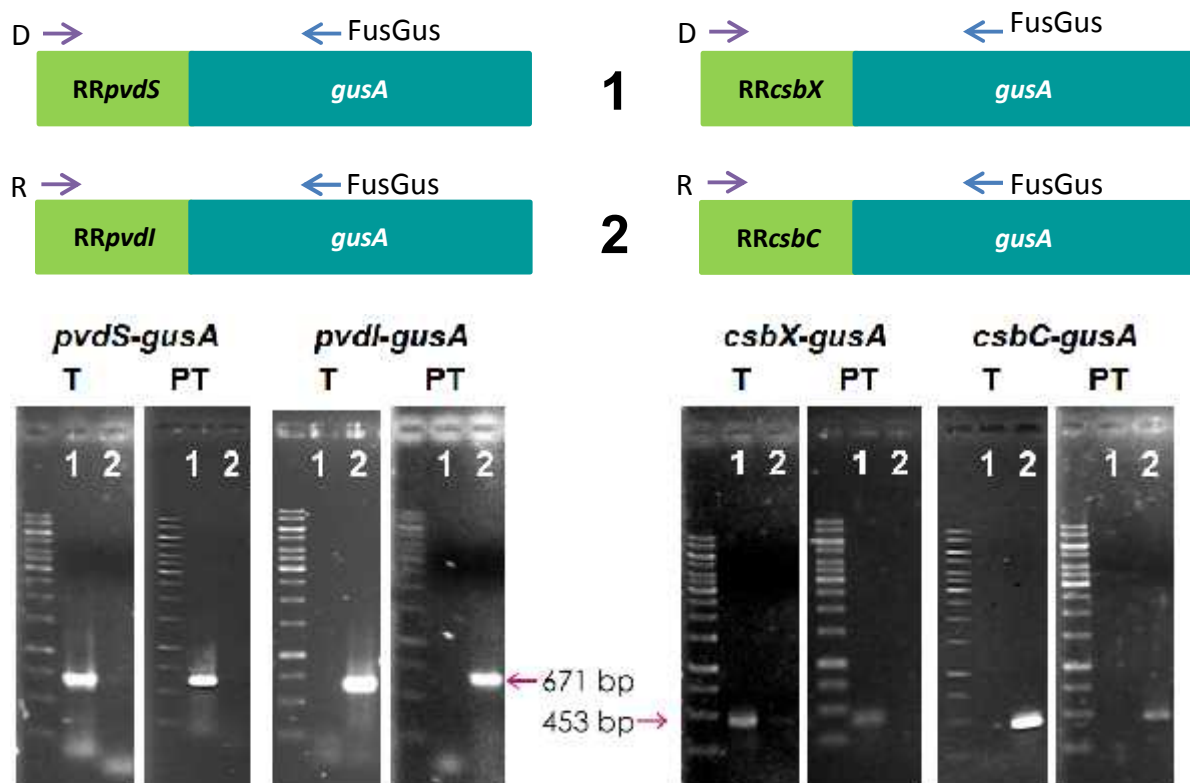


Figura 17. Representación de la región a amplificar en la PCR para comprobar la orientación de cada región reguladora (arriba), y el amplificado resultante (abajo).

7.2 GENERACIÓN DE LAS FUSIONES TRANSCRIPCIONALES Y TRADUCCIONALES *pvdS-gusA*, *pvdI-gusA*, *csbX-gusA* y *csbC-gusA*

Una vez obtenidas todas las construcciones, se extrajo DNA plasmídico por maxiprep (Apartado 10.3.2) para transformar la cepa JGDEP de *A. vinelandii*. La cepa JGEDP es una derivada no mucoide de la cepa silvestre E, se optó por utilizar esta cepa ya que solo se pueden obtener mutantes *rsmA* en fondos genéticos no productores de alginato. Al ser *A. vinelandii* una bacteria competente natural, la inducción de competencia para la transformación se consigue con varias resiembras en medio de competencia (CM) (Apartados 10.9.1 y 10.9.2). Una vez obtenidas las células competentes se pusieron en contacto con el DNA plasmídico para después seleccionar colonias que crecieran en placas con Tetraciclina (40 mg/ml).

A las candidatas obtenidas se les extrajo DNA genómico (Apartado 10.4) y luego se utilizó la PCR realizada para comprobar la orientación de las regiones reguladoras (Figura 9) esta vez para comprobar la presencia de la fusión en el cromosoma.

7.3 GENERACIÓN DE LAS MUTANTES *rsmA::Gm*

Una vez obtenidas las fusiones *gusA* en la cepa JGDEP, se generó en ésta la mutación en *rsmA*. Para realizar lo anterior se utilizó el plásmido mutagénico pGEM*rsmA::Gm* que porta el gen *rsmA* mutado con un casete de resistencia a Gentamicina insertado cerca del extremo carboxilo terminal (Morales, 2014). Se transformaron cada una de las cepas derivadas de la JGDEP, que portan las fusiones *gusA*, con DNA plasmídico del vector mutagénico antes mencionado.

Posteriormente para seleccionar las presuntas mutantes la transformación se sembró en placas de medio Burk-Sacarosa (BS) adicionado con Gentamicina (1.5 mg/ml). En la siguiente fase del experimento se comprobó que las candidatas

tuvieran la mutación en *rsmA* mediante análisis por PCR usando como molde DNA genómico de las candidatas.

La PCR se llevó a cabo con los iniciadores delantero y reverso del gen *rsmA* y con esta reacción pudimos determinar si las mutantes eran nulas o merodiploides (Figura 18). La condición merodiple se puede dar debido a que *A. vinelandii* es una bacteria poliploide (posee múltiples copias de su cromosoma), de esta forma en una cepa merodiploide se pueden encontrar copias (alelos) mutantes en algún grupo de cromosomas y alelos silvestres en otro grupo de cromosomas.

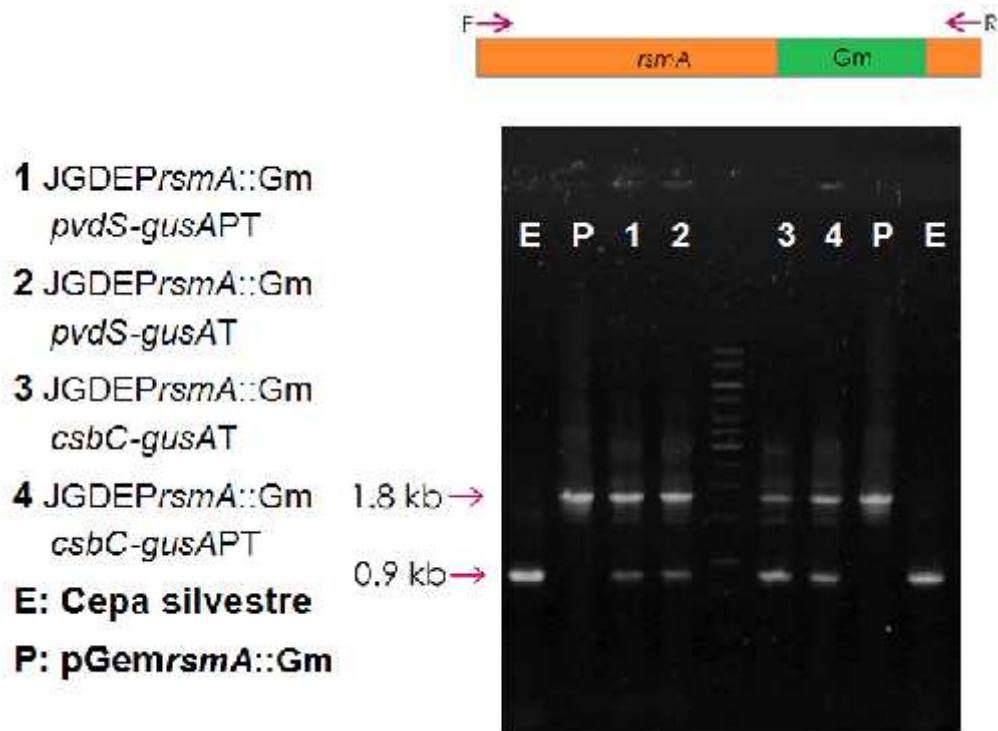


Figura 18. Electroforesis de fragmentos amplificados con oligonucleótidos externos del gen *rsmA*, en las mutantes *rsmA*::Gm con fusiones *pvdS-gusA* y *csbC-gusA*.

Todas las mutantes obtenidas fueron merodiploides, sin embargo, como presentan fenotipo característico de mutantes *rsmA*, se procedió a realizar el último objetivo particular con estas cepas.

7.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESION DE LAS FUSIONES *pvdS-gusA* Y *csbC-gusA*.

Una vez obtenida las cepas JGDEP*rsmA::Gm* con las fusiones transcripcionales y post-transcripcionales *pvdS-gusA* y *csbC-gusA*, se procedió a medir la actividad enzimática de la β -glucoronidasa (Apartado 10.11) codificada por el gen reportero *gusA*. Para realizarlo, se creció cada una de las cepas a 30°C en dos medios de cultivo: medio mínimo con hierro adicionado Burk-Sacarosa (BS) y medio de competencia sin hierro y molibdeno (CM), durante 24 horas.

No se observaron cambios en la actividad de las fusiones transcripcionales *csbC-gusA*, por lo que no se muestra ese dato. Lo mismo ocurrió con las fusiones transcripcionales *pvdS-gusA*.

Contrario a lo descrito, para la fusión traduccional *csbC-gusA* en medio CM se observó una menor actividad en la mutante *rsmA::Gm* con respecto a la cepa control (Figura 19B).

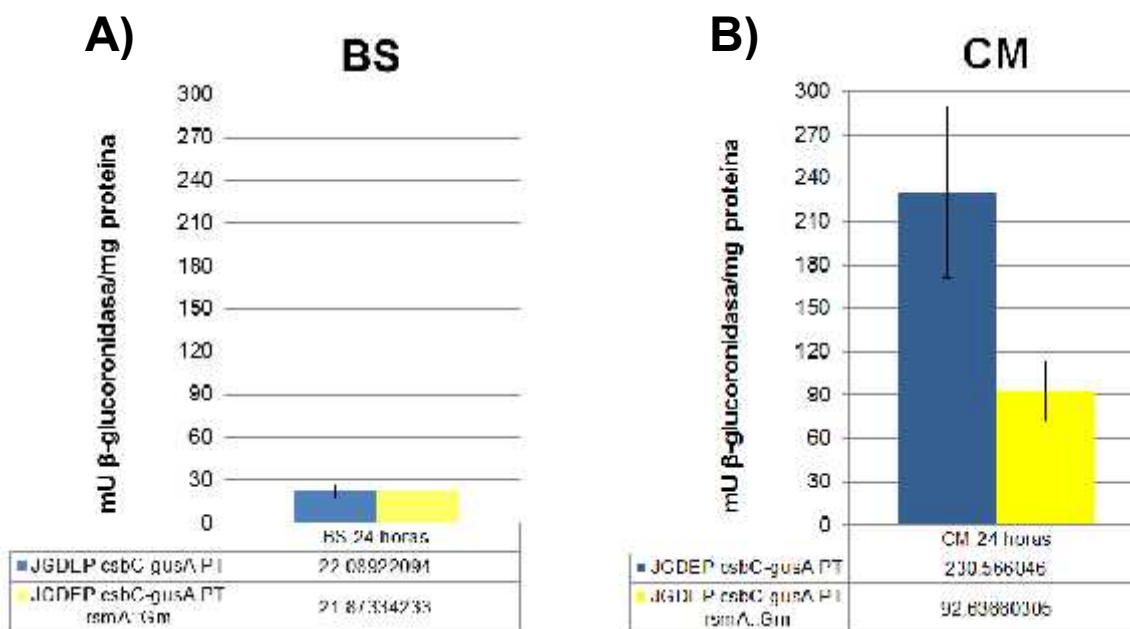


Figura 19. Cuantificación de actividad β -glucuronidasa a las 24 h de las fusiones *csbC-gusA* traduccionales en la cepa control JGDLP y en la mutante JGDLP*rsmA::Gm*, crecidas en medio mínimo BS (A) y en medio mínimo sin hierro CM (B).

En relación a la expresión del gen *pvdS*, como se puede observar en las gráficas, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la mutante *rsmA::Gm* y la cepa control (Figura 20A,B).

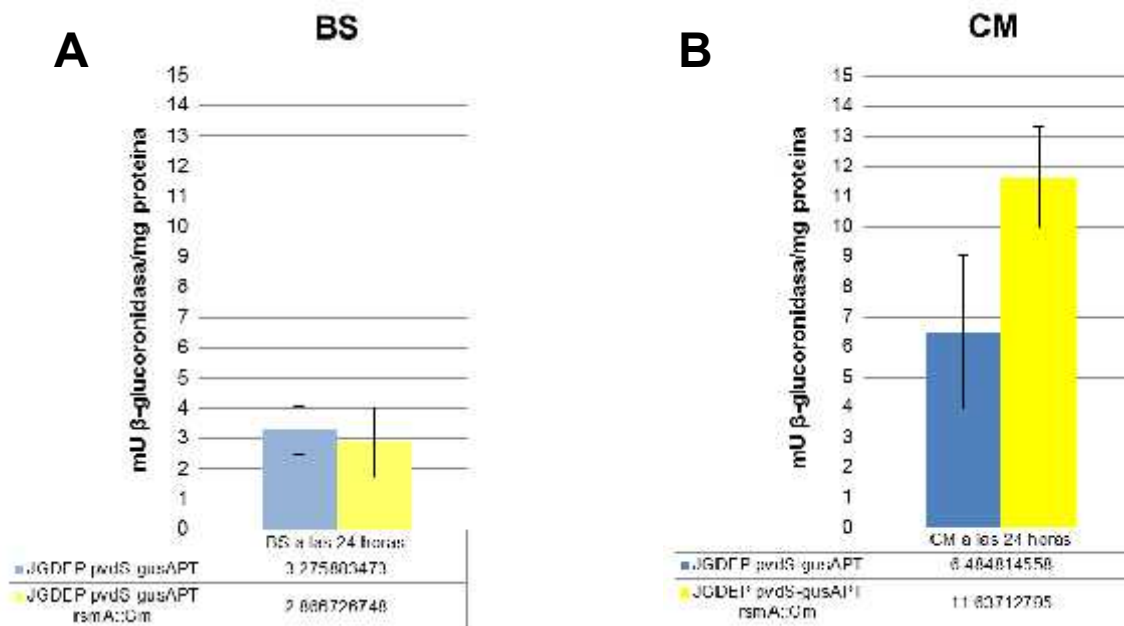


Figura 20. Cuantificación de actividad β-glucuronidasa a las 24 h de las fusiones *pvdS-gusA* transcripcionales (A,B) y traduccionales (C,D) en la cepa control JGDEP y en la mutante JGDEP*rsmA::Gm* crecidas en medio mínimo BS (A,C) y en medio mínimo sin hierro CM (B,D).

En medio BS no se observaron diferencias significativas en la actividad de las fusiones de ambas cepas.

8. DISCUSIÓN

En un trabajo previo en el laboratorio (Reyes, 2009), se estudió la regulación del sistema GacS/GacA sobre la síntesis de azotobactina en la cepa UW136 y se hipotetizó que podría ejercerse a través del sistema de regulación post-transcripcional Rsm. Sin embargo, no se estableció a qué nivel GacS/GacA podría llevar a cabo su regulación, ni se tocó el tema de la regulación de los catecolatos por lo que estos dos últimos puntos se quisieron abordar en este trabajo.

Para realizar este trabajo se utilizó a la cepa JGDEP en lugar de la cepa UW136. La cepa JGDEP no produce alginato por una mutación en el gen biosintético *algD*; como se mencionó antes, en el trabajo previo se utilizó la cepa UW136 que tampoco produce alginato pero ésta tiene una mutación en el gen *algU* que codifica para un el factor sigma E (σ^E) (Martínez-Salazar *et al.*, 1996), lo cual la convierte en fondo genético difícil de manejar para interpretar efectos de regulación.

Debido a que en *A. vinelandii* hay pocos estudios sobre la regulación de los genes involucrados en la producción de sideróforos, y por la cercanía filogenética de *A. vinelandii* con *P. aeruginosa*, esta última se ha tomado como guía estudiar la regulación de los sideróforos en la bacteria. Aun así hay muchos aspectos en los que difieren estas dos bacterias, uno de estos aspectos es la regulación de *pvdS*. En *A. vinelandii* se presume que *pvdS* está regulado directamente por RsmA ya que se han encontrado sitios putativos de unión a RsmA (López, 2011), mientras que en *P. aeruginosa* aunque la síntesis de pioverdinas está por RsmA no se han encontrado sitios de pegado a RsmA (Kulkarni *et al.*, 2014), lo que sugiere que la regulación de RsmA sobre la expresión de *pvdS* se lleva a cabo de manera indirecta (Burrowes *et al.*, 2006). Contrario a lo esperado los resultados obtenidos con la fusión *pvdS-gusA* traduccional no corresponden con a la hipótesis descrita anteriormente, aunque las desviaciones estándar de las mediciones no nos

permiten aseverar esto, la tendencia de los resultados del experimento sugieren que RsmA en *A. vinelandii* no controla de manera post-transcripcional la expresión de *pvdS*.

Otro aspecto no comparable entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* es que esta última produce dos tipos de sideróforos: pioverdinas y pioquelina (Brandel *et al.*, 2011) en tanto *A. vinelandii* produce pioverdinas y catecolatos. Este dato nos recuerda que aunque las dos bacterias son filogenéticamente cercanas la co-regulación de la síntesis de los dos tipos de sideróforos en ambas bacterias se puede llevar a cabo de manera diferente, a pesar de tener genes homólogos de la síntesis de pioverdinas.

Lo reportado en *A. vinelandii* en relación a la síntesis de sideróforos señala que existe producción diferenciada y compensatoria de catecoles y pioverdinas, es decir, si se produce una cantidad muy grande de pioverdinas los catecoles se ven disminuidos y viceversa (Yoneyama *et al.*, 2011). Lo anterior explica lo ocurrido en la mutante *gacA*, donde se presenta una disminución en la producción de pioverdinas y un aumento en la producción de catecoles. Este fenómeno podría ocurrir por dos mecanismos, uno relacionado con una respuesta de regulación genética diferencial, y otro relacionado con una regulación alostérica, donde la expresión de los genes sea la misma pero haya algo que bloquee o estimule la actividad enzimas productoras de catecoles y/o pioverdinas. Para dilucidar esta cuestión, se planteó generar fusiones de los genes *pvdS* y *csbC* involucrados en la producción de pioverdinas y catecoles. De esta forma, si encontráramos expresión genética diferencial, en la mutante *rsmA* la producción compensatoria de sideróforos podría estar controlada a nivel genético; y si no se encontrara tal cosa, el fenómeno de regulación podría ser fisiológico. Además, el uso de las fusiones transcripcionales y traduccionales podría determinar a qué nivel se llevaría a cabo dicha regulación.

Al analizar los datos obtenidos, se observa que en la mutante *rsmA* existen cambios en la expresión del gen *csbC* a nivel post-transcripcional, lo cual

concuerta con los cambios en las concentraciones de los catecoles en la mutante *gacA*. Los datos sugieren que en la mutante *gacA* se aumenta la producción de catecoles en respuesta a la ausencia de los sRNAs que contrarrestan la actividad de RsmA. Para la síntesis de los catecoles RsmA actuaría como un regulador positivo, así que al eliminarlo disminuiría la expresión de los genes de catecoles.

La regulación de la síntesis de catecoles ejercida por RsmA en *A. vinelandii*, muy probablemente no se da de forma directa, ya que ninguno de los genes involucrados con la producción de catecoles presentan sitios evidentes de unión a RsmA. Lo anterior sugiere que RsmA podría estar implicado en el control de algún regulador transcripcional que a su vez controla la expresión de dichos genes.

9. CONCLUSIONES

1. La cascada de regulación Gac-Rsm está involucrada en la regulación de la síntesis de sideróforos en *A. vinelandii*.
2. Dicha regulación está mediada por la proteína RsmA.
3. La regulación de la expresión del gen *csbC* se lleva a cabo a nivel traduccional.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 OLIGONUCLEÓTIDOS, CEPAS y VECTORES

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen a continuación (Tabla), así como los plásmidos (Tabla) y los oligonucleótidos utilizados (Tabla).

Nombre	Secuencia	Tm
RRpvdS_SacID	5' GTG AGC TCC ATC TCT GCA CCT TTC TCG 3'	64°C
RRpvdS_SacIR	5' CGG AGC TCC ATC AAC GCT TGC AGC AG 3'	64°C
RRcsbC_SacID	5' ACG AGC TCC ATG ATG CCT CCT TAC GG 3'	64°C
RRcsbC_SacIR	5' TCG AGC TCC ATG CTC TCT CCA AGT GA 3'	64°C
RsmA1kbF	5' ACG GCC GAA CCA GTT ACC AT 3'	61.6°C

*En rojo: Sitio de restricción generado para la enzima SacI

Tabla. Oligonucleótidos utilizados para generación de los plásmidos y posterior comprobación.

Bacteria	Cepa	Características	Referencia	Cultivo
E. coli	DH5α	EndA hsdR17 supE44 thi-1λ-recA1 gyrA96 retAΔlacU169Φ80 (ΔlacZΔM15)	Woodcock, <i>et al.</i> , 1989	Luria Bertani, 37°C
A. vinelandii	E	Fondo silvestre, NaI ^f	Larsen & Haug, 1971	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml
	JGDEP	Mutante derivada de la cepa E a la que se le removió la región que codifica para el sitio catalítico de la enzima, colocando en su lugar un casete de resistencia a Kanamicina	Morales, 2014	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Kanamicina 4mg/ml
	JGDEPrsmA::Gm	Mutante derivada de la cepa JGDEP con inserción en el extremo carboxilo terminal del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a Gentamicina	Morales, 2014	Burk-Sacarosa, Ac. nalidíxico 10 mg/ml, Kanamicina 4mg/ml, Gentamicina 1.5 mg/ml

Tabla. Bacterias y cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Características	Referencias
pGem T-easy	Vector de clonación para productos de PCR, <i>lacZ</i> , <i>Amp^r</i>	Promega
pGem-RRpvdS	Derivado del vector pGemT-Easy, contiene la región reguladora de los genes <i>pvdS</i> y <i>pvdI</i>	Este trabajo
pGem-RRcsbC	Derivado del vector pGemT-Easy, contiene la región reguladora de los genes <i>csbC</i> y <i>csbX</i>	Este trabajo
pGem <i>rsmA</i> ::Gm	Derivado del pGemT-Easy, porta el gen <i>rsmA</i> (1 kb) con inserción de un casete de resistencia a Gentamicina	Morales, 2014
pUMATcgusAT	Derivado del pUC19, vector integrativo (en <i>meIA</i>) para fusiones transcripcionales, <i>gusA</i> , <i>Tc^r</i>	Cocotl-Yanez <i>et al.</i> , 2014
pUMATcgusAPT	Derivado del pUC19, vector integrativo (en <i>meIA</i>) para fusiones traduccionales, <i>gusA</i> , <i>Tc^r</i>	Cocotl-Yanez <i>et al.</i> , 2014
pUMATcpvdSgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdS</i>	Este trabajo
pUMATcpvdIgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdI</i>	Este trabajo
pUMATccsbCgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>csbC</i>	Este trabajo
pUMATccsbXgusAT	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora del gen <i>csbX</i>	Este trabajo
pUMATcpvdSgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdS</i>	Este trabajo
pUMATcpvdIgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>pvdI</i>	Este trabajo
pUMATccsbCgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>csbC</i>	Este trabajo
pUMATccsbXgusAPT	Derivado del pUMATcgusAPT, contiene la región reguladora del gen <i>csbX</i>	Este trabajo

Tabla. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

10.2 MEDIOS DE CULTIVO

10.2.1 Luria Bertani (LB)

- Peptona de caseína 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 L

10.2.2 Burk-Sacarosa (BS)

Soluciones

- Sacarosa 20%: 200 g/L
- Buffer fosfatos (PO_4): K_2HPO_4 0.8 g/L + KH_2PO_4 0.2 g/L, pH 7
- Cloruro de calcio (CaCl_2): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.073 g/L
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4): Na_2SO_4 0.183 g/L
- Cloruro de magnesio (MgCl_2): $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.16 g/L
- Molibdato de sodio (Na_2MnO_4): $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0002 g/L
- Sulfato de hierro (FeSO_4): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L
- Agua destilada

10.2.3 Medio de competencia (CM)

Soluciones

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

10.2.4 Preparación BS y CM

BS	Volumen	CM
Sacarosa 20%	100 ml	Sacarosa 20% s/Fe
Buffer PO ₄	100 ml	Buffer PO ₄ s/Fe
CaCl ₂	10 ml	CaCl ₂ s/Fe
Na ₂ SO ₄	10 ml	Na ₂ SO ₄ s/Fe
MgCl ₂	1 ml	MgCl ₂ s/Fe
Na ₂ MnO ₄	1 ml	-
FeSO ₄	1 ml	-
H ₂ O destilada	800 ml	H ₂ O desionizada
Agar	15 g	Agar

10.3 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

10.3.1 Perclorato

Soluciones y reactivos

- Solución TES (Tris-EDTA-Sacarosa): Sacarosa 15%, Tris 50 mM a pH8.5, EDTA 50 mM a pH 8.0
- Lisozima 10 mg/ml
- NaClO₄ 5M
- RNAsa 10 mg/ml

Protocolo

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

1. Centrifugar 3 ml de cultivo.
2. Decantar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de MgSO₄.
3. Transferir todo a un tubo de 1.5 ml.
4. Centrifugar 10 segundos a 12000 rpm y decantar el sobrenadante.
5. Resuspender en 175 µl de solución TES.
6. Agregar 25 µl de lisozima.
7. Mantener 20 minutos en hielo.
8. Agregar 400 µl de agua helada destilada.

9. Incubar 15 minutos a 73°C.
10. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml.
12. Agregar 60 µl de NaClO₄.
13. 600 µl de Isopropanol y mezclar.
14. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm.
15. Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 70% 2 veces.
16. Secar a 55°C y resuspender en 30 µl de RNAsa e incubar 1 hora a 37°C.

10.3.2 Maxiprep

Soluciones y reactivos

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

Protocolo

1. Bajar las células de un cultivo de *E. coli* de 50 ml en LB líquido.
2. Lavar 1 vez con MgSO₄ 10 mM.
3. Agregar 2 ml de la Solución 1 y mezclar en el vórtex.
4. Agregar 3 ml de la Solución 2, mezclar despacio y dejar reposar de 1 a 2 min.
5. Agregar 2 ml de la Solución 3, mezclar despacio e incubar en hielo por 15 min.
6. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y recuperar sobrenadante.
7. Agregar un volumen de isopropanol e incubar 15 minutos en hielo.
8. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y decantar.
9. Lavar 2 veces con 2 ml de etanol al 70% y centrifugar por 2 minutos.
10. Secar la pastilla a 55°C e incubar toda la noche con 100 µl de RNAsa a 37°C.

10.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Soluciones y reactivos

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

Protocolo

1. Cosechar las células por centrifugación de un cultivo de *A. vinelandii* en 25 ml de medio.
2. Lavar 1 vez con MgSO₄ 10 mM.
3. Resuspender en 450 µl de buffer TE 50/20.
4. Agregar 50 µl de lisozima y 50 µl de proteasa e incubar 1 hora a 37°C.
5. Agregar 50 µl de SDS 10% e incubar 15 min a 37°C o hasta que se observe una solución turbia y viscosa.
6. Agregar 100 µl de NaCl 5M, mezclar e incubar 10 min a 65°C.
7. Adicionar 80 µl de CTAB (previamente incubado a 65°C) e incubar de 15 a 20 min a 65°C.
8. Agregar un volumen de una solución de Cloroformo-Alcohol isoamílico y dar vórtex.
9. Centrifugar 5 min a 10 mrpm y recuperar sobrenadante.
10. Agregar 10 µl de sílica y centrifugar 2 min a 10 mrpm.
11. Lavar la pastilla 3 veces con 600 µl New Wash y centrifugar 2 min.
12. Secar la pastilla a 55°C y resuspender en 30 µl de RNAsa a 37°C.
13. Centrifugar 2 min a 10 mrpm y recuperar sobrenadante.

10.5 ELECTROFORESIS

Soluciones y reactivos

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

Protocolo

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

1. Cargar en el primer pozo de un gel de agarosa el marcador de peso molecular de concentración conocida, seguido de las muestra de DNA en los pozos que siguen.
2. Teñir el gel en bromuro de etidio.
3. Visualizar en un transiluminador de luz UV.

10.6 DIGESTIÓN CON SmaI

Soluciones y reactivos

- Enzima de restricción SmaI (Tabla 2).
- Buffer PmaI, SmaI, Ecl36II 10x Thermo Scientific.

Enzima	Extremos generados	Temperatura de actividad(°C)	Corte de secuencia	Marca
SmaI	Cohesivos	37	5'-GAGCT↓C-3'	Thermo Scientific

Tabla 2. Características de la enzima SmaI.

Protocolo

1. Se mezcla en un tubo de 1.6 ml lo siguiente:
 - 30 μ l de plásmido a una concentración de 145 ng/ μ l.
 - 5 μ l de Buffer 10x.
 - 0.25 μ l de enzima Sacl.
 - 14.75 μ l de agua para un volumen final de 50 μ l.
2. Incubar la mezcla 2 horas a 37°C.
3. Para detener la reacción se incuba 20 minutos a 65°C.

10.7 LIGACIÓN CON T4 DNA Ligasa

Soluciones y reactivos

- Enzima T4 DNA Ligasa.
- Buffer T4 DNA Ligasa 10x Thermo Scientific.
- Adenosín Trifosfato (ATP)

Protocolo

1. Se mezcla en un tubo de 200 μ l lo siguiente:
 - 0.5-1 μ l de inserto y vector linearizado, manteniendo el orden de relación molar inserto-vector en una proporción 3:1.
 - 1 μ l de T4 DNA Ligasa Buffer 10x.
 - 1 μ l de ATP.
 - 0.5 μ l de enzima T4 DNA Ligasa.
 - Volumen de agua para alcanzar un volumen final de 10 μ l.
2. Incubar la mezcla toda la noche a 4°C.
3. Por la mañana, precipitar la ligación como sigue:
 - Llevar a un volumen de 50 μ l con agua destilada estéril.
 - Agregar 1 μ l de glucógeno y pasarlo todo a un tubo de 1.5 ml con 500 μ l de isopropanol.

- Mezclar despacio y dejar incubando 15 minutos a -70°C .
- Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y decantar.
- Lavar dos veces con etanol al 70% y secar la pastilla a 55°C .
- Guardar la pastilla o resuspenderla en 10 μl de agua destilada estéril si se va a utilizar en ese momento.

10.8 TRANSFORMACIÓN EN *E. coli*

10.8.1 Preparación de células competentes exprés

1. Partir de una placa fresca de *E. coli* en LB y resembrarla en 5 ml de LB líquido con antibiótico.
2. Dejarlo incubando a temperatura ambiente toda la noche (de 12 a 14 horas).
3. Por la mañana ponerlo a incubar en agitación a 37°C durante una hora o hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.5 aproximadamente.
4. Bajar las células y dividir las en 3 tubos de 1.5 ml o los resultantes, de tal manera que cada uno tenga una pastilla del tamaño de un miniprep.
5. Lavar la pastilla con 1 ml de agua destilada estéril 3 veces y decantar.
6. Agregar 500 μl de glicerol al 10% y resuspender con cuidado.
7. Centrifugar, decantar y resuspender en el volumen residual.
8. Guardar los tubos en el ultracongelador o electroporar en ese momento, de preferencia.

Nota: al lavar la pastilla, se debe resuspender muy despacio para evitar romper las células y se centrifuga a 10mrpm durante 3 minutos a 4°C cada vez, todo se hace en esterilidad.

10.8.2 Transformación por electroporación

1. A un tubo con células competentes de *E. coli* se le agregan 10 μl de ligación precipitada.
2. Se pasa todo a una celda de electroporación de 2 mm.

3. Se coloca la celda en el portaceldas con la muesca hacia el frente y se introduce en el electroporador.
4. Se elige el programa Ec2, se presiona el botón "Pulse" y se debe escuchar un sonido agudo y breve, si se escucha un pequeño trueno significa que fracasó la transformación.
5. Se saca la celda del electroporador, se le agregan 800 μ l de medio SOC y se mezcla despacio con la pipeta.
6. Se pasa el contenido a un tubo estéril de 1.5 ml y se incuba en agitación durante 1 hora a 37°C.
7. Al terminar, se siembra en placas de selección, de medio LB con los antibióticos correspondientes.

10.9 TRANSFORMACIÓN EN *A. vinelandii*

10.9.1 Preparación de células competentes

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

10.9.2 Transformación

1. Se toman 200 μ l de células competentes de *A. vinelandii* y se le agregan de 10 a 50 μ l de plásmido, dependiendo de la concentración del mismo, y se mezcla despacio.

2. Se depositan los 200 μ l de células en el centro de una placa pequeña de CM con una pipeta, cuidando que el líquido no se derrame por toda la superficie.
3. Se deja secar en esterilidad y se incuba por 48 horas a 30°C.
4. Se recogen las células con un asa grande y se depositan en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM, se lavan 2 veces con $MgSO_4$ 10 mM.
5. Se siembran 200 μ l en placas de selección, de medio BS con los antibióticos correspondientes.

10.10 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY

Soluciones y reactivos

- Solución reactiva: 1 ml de solución B + 1ml de solución C + 98 ml de solución A
- Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1N
- Solución B: Tartrato de Na y K 2%
- Solución C: $CuSO_4$ 1%
- Folin 1:2

Protocolo

1. Centrifugar 25 ml de cultivo de 24 horas hasta obtener paquete celular.
2. Lavar las células con $MgSO_4$ 10 mM y resuspender en 1 ml.
3. Tomar 10 μ l y llevarlo a un volumen final de 200 μ l con $MgSO_4$.
4. Agregar 1 ml de la solución reactiva, mezclar y dejar reposar 10 minutos.
5. Agregar 100 μ l de folin y dejar reposar 30 minutos.
6. Medir absorbancia a 625 nm.
7. Correr al mismo tiempo una curva de calibración usando Albúmina Sérica Bovina de un stock a 2mg/ml como sigue y tratar igual que al problema:

Albúmina	$MgSO_4$	Vf
2 μ l	198 μ l	200 μ l
4 μ l	196 μ l	200 μ l
8 μ l	192 μ l	200 μ l
16 μ l	184 μ l	200 μ l
32 μ l	168 μ l	200 μ l

10.11 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD β -GLUCORONIDASA

Soluciones y reactivos

- Buffer Z
- Lisozima 10 mg/ml
- Tritón al 10%
- PNPG
- Na_2CO_3

Protocolo

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

11. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, E. & HOLMSTROM, S. J. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol*, 7, 196-208.
- ANDREWS, S. C., ROBINSON, A. K. & RODRIGUEZ-QUIÑONES, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 215-237.
- BALADO, D. M. 2009. Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.
- BOUKHALFA, H. & CRUMBLISS, A. L. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals*, 15, 325–339.
- BRANDEL, J., HUMBERT, N., ELHABIRI, M., SCHALK, I. J., MISLIN, G. L. A. & ALBRECHT-GARY, A. M. Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Trans*, 41, 2820-2834.
- BURROWES, E., BAYSSE, C., ADAMS, C. & O'GARA, F. 2006. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Journal of Microbiology*, 152, 405-18.
- CASTANEDA, M., SANCHEZ, J., MORENO, S., NUNEZ, C. & ESPIN, G. 2001. The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 183, 6787-93.
- CHO, K. S., RYU, H. W., PARK, C. H. & GOODRICH, P. R. 2001. Utilization of Swine wastewater as a feedstock for the production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Journal of Biosciencie and Bioengineering*, 91, 129-133.
- COCOTL-YANEZ, M., MORENO, S., ENCARNACION, S., LOPEZ-PLIEGO, L., CASTANEDA, M. & ESPIN, G. 2014. A small heat-shock protein (Hsp20)

- regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 160, 479-87.
- CORBELL, N. & LOPER, J. E. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 177, 6230-6236.
- FARALDO-GOMEZ, J. D. & SANSOM, M. S. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 105-16.
- HEEB, S. & HAAS, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 1351–1363.
- HERNANDEZ-ELIGIO, A., MORENO, S., CASTELLANOS, M., CASTAÑEDA, M., NUÑEZ, C., MURIEL-MILLAN, L. F. & ESPIN, G. 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 158, 1953-1963.
- IMPERI, F., TIBURZI, F., FIMIA, G. M. & VISCA, P. 2010. Transcriptional control of the pvdS iron starvation sigma factor gene by the master regulator of sulfur metabolism CysB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 12, 1630-1642.
- KNOSP, O., VON TIGERSTROM, M. & PAGE, W. J. 1984. Siderophore-mediated uptake of iron in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 159, 341-347.
- KULKARNI, P. R., JIA, T., KUEHNE, S. A., KERKERING, T. M., MORRIS, E. R., SEARLE, M. S., HEEB, S., RAO, J. & KULKARNI, R. V. 2014. A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research*, 42, 6811-6825.
- KURTH, C., KAGE, H. & NETT, M. 2016. Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications. Manuscript accepted. *Organic and Biomolecular Chemistry*.

- LARSEN, B. & HAUG, A. 1971. Biosynthesis of alginate: Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydrate Research*, 17, 287-296.
- LIAO, C. H., MCCALLUS, D. E. & FETT, W. F. 1994. Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7, 391-400.
- LIAO, C. H., MCCALLUS, D. E., FETT, W. F. & KANG, Y. 1997. Identification of gene loci controlling pectate lyase production and soft-rot pathogenicity in *Pseudomonas marginalis*. *Journal of Microbiology*, 43, 425-431.
- LOPEZ, P. L. 2011. Búsqueda de sitios consenso de unión de la proteína RsmA en el genoma de *Azotobacter vinelandii* dj. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- MALDONADO, R., JIMENEZ, J. & CASADESUS, J. 1994. Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology*, 176, 3911-3919.
- MANZO, J., COCOTL-YAÑEZ, M., TZONTECOMANI, T., MARTINEZ, V. M., BUSTILLOS, R., VELASQUEZ, C., GOIZ, Y., SOLIS, Y., LOPEZ, L., FUENTES, L. E., NUÑEZ, C., SEGURA, D., ESPIN, G., & CASTAÑEDA, M. 2011. Post-Transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene algD by the Gac /Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 21, 147-159.
- MARAHIEL, M. A., STACHELHAUS, T. & MOOTZ, H. D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.*, 97, 2651-2674.
- MARTINEZ-SALAZAR, J. M., MORENO, S., NÁJERA, R., BOUCHER, J. C., ESPÍN, G., SOBERÓN-CHAVEZ, G. & DERETIC, V. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators

- MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 178, 1800-1808.
- MIETHKE, M. & MARAHIEL, M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 413-51.
- MORALES, R. E., 2013. Estudio de los pequeños RNA's reguladores involucrados en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- MORALES, S. P. I. 2014. Generación y caracterización de mutantes rsmA en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- NADAL, P., KOCH, G., THOMPSON, J. A., XAVIER, K. B., COOL, R. H. & QUAX, W. J. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76, 46-65.
- PAGE, W. J., KWON, E., CORNISH, A. S. & TINDALE, A. E. 2003. The csbX gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 211-216.
- POOLE, R. K. & HILL, S. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* — Roles of the terminal oxidases. *Bioscience reports*, 17, 303-317.
- PUNITA, JAFRI, S., REDDY, M. A. & DAS, H. K. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 171, 3133-3138.
- REDIERS, H., VANDERLEYDEN, J. & DE MOT, R. 2004. *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, 150, 1117-1119.
- REIMMANN, C., BEYELER, M., LATIFI, A., WINTELER, H., FOGLINO, M., LAZDUNSKI, A. & HAAS, D. 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl/homoserine lactone and the formation of the virulence factors, pyocyanin, cyanide and lipase. *Molecular Microbiology*, 24, 309-319.

- REYES, V. L. 2009. Estudio de la regulación genética de la producción del sideróforo Azotobactina en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- ROMEO, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology*, 29, 1321-1330.
- SABRA, W., ZENG, A. P. & DECKWER, W. D. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 315-325.
- SADOFF, H. L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological reviews*, 39, 516-539.
- SCHWARZER, D., FINKING, R. & MARAHIEL, M. A. 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 275-287.
- SONNLEITNER, E. & HAAS, D. 2011. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, 63-79.
- STOCK, J. B., SURETTE, M. G., LEVIT, M. & PARK, P. 1995. Two-Component signal transduction systems: Structure-Function relationships and mechanisms of catalysis. *Two-Component Signal Transduction*, 25-51.
- TIBURZI, F., IMPERI, F. & VISCA, P. 2008. Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 67, 213-27.
- TINDALE, A. E., MEHROTRA, M., OTTEM, D. & PAGE, W. J. 2000. Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology*, 146, 1617-1626.
- VELA, G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Applied Microbiology*, 28, 77-79.

- VISCA, P., IMPERI, F. & LAMONT, I. L. 2006. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *TRENDS in Microbiology*, 15, 22-30.
- WOODCOCK, D. M., CROWTHER, P. J., DOHERTY, J., JEFFERSON, S., DE CRUZ, E., NOYER-WEIDNER, M., SMITH, S. S., MICHAEL, M. Z. & GRAHAM, M. W. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17, 3469-3478.
- YONEYAMA, F., YAMAMOTO, M., HASHIMOTO, W. & MURATA, K. 2011. *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum. *J Appl Microbiol*, 111, 932-938.
- ZHANG, J. P. & NORMAK, S. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science*, 273, 1234-1236.