

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Departamento de Microbiología Molecular

Estudio de la regulación que ejerce el gen *psrA* en la
síntesis de Alginato, PHB y AR's en *A. vinelandii*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Presenta:

MIGUEL COCOTL YÁÑEZ

Director de tesis:

Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo



FEBRERO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se realizo en el departamento de Microbiología
Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la
Dra. Eida Guadalupe Espín Ocampo.**

Dedicado a mis dos grandes ángeles de la guarda: mi pequeño Haziél y mi
pequeño Uriel.

Agradecimientos.

A Dios. Gracias.

A la Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo. Totalmente agradecido por haberme aceptado en su grupo de investigación y más aún por ser mi guía en este camino de la ciencia. Gracias por todo su apoyo, por escucharme y por todas las observaciones hechas. Estoy infinitamente agradecido.

Al comité tutorial: Dr. Mario Soberon y Dr. Victor Bustamente. Por todo el entusiasmo puesto en este proyecto y por cada una de sus observaciones. Aprendo de los mejores!!!

Al comité revisor. Gracias a cada uno por tomar tiempo en la crítica de este trabajo, cada una me sirve para ir creciendo profesionalmente.

A la Bióloga Soledad Moreno, Doña Sol!!!!. Muchas gracias por todo el apoyo que me brindo en este proyecto, gracias por sus consejos en base a su experiencia, por ser una excelente maestra.

A la Maestra Josefina Guzmán. Muchas gracias por todo su apoyo en mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Miguel Castañeda. Por todo el apoyo que me ha brindado en la realización de este proyecto, por su complicidad conmigo y la ciencia.

A los Espín. Dra. Cinthia y Dr. Daniel, Claudia, Viri, Armando, Deborah, Felipe, Miguel M, Libertad, Claudia, Rosalva, Dn. Lalo y Dn. Pablo. Especialmente a Nashbly, Yanet y Alberto. Gracias por todo el apoyo brindado y por dibujar en mi siempre una sonrisa 😊.

A los Merino. A todos y cada uno de ustedes por hacer mi estancia en el laboratorio ligera, en particular a Zuemy, Mario, Christian y Viri.

Finalmente al **CONACYT** por el apoyo económico y a la **UNAM**.

Dedicatorias.

A mis familia. Ustedes son el motor que hacen que camine este tractor obstinado. Este no es mi triunfo sino el de ustedes. Siempre han sido apoyo incondicional en mis decisiones no solo profesionales sino personales, tantos aprendizajes de ustedes. Dedico también este avance a los dos pequeños miembros de la familia, que han cambiado nuestras vidas y en particular la mía... los amo!!!

A mis amigos. Meche, Dayna y Enrique. Por seguir acompañándome en mi camino, siempre estando ahí cuando los necesito y estando yo cuando me necesitan. También son parte importante de mi vida.

A mis biomedicos. Fueron la familia elegida en el camino de la universidad, aunque la vida nos ha llevado por caminos distintos, siempre hay uno que nos une, el lazo afectivo que nos tenemos. Un biomedico mas, loco por la ciencia.

Finalmente dedico este proyecto a toda la gente que de forma efímera o perenne han tocado mi vida y que han aportado grandes ideas, sentimientos, risas, llantos, desvelos, cansancios, tristezas, alegrías... Gracias a todos aquellos que han creído en mí. Gracias a los que no.

INDICE

I. Resumen	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
1.2 Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i>	3
1.3 Alginato: composición, función biológica, aplicaciones y biosíntesis	3
1.3.1 Composición y función biológica	3
1.3.2 Aplicaciones	4
1.3.3 Biosíntesis	4
1.3.4 Genética molecular de la biosíntesis de alginato	5
1.4 PHB: composición, aplicaciones, función biológica, y biosíntesis	5
1.4.1 Composición	5
1.4.2 Aplicaciones	5
1.4.3 Función biológica	5
1.4.4 Biosíntesis	6
1.5 Alquiresorcinoles (AR's): composición, función biológica y biosíntesis	7
1.5.1 Composición y función biológica	7
1.5.2 Biosíntesis	7
1.6 Regulación de la biosíntesis de alginato, PHB y AR's	7
1.7 El sistema de doble componente GacS/GacA	8
1.8 El sistema post-transcripcional Csr (Rsm)	9
1.9 El factor sigma S	9
1.10 La familia de regulación transcripcional TetR	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Control de la transcripción de <i>rpoS</i>	11
2.2 El gen <i>psrA</i> , su relación con <i>rpoS</i> y otros genes	13
2.3 El sistema GacS/GacA en <i>A. vinelandii</i>	15
2.4 El sistema post-transcripcional Rsm en <i>A. vinelandii</i>	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos particulares	18
4. HIPOTESIS	18
5. JUSTIFICACIÓN	19
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
6.1 Determinar el efecto de la inactivación del gen <i>psrA</i> en la síntesis de alginato, PHB y AR's	19
6.2 Determinar si PsrA regula la transcripción de <i>rpoS</i>	19
6.3 Determinar si PsrA afecta la expresión de <i>rsmA</i>	19
6.4 Determinar el efecto de mutaciones en <i>gacA</i> , <i>rpoS</i> , <i>rsmA</i> y <i>rsmB</i> sobre la transcripción de <i>psrA</i>	20
6.5 Determinar si PsrA regula su propia expresión	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS	21
7.1 Cepas bacterianas y plásmidos	21
7.2 Secuencia de oligonucleotidos	21
7.3 Medios y condiciones de cultivo	22
7.4 Manipulación de DNA y RNA	22
7.5 Curva de crecimiento bacteriano	22
7.6 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	22
7.7 Cuantificación de la producción de alginato por el método de Carbazol	23
7.8 Cuantificación del contenido de PHB	23
7.9 Cuantificación de AR's	23
7.10 Cuantificación de RNA	23
7.11 Tratamiento de RNA con DNasa y síntesis de cDNA	23
7.12 Cuantificación de la expresión relativa - qPCR	24
7.13 Extensión del iniciador	24
7.14 Obtención de PsrA-His	24
7.15 Expresión y purificación de PsrA-His bajo condiciones nativas	24
7.16 PCR	24

7.17 Purificación de DNA a partir de agarosa usando el kit Gene Clean ^R	25
7.18 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)	25
8. RESULTADOS	26
8.1 Efecto de la inactivación del gen en la síntesis de alginato, PHB y AR's	26
8.1.1 Confirmación de la mutante <i>psrA</i>	26
8.1.2 Fenotipo de crecimiento.....	27
8.1.3 Fenotipo de alginato.....	28
8.1.4 Fenotipo de PHB	29
8.1.5 Fenotipo de alquilresorcinoles	29
8.2 <i>PsrA</i> regula positivamente la transcripción del gene <i>rpoS</i>	31
8.3 La proteína <i>PsrA</i> no ejerce una regulación sobre la expresión de <i>rsmA</i>	36
8.3.1 <i>RpoS</i> regula a <i>rsmA</i>	36
8.4 Efecto de mutaciones en <i>gacA</i> , <i>rpoS</i> , <i>rsmA</i> y <i>rsmB</i> sobre la transcripción de <i>psrA</i>	38
8.4.1 <i>GacA</i> y su relación con <i>psrA</i>	39
8.5 <i>PsrA</i> regula negativamente su propia expresión.....	40
9. DISCUSIÓN.....	44
10. CONCLUSIONES	48
11. PERSPECTIVAS	49
12. BIBLIOGRAFIA.....	50

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria de vida libre que tiene la capacidad de diferenciarse a quistes. Produce alginato, poli- β -hidroxibutirato (PHB) y alquilresorcinoles (AR's), todos componentes estructurales del quiste maduro. El sistema de doble componente GacS/GacA regula la síntesis de alginato, PHB y AR's de manera indirecta a través del sistema postranscripcional Rsm y de RpoS. El sistema Rsm está formado por una proteína llamada RsmA, que se une cerca y dentro del sitio de unión a ribosoma evitando la traducción de los mismos, y *rsmB* el cual es un RNA no codificante que titula a RsmA antagonizando su efecto. En *A. vinelandii* uno de los promotores del gen clave en la síntesis de alginato, *algD*, y uno de los dos promotores del operón *phbBAC* son dependiente de RpoS, además que la traducción de los RNA mensajeros de *algD* y *phbB* son controlados negativamente por RsmA. PsrA es un regulador que pertenece a la familia TetR el cual reconoce las secuencias palindrómicas C/GAAAC N₂₋₄ GTTTG/C en *Pseudomonas spp.* y participa en la activación transcripcional del gen *rpoS* además de que regula negativamente su propia expresión. En *A. vinelandii* se encuentra un gen que codifica para una proteína que presenta un 73% de identidad con *psrA*, además el gen *rpoS* presenta la secuencia palindrómica de unión a dicha proteína; sin embargo, *psrA* no presenta las cajas putativas de unión.

Tomando en cuenta los antecedentes antes descritos, la hipótesis de este trabajo establece que PsrA regula a *rpoS*, por lo tanto, forma parte de la cascada de regulación que involucra al sistema Gac y Rsm, los cuales están implicados en regular la síntesis de alginato, PHB y AR's en *A. vinelandii*. En la mutante en *psrA* así como en las mutantes en los genes del sistema rsm o en la mutante *rpoS* el crecimiento no se ve afectado. La síntesis tanto de alginato como de PHB, comparada con la cepa silvestre, aumenta en la cepa mutada en *rpoS* así como en *rsmA* y disminuye en la mutante en *gacA* y en *rsmB*, sin embargo, la mutante en *psrA* no mostró un cambio significativo con respecto a la cepa silvestre. Con respecto a la producción de los AR's, ni la mutante en *gacA* así como tampoco la mutante en *rpoS* sintetizaron los lípidos fenólicos, mientras que una mutación en *rsmA* tuvo una producción elevada y una mutación en *rsmB* una disminución, la mutante en *psrA* tuvo una producción menor que la cepa silvestre. Estos datos sugirieron que PsrA podría regular de manera parcial a *rpoS*, por ello se cuantificó, a través de qPCR, la expresión de *rpoS* en la cepa mutada en *psrA*. Los resultados indicaron que la expresión de *rpoS* se redujo en un 60% comparada con la cepa silvestre. Posteriormente, se purificó la proteína PsrA y se realizaron ensayos tipo EMSA con la región reguladora de *rpoS* en donde se evidenció que PsrA se une a dicha región, lo que indica una regulación directa. El ensayo de extensión del iniciador de *rpoS* ubicó un promotor 68 nt río arriba del sitio de inicio de la traducción y las cajas a las que PsrA se une se encuentran a 336 nt río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por otra parte, se midió la expresión de *rsmA* mediante qPCR en la mutante en *psrA* y no se encontró un cambio significativo.

La similitud de los fenotipos de alginato y PHB de las mutantes en *rsmA* y de *rpoS* sugería que podría existir una relación entre ellos. A través de qPCR, se evidenció que RpoS regula la expresión de *rsmA*, ya que su expresión se redujo hasta en un 75% en la mutante en *rpoS*. Posteriormente, se realizó el ensayo de extensión del iniciador de RsmA que confirmó tener un promotor dependiente de RpoS, de esta forma, RpoS regularía de forma positiva la expresión de la proteína represora del sistema Rsm, por lo tanto en la mutante en sigma S, al disminuirse el transcrito de *rsmA*, provocaría un aumento en la producción de alginato y PHB.

Finalmente, con respecto a la regulación sobre la expresión de *psrA*, los ensayos de qPCR mostraron que la mutante en *gacA* así como la cepa mutada en el gen *rsmA* disminuyen parcialmente los niveles del transcrito de *psrA* con respecto a la cepa silvestre, mientras que la mutación en sí misma lo aumenta. Los ensayos tipo EMSA validaron que la autorregulación negativa es directa y el ensayo de extensión del iniciador de *psrA* ubicó dos sitios de inicio de la transcripción superpuestos en el cual en uno de ellos se encuentra una posible caja que puede ser reconocida por PsrA.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa, fijadora de nitrógeno, de vida libre, móvil gracias a que posee flagelos peritricos, aerobia y que puede crecer en concentraciones bajas de oxígeno; son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro cuya morfología varía desde la forma bacilar hasta células en forma de cocos pudiéndose presentar individualmente o en díadas (Nagpal *et al.*, 1989)

Este género presenta una característica poco común entre bacterias Gram negativas; bajo condiciones adversas, tiene la capacidad de diferenciarse morfológicamente generando formas celulares latentes que son resistentes a la desecación, a la desintegración mecánica y la radiación ultravioleta denominadas quistes (Sadoff, 1975). La formación de estas estructuras es influenciada por la fuente de carbono en el medio. *A. vinelandii* produce los polímeros poli- β -hidroxibutirato (PHB) y alginato además de producir alquilresorcinoles (AR's).

1.2 Ciclo de vida de *A. vinelandii*.

A. vinelandii presenta dos fases durante su ciclo de vida: La primera corresponde a una fase de crecimiento vegetativo y la segunda llamada fase de vida latente; aunque se desconocen las condiciones ambientales que determinan el fin de la fase vegetativa para dar inicio a la etapa de vida latente (o de diferenciación).

Cuando se inicia el proceso de diferenciación, las células pierden movilidad debido a la pérdida de sus flagelos, entonces se presenta una última división celular donde se generan dos células esféricas de tamaño menor las cuales están cubiertas por dos capas llamadas intina y exina, constituídas principalmente de alginato (Lin y Sadoff, 1969). Los alquilresorcinoles son lípidos que reemplazan a los fosfolípidos durante el enquistamiento y también son componentes de la exina. Una vez terminado este proceso, se presenta la formación de quistes maduros, constituídos por un cuerpo central o basal, que en su interior contiene gránulos de un polímero de reserva: el poli- β -hidroxibutirato (PHB). En condiciones favorables, el quiste inicia un proceso de germinación con el hinchamiento del cuerpo central, provocando la ruptura de la exina, emergiendo dos células que adquieren nuevamente movilidad (Sadoff, 1975).

1.3 Alginato: composición, función biológica, aplicaciones y biosíntesis.

1.3.1 Composición y función biológica.

Los alginatos son una familia de heteropolímeros, compuestos por monómeros de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M) unidos por enlaces $\beta(1-4)$ (Fig. 1), cuyo contenido y distribución es variable encontrándose cadenas con secuencias alternas (-M-G-M-G-M), o bloques de monómeros alternados (-M-M-M-G-G-G-M-M-M) donde el número de monómeros en los bloques es irregular (Haug *et al.*, 1971). La variabilidad de la distribución y contenido de ácido gulurónico y manurónico es importante porque permite tener alginatos con diferente capacidad de gelificación. Si el contenido de ácido gulurónico es alto, se generan geles rígidos y resistentes, y mientras que en un alginato con bajo contenido de este ácido, produce geles suaves y elásticos (Clementi, 1998).

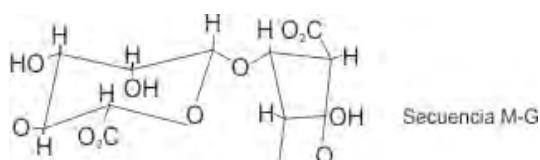


Fig. 1 Estructura del alginato (Haug *et al*, 1971)

Para la bacteria el alginato es esencial para la biogénesis del quiste maduro ya que cepas mutantes que no producen el polímero tampoco pueden enquistar (Campos *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1998).

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 (Fyfe y Govan, 1983; Clementi, 1998).

1.3.2 Aplicaciones

En la industria de alimentos y farmacéutica, los alginatos se usan como aditivos capaces de viscosificar, estabilizar, emulsionar y gelificar soluciones acuosas. También se ha estudiado su uso en recubrimiento de heridas, así como en tecnologías de inmovilización de células y enzimas (Clementi, 1998).

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

En este contexto, *A. vinelandii* constituye una buena alternativa por ser una bacteria inocua, y también porque la distribución de los bloques de residuos M (ác. manurónico) y G (ác. gulurónico) es similar a la encontrada en los alginatos extraídos de algas, por lo que las propiedades gelificantes del polímero también son similares, presentándose como un candidato para producir alginatos por medios biotecnológicos (Gacesa, 1998).

1.3.3 Biosíntesis

El alginato es sintetizado a partir de la fructuosa-6-fosfato que se isomeriza por una enzima bifuncional llamada fosfomanosa isomerasa-guanosina difosfomanosa pirofosforilasa, (PMI-GMP o AlgA), para producir manosa-6-P que es convertido por la fosfomanomutasa (PMM o AlgC) hacia manosa-1-P; PMI-GMP (AlgA) cataliza la conversión de manosa-1-P a GDP manosa; la GDP-manosa es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) para dar GDP-manurónico. La GDP-manosa deshidrogenasa, codificada por el gen *algD*, es la enzima clave en la vía de biosíntesis del alginato ya que la GDP manosa es un sustrato que se comparte con la síntesis de lipopolisácaridos además de que esta reacción es irreversible. La polimerización de GDP-manurónico es llevada a cabo por la polimerasa Alg8 (MP). El ácido polimanurónico es entonces modificado por un complejo acetilasa compuesto por las proteínas AlgI, AlgV y AlgF. Algunos residuos no acetilados son convertidos a ácido gulurónico por las epimerasas (AlgE1-7) extracelulares produciéndose así el alginato (Haug y Larsen, 1971).

1.3.4 Genética molecular de la biosíntesis de alginato.

La genética molecular de la biosíntesis del alginato ha sido estudiada ampliamente en *A. vinelandii*, se ha reportado que la bacteria posee para tal fin un grupo de genes organizados en tres operones (Lloret *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 1999), uno de los cuales transcribe al gen *algD*, el cual codifica a la GDP-manosa deshidrogenasa, la enzima clave en la vía de biosíntesis del alginato.

El gene *algD*, se transcribe a partir de tres promotores, uno de ellos (P1) es dependiente de σ^S , el segundo promotor (P2) dependiente de σ^E y un tercer promotor (P3) cuya identidad se desconoce (Castañeda *et al.*, 2001).

El operón *algUmucABCD* ha sido caracterizado en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* y se sabe que sus productos controlan la producción de alginato. AlgU es un homólogo del factor σ^E (Martínez-Salazar *et al.*, 1996). Los genes *mucA* y *mucB* codifican factores antisigma que regulan negativamente la actividad de AlgU. Se ha visto que la actividad de AlgU está involucrada en el proceso de enquistamiento de *A. vinelandii* independientemente de su papel en la síntesis de alginato (Moreno *et al.*, 1998). En *Pseudomonas* el regulador transcripcional AlgR tiene un papel primordial en la síntesis de alginato pues su mutación conlleva a una nula producción del polímero, sin embargo, en *A. vinelandii*, dicho regulador no tiene un papel primordial pues su mutación no abate la síntesis de alginato (Nuñez *et al.*, 1999).

1.4 PHB: composición, aplicaciones, función biológica, y biosíntesis.

1.4.1 Composición.

El PHB es un homopolímero constituido por monómeros de β -hidroxibutirato, perteneciente a la familia de los poli-hidroxicanoatos (PHA's), considerados compuestos de importancia industrial. El estudio de la síntesis de estos polímeros cobró interés durante los últimos años ya que se usan como materia prima alternativa para la fabricación de plásticos biodegradables.

1.4.2 Aplicaciones

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 a las del polietileno y propileno pero obtenidos a partir de una fuente renovable. El PHB es poco explotado comercialmente ya que tiene rendimientos bajos con altos costos. El estudio de su síntesis tendría un impacto no solo en lo económico, sino también en el aspecto ecológico (Steinbüchel y Valentin, 1995).

1.4.3 Función biológica

En *Azotobacter vinelandii* la acumulación de PHB se correlaciona con la frecuencia de formación de quistes, aunque éste no es esencial para el proceso de diferenciación, ya que mutantes no productoras de este poliéster enquistan de igual forma que la cepa silvestre (Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, en *A. vinelandii* el PHB podría funcionar como material de reserva de carbono y energía en periodos de limitación de nutrientes en el medio, pues el PHB almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula. (Lafferty, 1990). 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 sobrevivencia del microorganismo bajo condiciones adversas (Anderson y Dawes, 1990).

Otra función que se le ha atribuido al PHB está relacionada al fenómeno de la fijación del nitrógeno, que tiene que ver con la llamada protección de la nitrogenasa que presenta *A. vinelandii*. Esta bacteria tiene la peculiaridad de llevar a cabo la fijación de nitrógeno, un fenómeno que es sensible al oxígeno, bajo condiciones de crecimiento aerobio, mediante un 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 (Senior *et al.*, 1972).

1.4.4 Biosíntesis.

En la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* están involucradas tres reacciones enzimáticas (Manchak y Page, 1994): la primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa para dar acetoacetyl-CoA. El acetoacetyl-CoA formado se reduce por la acetoacetyl-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que finalmente se polimeriza por la actividad de PHB sintasa (Fig. 2). En *A. vinelandii* los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* codifican para la β -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa, respectivamente. Los tres genes se encuentran agrupados formando el operón *phbBAC* (Segura *et al.*, 2003, Peralta-Gil *et al.*, 2002). El operón *phbBAC* es transcrito a partir de dos promotores sobrelapados, pB1 y pB2. PhbR, codificado por *phbR*, activa la transcripción del operón biosintético de PHB a partir del promotor pB1, mientras que la transcripción de pB2 es dependiente del factor σ^S (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

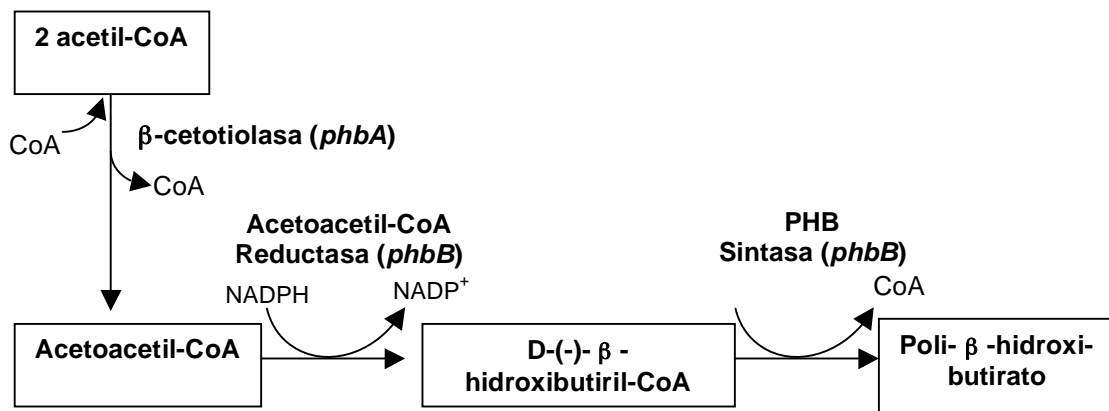


Fig. 2 Biosíntesis del Poli- β -hidroxibutirato en *A. vinelandii* (Manchak y Page, 1994)

1.5 Alquilresorcinolos (AR's): composición, función biológica y biosíntesis.

1.5.1 Composición y función biológica

Los alquilresorcinolos (AR's) son lípidos fenólicos homólogos de orcinol de cadenas laterales largas. Se han encontrado lípidos de este tipo tanto en animales como en plantas (e.g. Ginkgoaceae, Anacardiaceae y Gramineae) así como en algunas familias de hongos y algas y se ha confirmado la existencia de lípidos

resorcinólicos en microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* y *Azotobacter* (Kozubek y Tyman, 1999).

Los AR's, junto con otros lípidos denominados 6-n-alkilpironas, reemplazan a los fosfolípidos de la membrana de células vegetativas cuando inicia el proceso de diferenciación para la formación de quistes, constituyendo el 95% de lípidos totales en la membrana del quiste. En *A. vinelandii* los AR's más abundantes son los 5-n-heneicosilresorcinol y 5-n-tricosilresorcinol (AR1) en proporción 7:1 y sus derivados galactosidados (AR2) en la misma proporción.

En las plantas los AR's participan en la protección de las semillas evitando el ataque por hongos. En *A. vinelandii* además de formar parte de las membranas en los quistes también se ha demostrado que son componentes de la cápsula, encontrándose en cantidades iguales en la exina y en las membranas del cuerpo central del quiste y en una cantidad menor en la intina (Reusch y Sadoff, 1981). Por estudios previos se ha confirmado que los AR's son componentes estructurales importantes en la cápsula, ya que mutantes en la producción de los AR's son incapaces de formar una cápsula bien estructurada observándose una desorganización en ella, además de que los quistes de las mutantes se aglutinan de manera que forman agregados por uniones entre las capsulas (Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, mutantes en la producción de los lípidos fenolicos aún pueden enquistar y por lo tanto resistir a la desecación (Segura *et al.*, 2009)

1.5.2 Biosíntesis

La biosíntesis de los AR's no se ha definido por completo, sin embargo se ha propuesto una ruta de síntesis en *A. vinelandii* en la cual están implicadas las proteínas ArsA, ArsB, ArsC y ArsD. La ruta iniciaría con ArsA que cataliza la síntesis de una molécula de 22 carbonos, el n-behenil-CoA a partir de una unidad iniciadora de acetil-CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA. El n-behenil-CoA es utilizado como un sustrato por ArsB para sintetizar los 5-n-heneicosilresorcinoles por condensación aldólica entre C2 y C7, a su vez también el n-behenil-CoA es sustrato de ArsC para la formación de 6-n-alkilpironas. La enzima ArsD catalizaría la modificación post-traducciona del dominio ACP (Proteína Acarreadora de Acilos) de la proteína ArsA, uniendo covalentemente un "brazo" de 4-fosfopanteteína proveniente de coenzima A para que de esta manera, hacer funcional a ArsA para aceptar a sus sustratos (Nobutaka *et al.*, 2006).

1.6 Regulación de la biosíntesis de alginato, PHB y AR's.

Como es bien conocido, las bacterias ejercen una regulación precisa en los procesos biosintéticos a partir de cascadas complejas que coordinan la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas y las proteínas reguladoras necesarias para la obtención del producto final o metabolito. En estas cascadas de regulación están implicados aquellos reguladores globales que participan en varios de los procesos celulares. En *A. vinelandii* se han encontrado varios de estos reguladores globales y su papel en el control de la síntesis de alginato, PHB y AR's. Entre ellos están el sistema de doble componente GacS/GacA, el sistema Rsm y factores transcripcionales como RpoS (Castañeda *et al.*, 2001, 2002; Peralta-Gil *et al.*, 2002; Manzo *et al.*, sometido; Hernandez-Eligio, 2009; Romero-Ramirez, 2008).

1.7 El sistema de doble componente GacS/GacA

En las bacterias, los sistemas reguladores de dos componentes son el principal mecanismo de transducción de señales mediante el cual contienen y

responden a cambios o señales del medio ambiente. Estos sistemas están formados por dos elementos:

1. Primer componente: una proteína con capacidad de detectar dichas condiciones o señales (cinasa histidínica)
2. Segundo componente: una proteína reguladora (regulador de respuesta), que en la mayoría de los casos es un regulador transcripcional cuya actividad es controlada por la primera (Stock *et al.*, 1995).

El primer componente del sistema es una proteína que tiene actividad de cinasa, pertenecientes a la familia de las cinasas histidínicas. Con algunas excepciones estas proteínas presentan en la parte amino terminal dos dominios transmembranales, que flanquean una porción de la proteína que se sitúa en el periplasma; a esta región se la ha llamado dominio de entrada y se le ha involucrado en la detección de señales ambientales. La región citoplásmica de la proteína tiene varios motivos conservados, que tienen relación directa con el proceso de autofosforilación a los que se les conoce como módulo transmisor. El módulo transmisor comprende las cajas H,N,D/F, y G. La caja H contiene una histidina, la cual es el residuo donde se fosforilan esta clase de proteínas, los otros motivos están involucrados en diversos puntos del mecanismo de fosforilación (Parkinson y Kofoid, 1992).

Los segundos componentes son llamados reguladores de respuestas y están constituidos por dos dominios, el de fosforilación que se encuentra en el extremo amino terminal y se conoce como módulo receptor (que sufre una fosforilación en residuo Asp), y el segundo dominio es el de salida y generalmente es un motivo de unión a DNA (regulador transcripcional) (Parkinson y Kofoid, 1992).

El par regulador GacS/A es un sistema de transducción de señales de dos componentes reportado en varias especies bacterianas del subgrupo γ (Goodier y Ahmer, 2001). Este sistema de transducción es un regulador global del metabolismo secundario que controla diversos y numerosos metabolitos en las bacterias donde se ha reportado. Algunos de los metabolitos regulados por el sistema son similares entre diferentes especies bacterianas, aunque existen también metabolitos controlados por ortólogos del sistema que son particulares de cada especie (Heeb *et al.*, 2002). En *Erwinia* y *Pseudomonas*, GacS/A controla sus blancos modulando a su vez a otros sistemas de regulación como el sistema de regulación post-transcripcional Csr (Rsm). En *P. fluorescens* Pf-5, GacS/GacA influyen la transcripción del gen *rpoS* y su acumulación (Whistler *et al.*, 1998).

1.8 El sistema post-transcripcional Csr (Rsm)

Csr (carbon storage regulator) es un sistema que controla la expresión de genes bacterianos post-transcripcionalmente, su efector es una pequeña proteína de unión a RNA referida como CsrA en *E. coli*, la cual reconoce secuencias GGA cercanas y/o dentro del Shine Delgarno (SD), uniéndose a ellas para reprimir la expresión de genes impidiendo la traducción de sus RNAm. El segundo componente del sistema es CsrB, una molécula de RNA no codificante de 130 nucleótidos. La estructura secundaria de este RNA presenta varias estructuras de tallo y asa conteniendo secuencias repetidas que son reconocidas por CsrA. De esta forma CsrB secuestra a las moléculas de CsrA dejando libre el RNAm para ser traducido (Romeo, 1998).

El sistema CsrA/CsrB ha proporcionado un modelo para la elucidación de varios sistemas homólogos en otras bacterias gram negativas, referidos como RsmA/*rsmB* en *Erwinia* o RsmA/*rsmZ(prrB)* en *Pseudomonas* (Suzuki, 2002). Se ha reportado que la expresión de los RNA's no codificantes del sistema Csr dependen del regulador de respuesta GacA (Lapouge *et al.*, 2008).

1.9 El factor sigma S.

Al entrar en fase estacionaria, una serie de cambios ocurren que conllevan a la bacteria a enfrentarse a una situación de estrés. Durante la transición a esta fase, σ^S actúa como un coordinador inducible frente a una emergencia y como regulador maestro en un largo proceso de adaptación con consecuencias fisiológicas complejas.

En *E. coli*, RpoS regula más de 360 genes los cuales confieren resistencia contra el estrés oxidativo, la radiación UV, el choque térmico, la hiperosmolaridad, el pH ácido y el etanol. La importancia del papel fisiológico de σ^S se refleja en su compleja regulación la cual se observa a nivel de la transcripción de *rpoS*, la traducción de su RNAm y de su proteólisis, con diferentes condiciones de estrés afectando los varios niveles de control. La transcripción de *rpoS* aumenta cuando las células entran a la fase estacionaria y declina conforme la densidad celular disminuye (Hengge-Aronis, 2002).

En *E. coli* se han identificado cuatro posibles promotores para *rpoS*, dos de los cuales corresponden a los mismos del gen *nlpD* y cuya función es contribuir a la expresión basal de *rpoS* en fase exponencial. Los otros dos promotores se localizan dentro de la región estructural del gen *nlpD* y son llamados *rpoSp1* y *rpoSp2*, el primero de ellos es el promotor principal cuyas secuencias -10 y -35 muestran ser dependientes de σ^{70} . El promotor *rpoSp1* inicia un transcrito monocistrónico comprendiendo una región no traducida de 567 pb, mientras que *rpoSp2* no tiene un efecto significativo en la expresión de *rpoS* además de no mostrar ningún consenso en sus cajas -10 y -35 (Lange *et al.*, 1995)

El género de *Pseudomonas* puede colonizar múltiples habitats encontrándose en diferentes ambientes que van desde el suelo, el agua, las plantas, los animales e incluso en el humano. En *P. aeruginosa*, RpoS está involucrado en la producción del alginato y la exotoxina A, mientras que en *P. fluorescens*, RpoS está implicado en controlar la producción de antibióticos y metabolitos secundarios. El grado de importancia de RpoS para la resistencia a estrés ocasionado por el calor, el bajo pH, la hiperosmolaridad, el daño por peróxido de hidrógeno y por etanol es menos pronunciado en *P. aeruginosa* que en *E. coli*. Por lo tanto, parece ser que RpoS en *Pseudomonas* es menos importante para contender al estrés general y tiene papeles más específicos relacionados a la virulencia y colonización. De hecho, los estudios relacionados con la regulación de la transcripción de *rpoS* en *Pseudomonas* han revelado que ésta es llevada a cabo por reguladores globales que también están involucrados en la regulación de factores de virulencia (Venturi, 2003).

La región del promotor de *rpoS* de *P. aeruginosa* y *P. putida* está localizada dentro del gen *nlpD*. En *P. aeruginosa*, el promotor inicia la transcripción 366 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción y también tiene un promotor típico dependiente de σ^{70} (Venturi, 2003).

1.10 La familia de regulación transcripcional TetR.

Las bacterias en el medio ambiente están expuestas a variaciones de la temperatura y de la disponibilidad de nutrientes y agua; aunado a la presencia de

moléculas tóxicas que son originadas a partir del medio biótico y abiótico en el cual se encuentran. Estos cambios hacen que las condiciones de vida estén muy alejadas de las óptimas. La sobrevivencia en este medio inestable requiere de un amplio rango de respuestas rápidas y adaptativas las cuales son favorecidas por las proteínas reguladoras. Estos reguladores responden tanto a señales específicas celulares como a aquellas del medio ambiente que modulan la transcripción, traducción o algún evento en la expresión de genes, de modo que las respuestas fisiológicas son modificadas apropiadamente y en el momento oportuno.

En la mayoría de los casos, las respuestas adaptativas son mediadas por reguladores transcripcionales. Análisis estructurales han revelado que el motivo HVH (Hélice – Vuelta – Hélice) es el motivo de unión a DNA más recurrente en los factores transcripcionales de procariotes, ya que alrededor del 95% de todos los factores descritos en bacterias usan este motivo para unirse a sus secuencias blanco en el DNA.

Los reguladores transcripcionales de procariotes son clasificados en familias en base a la similitud de su secuencia y en criterios estructurales y funcionales (Tabla 1).

Familia	Acción	Algunas funciones que regulan	Motivo de Unión a DNA
LysR	Activador/Represor	Metabolismo de carbono y nitrógeno.	HVH
AraC/XylS	Activador	Metabolismo de carbono, respuesta a estrés y patogénesis.	HVH
TetR	Represor	Biosíntesis de antibióticos, bombas de eflujo, estrés osmótico, etc.	HVH
LuxR	Activador	Quórum Sensing, biosíntesis y metabolismo, etc.	HVH
Lacl	Represor	Utilización de fuente de carbono.	HVH
ArsR	Represor	Resistencia a metales.	HVH
IclR	Activador/Represor	Metabolismo de carbono y bombas de eflujo.	HVH
MerR	Represor	Resistencia y desintoxicación.	HVH
AsnC	Activador/Represor	Biosíntesis de aminoácidos.	HVH
MarR	Activador/Represor	Resistencia a múltiples antibióticos.	HVH
NtrC (EBP)	Activador	Asimilación de nitrógeno, síntesis de aminoácidos aromáticos, flagelo, rutas catabólicas, etc.	HVH
OmpR	Activador	Respuesta a osmolaridad y virulencia.	WH
DeoR	Represor	Metabolismo de azúcares.	HVH
GntR	Represor	Metabolismo general.	HVH
Crp	Activador/Represor	Respuesta global, represión de catabolitos.	HVH

Tabla 1. La familia de reguladores transcripcionales en procariotes.

La familia TetR fue nombrada así después de que la proteína TetR había sido caracterizada totalmente tanto genéticamente como bioquímicamente. Esta proteína controla la expresión de los genes *tet*, aquellos involucrados en la resistencia a tetraciclina. La mayoría de los miembros de esta familia exhiben un alto grado de similitud en su secuencia del dominio de unión a DNA.

La función específica regulada por miembros de esta familia es conocida tan solo para 85 miembros. Estas proteínas controlan genes cuyos productos están involucrados en la resistencia a antibióticos, síntesis de enzimas implicadas en diferentes rutas catabólicas, la biosíntesis de antibióticos, en el estrés osmótico y la patogenicidad.

Se ha encontrado que las proteínas de la familia TetR son codificadas tanto en cromosomas como en plásmidos y la movilidad de estos últimos pueden ser una

forma de diseminación de genes en esta familia a través de la transferencia horizontal. Estos genes son particularmente abundantes en microorganismos expuestos a cambios del medio ambiente, como aquellos que viven en el suelo, patógenos de plantas y animales, extremófilos y bacterias metanogénicas. Parece ser que las proteínas miembros de esta familia están involucradas en la adaptación a los cambios del medio ambiente.

TetR funciona como un homodímero y es capaz de unirse al operador, el cual cada 15 pb muestra una simetría palindrómica interna con un par de bases centrales extra. Las secuencias del operador sobrepone con los promotores de *tetA* y *tetR* tanto bloqueando la expresión de ambos genes. Cuando existe tetraciclina en el medio y penetra a la célula, se forma un complejo con el Mg^{2+} , así, este complejo es capaz de unirse a TetR lo cual provoca un cambio conformacional en la proteína, incapacitándola para unirse al DNA, como consecuencia, TetR y TetA son expresados dando como resultado la exportación del antibiótico de tetraciclina fuera de la célula (Ramos *et al.*, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 Control de la transcripción de *rpoS*.

Como se mencionó anteriormente, en *E. coli* la expresión de *rpoS* está regulada tanto a nivel de su transcripción, de su RNAm y de su proteólisis. En *Pseudomonas* spp. se ha encontrado que además de jugar un papel de adaptación al inicio de la fase estacionaria, *rpoS* también está implicado en la regulación de factores de virulencia y de colonización. En ambos casos, tanto para *E. coli* como para *Pseudomonas* spp. se ha encontrado que diferentes reguladores globales pueden ejercer efectos tanto positivos como negativos sobre la transcripción de este factor alternativo (Venturi, 2003) (Tabla 2).

Gene (s)	Organismo	Efecto en la transcripción de RpoS.	Referencia
<i>gacS/gacA</i>	<i>P. fluorescens</i>	Positivo, estudios de fusiones, directo?	Whistler <i>et al.</i> , 1998
<i>rhII/rhIR</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Positivo, estudios de fusiones, directo?	Latifi <i>et al.</i> , 1996
<i>psrA</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i>	Positivo, estudios de fusion y pegado a DNA, directo.	Kojic <i>et al.</i> , 2001, 2002
<i>relA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Sobreexpresión de <i>relA</i> tiene un efecto positivo, estudios de fusión, indirecto.	Van Delten <i>et al.</i> , 2001
<i>gacS/gacA</i>	<i>A. vinelandii</i>	Positivo, estudios de Northern, directo?	Castañeda <i>et al.</i> , 2001
<i>barA</i>	<i>E. coli</i>	Positivo, estudios de fusión y primer extensión, directo?	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2000
<i>uvrY</i>	<i>E. coli</i>	Negativo, estudios de microarreglos y western, directo?	Oshima <i>et al.</i> , 2002
<i>crp</i>	<i>E. coli</i>	Negativo, estudios de fusión, directo?	Lange <i>et al.</i> , 1994
<i>crr</i>	<i>E. coli</i>	Negativo, estudio de fusión, indirecto.	Ueguchi <i>et al.</i> , 2001
<i>relA/spoT</i>	<i>E. coli</i>	Positivo, estudios de fusión, indirecto.	Hirsch <i>et al.</i> , 2002
<i>ppk/ppx</i>	<i>E. coli</i>	Positivo, estudios de fusión, indirecto.	Shiba <i>et al.</i> , 1997

Tabla 2. Reguladores implicados en la transcripción de *rpoS*.

En últimos años se ha encontrado que RsmA, la proteína represora del sistema Rsm, ejerce una regulación sobre *rpoS*, tanto de forma negativa como positiva en diferentes bacterias. En *Pseudomonas fluorescens* CHA0, se cuantificó la traducción de *rpoS* en una mutante *rsmA*, la cual se elevó casi al doble sugiriendo que RsmA actúa como un controlador negativo en la expresión de *rpoS* (Heeb *et al.*, 2004), mientras que en *Pseudomonas* sp. M18 la regulación que ejerce RsmA sobre *rpoS* es de forma positiva, ya que la traducción de *rpoS* en mutantes en *rsmA* es sólo del 30% en comparación con la cepa silvestre (Ge *et al.*, 2006). En ninguno de los casos se ha demostrado si esta regulación es de manera directa o indirecta. Por otro lado, también se ha encontrado que RpoS está implicado en la regulación de *rsmA* de forma positiva, ya que en *E. carotovora* se pudo observar que el transcrito de *rsmA* en la mutante *rpoS* es mucho mas bajo en comparación con la cepa silvestre, además de que la caja -10 del promotor de *rsmA* muestra una secuencia típica dependiente de RpoS (Mukherjee *et al.*, 1998).

El gen *rpoS* ha sido poco estudiado en *A. vinelandii* en comparación con el de *E. coli* o *Pseudomonas*. El gen *rpoS* tiene una longitud de 1,005 pb y codifica para una proteína de 334 a.a. con una masa molecular de 38,306 kDa. RpoS es necesario para la formación de quistes maduros (Manzo *et al.*, sometido), para la sobrevivencia a largo plazo y para contender al estrés oxidativo, además de contender ante la falta de nutrientes como carbono o nitrógeno (Sandercock y Page, 2008). Por otra parte, sigma S modula la producción de los polímeros alginato y PHB en la bacteria, ya que uno de los tres promotores del gen *algD* y uno de los dos promotores del operón *phbBAC* son RpoS dependientes. Al igual que en *E. coli* y *Pseudomonas*, en *A. vinelandii* el gen *nlpD* se encuentra ubicado río arriba del gen *rpoS*.

Por estudios previos, se sabe que en *A. vinelandii* el sistema de dos componentes GacS/GacA tiene un control positivo sobre la expresión de *rpoS*, ya que en experimentos tipo northern, la expresión de *rpoS* en la mutante *gacA* se vio severamente afectada. Sin embargo, se desconoce si esta regulación es directa o indirecta o si hay otros factores que estén controlando también la expresión de RpoS (Castañeda *et al.*, 2001).

2.2 El gen *psrA*, su relación con *rpoS* y otros genes.

PsrA es una proteína reguladora que pertenece a la familia TetR, contiene cerca de su N-terminal un motivo de hélice-vuelta-hélice (HVH) el cual es típico de las proteínas que pertenecen a esta familia. Muchos de estos reguladores actúan como represores de la transcripción de sus blancos y muy frecuentemente controla genes que codifican proteínas involucradas en la permeabilidad de la membrana.

La proteína PsrA fue identificada en *P. putida* y *P. aeruginosa* en donde participa en la activación transcripcional del gen *rpoS*. Mutantes en *psrA*, en ambas especies, mostraron una disminución del 90% de la actividad del promotor en fase estacionaria y un decremento del 50% en los niveles del factor σ^S (Kojic *et al.*, 2001).

Los estudios de unión a DNA han revelado que PsrA se une específicamente a las secuencias -35 hasta -59 del promotor de *rpoS* respecto al sitio +1 de la transcripción, lo cual es consistente con el papel de activador transcripcional. Esta secuencia está conservada en *P. putida* y en *P. aeruginosa* y contiene los motivos palindrómicos C/GAAAC N₂₋₄ GTTTG/C. Además, PsrA se autorregula negativamente a través de la unión a secuencias similares en su promotor, dicha unión se da entre los sitios -18 a + 20 respecto al sitio +1 de la transcripción (Kojic *et al.*, 2002). En el fondo genético de *E. coli*, PsrA activa la fusión del promotor de *Pseudomonas rpoS-lacZ*, pero la actividad que se obtiene está por debajo de la observada en la cepa silvestre (Kojic y Venturi, 2002). Esto indica que PsrA por sí solo no es suficiente para estimular la activación completa del promotor

En *P. aeruginosa*, la proteína PsrA es requerida para la activación total del operón *excCEBA* implicado en la regulación del sistema de secreción tipo III y en la regulación de la expresión de genes efectores como son *exsA* y *exoS*, ya que mutantes en este gen mostrarán un decremento en los niveles de expresión. En este mismo estudio se observó por ensayos de EMSA que la proteína PsrA se une directamente al promotor del gen *exsC*, el cual activa al operón *excCEBA*, sin embargo, la concentración de proteína era elevada y la afinidad era baja, por ello es posible que PsrA se pueda unir *in vivo* con alta afinidad en presencia de otra(s) proteína(s) o pueda ayudar a otros reguladores a unirse al promotor de ExsC. La complementación en *trans* por un plásmido de alto número de copias conteniendo el gen *psrA* controlado por su propio promotor mostró un aumento en la expresión de los genes implicados en el sistema de secreción tipo III (Shen *et al.*, 2006)

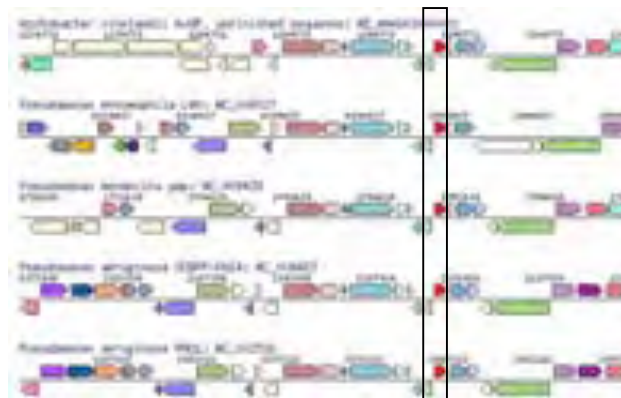
En *Pseudomonas syringae* pv. Tomato cepa DC3000 se documentó que PsrA es necesario para iniciar la reacción hipersensitiva y de patogenicidad, ésto por la reducción observada en los niveles de expresión de genes implicados en la virulencia de la bacteria como son *hrpA*, *hrpZ*, *hopP* entre otros, en una mutante en el gen *psrA*. En el caso de los genes *hrp* y *hop* se realiza de manera indirecta a través del control negativo que ejerce PsrA sobre la expresión del gen *rsmA*, ya que los niveles del transcrito de *rsmA* son más altos en una mutante en *psrA*. De esta manera, los efectos de PsrA sobre la expresión de los genes anteriormente citados pueden ser explicados por la sobre-expresión de *rsmA* en la mutante *psrA*. En estos mismos estudios se comprobó una vez más que *psrA* autorregula su expresión, ya la expresión de la fusión *psrA-lacZ* en una mutante *psrA* es mas alta que en la cepa silvestre. Los estudios realizados también mostraron que PsrA regula positivamente la expresión de *rpoS* (Chatterjee *et al.*, 2007).

A partir de experimentos llevados a cabo por diferentes grupos se ha demostrado que en *P. aeruginosa* PsrA también está implicado en la resistencia contra péptidos antimicrobianos, en la formación de biopelícula y en la motilidad tipo "swarming" ya que una mutante en *psrA* es defectuosa en estos fenotipos (Gooderham *et al.*, 2008). En *P. aeruginosa* uno de los operones que codifica para las enzimas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos es *fadBA5*. Este operón es reprimido por PsrA de forma directa ya que la proteína se une al promotor evitando su expresión, sin embargo los ácidos grasos de cadena larga son capaces de desreprimir la expresión del operón al unirse a PsrA y evitando su unión al operón (Kang *et al.*, 2008). Cabe mencionar que las secuencias probables a las que PsrA se uniría en el promotor de *fadBA5* difieren a las ya reportadas anteriormente.

Usando la secuencia de unión a PsrA se realizó una búsqueda para encontrar otros genes bajo su control en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (Kojic *et al.*, 2005). Se encontraron 18 genes candidatos distribuidos aleatoriamente, entre ellos *rpoS* y *psrA*, de estos 14 fueron probados y sólo 4 fusiones transcripcionales exhibieron un comportamiento dependiente de PsrA. Se encontró que estos genes codifican una probable acyl-CoA deshidrogenasa, la subunidad α y β de una flavoproteína implicada en la transferencia de electrones, una flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa y un regulador transcripcional llamado MmsR; los promotores de estos genes tienen una secuencia palindrómica bien conservada.

Empleando como patrón de comparación la secuencia del gen *psrA* de *P. putida*, se encontró en *A. vinelandii* un marco de lectura el cual presentaba un 73% de identidad y cuyo producto codifica para una proteína de alrededor de 27 kDa, que además se ubica en el mismo contexto genético que en *Pseudomonas* spp., divergente al gen *lexA*. Haciendo un alineamiento de las secuencias de pegado de PsrA en *rpoS* de *Pseudomonas* spp. y comparándolas con las de *A. vinelandii* se observó que se mantiene la secuencia palindrómica a la cual PsrA hipotéticamente se uniría para controlar la expresión *rpoS*. Sin embargo, la secuencia de unión a la región líder de *psrA* no mostró consenso, lo que sugiere que en *A. vinelandii* PsrA podría no autoregularse (Sampieri-Hernández, 2004) (Fig. 3).

a)



b)

```
rpoS  
PPU TTGCTTCCAAAAC GGTAGTTTTGA ATAAAGGCAT TGATAT CGCC GGTGATTT  
PSA TTGCCTCAAAAC GGAAGTTTTGA ATAAAGGGAT TGATAT AGCC GGTCAATT  
AVI TTTCTCCAAAAC GGCAGTTTTGA ATAAAGGCAT TGATAT CGCC GGTCAATT  
  
psrA  
PPU GGCT -GAAAC GTATGTTT CAAACACCTGTTTG TCTGGCGG AATAATCATG  
PSA GGCTGGAAAC GTATGTTT CAAACAAGTGTGTTG TCAGGCGG AGAAACCATG  
AVI -TACAATGGC GGTTCAA GGAATAAGGTCGTC ACTGGCGG AGGAACCATG
```

Fig. 3. a) Locus del gen *psrA* (rojo) de *A. vinelandii* y sus ortólogos en *Pseudomonas spp.*, la proteína en dirección opuesta corresponde a *lexA* (verde), b) alineamiento de los sitios de pegado de PsrA sobre *rpoS* (superior) y sobre si mismo (inferior) en *P. putida* (PPU), *P. aeruginosa* (PSA) y *A. vinelandii* (AVI).

2.3 El sistema 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). Este sistema es determinante para la producción de alginato activando indirectamente la transcripción del gen *algD*. Este gen codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa y es transcrito a partir de tres promotores: (P1) σ^S dependiente, (P2) σ^E dependiente y (P3). El control transcripcional que GacS/A ejerce sobre el promotor P2 es explicable por la modulación que tiene el par regulador sobre *rpoS*.

Mutaciones en *gacA* abaten la transcripción del gen *phbB*, incapacitando así a la bacteria para producir PHB (Castañeda *et al.*, 2000). Como ya se mencionó anteriormente, el gen *phbB* es transcrito a partir de los promotores p_{B1} y p_{B2} , siendo este último un promotor σ^S dependiente. Al igual que en el caso anterior, el control que realiza el par GacS/GacA sobre la transcripción del gen *phbB* sólo es explicado parcialmente por el efecto que ejerce sobre *rpoS*. Sin embargo, la regulación positiva que ejerce Gac sobre la síntesis de ambos polímeros está dada principalmente por activar la transcripción de *rsmB* (Manzo *et al.*, sometido).

Se ha demostrado que la síntesis de AR's se abate en las cepas que tienen el gen *gacA* inactivo (Romero-Ramirez, 2008), además, este sistema controla la producción de otros metabolitos secundarios como los sideróforos del tipo de las pioverdinas (azotobactinas) (Reyes-Valencia, 2009).

2.4 El sistema post-transcripcional Rsm en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* se encuentran los ortólogos al sistema de regulación postranscripcional CsrA/*csrB*, llamados RsmA/*rsmB*, los cuales participan en regular la síntesis del alginato, PHB y AR's. La sobreexpresión de RsmA reduce la producción de alginato en un 90% mientras que para el caso de PHB lo reduce en un 50% (Cocotl-Yañez, 2006). Esta regulación negativa es directa ya que se ha evidenciado que RsmA es capaz de unirse a la región líder de *algD* (Manzo *et al.* sometido) y a la de *phbB* para regular la producción del alginato y poli- β -hidroxibutirato respectivamente (Hernandez-Eligio, 2009). Además, se observó que una mutación en el gen *rsmA* aumenta la producción de los AR's (Romero-Ramirez, 2008).

Por otra parte, *rsmB* regula de manera positiva la producción de los polímeros ya que la interacción entre RsmA y *rsmB* se mantiene tal y como sucede en *E. coli* y *Pseudomonas*. Se ha evidenciado que la mutación en este RNA regulador disminuye la producción de alginato, PHB y AR's. Además, su expresión es controlada directamente por GacA que es capaz de unirse a la región reguladora de *rsmB* y activar su transcripción. De hecho, en la mutante en el gen *gacA*, la cual no produce alginato ni PHB, se restauran parcialmente los fenotipos de síntesis de ambos polímeros al sobreexpresar a *rsmB*. De esta forma, GacA al activar la transcripción de *rsmB* evita la regulación negativa de RsmA sobre la síntesis de alginato, PHB y AR's (Manzo *et al.*, sometido) (Fig. 4).

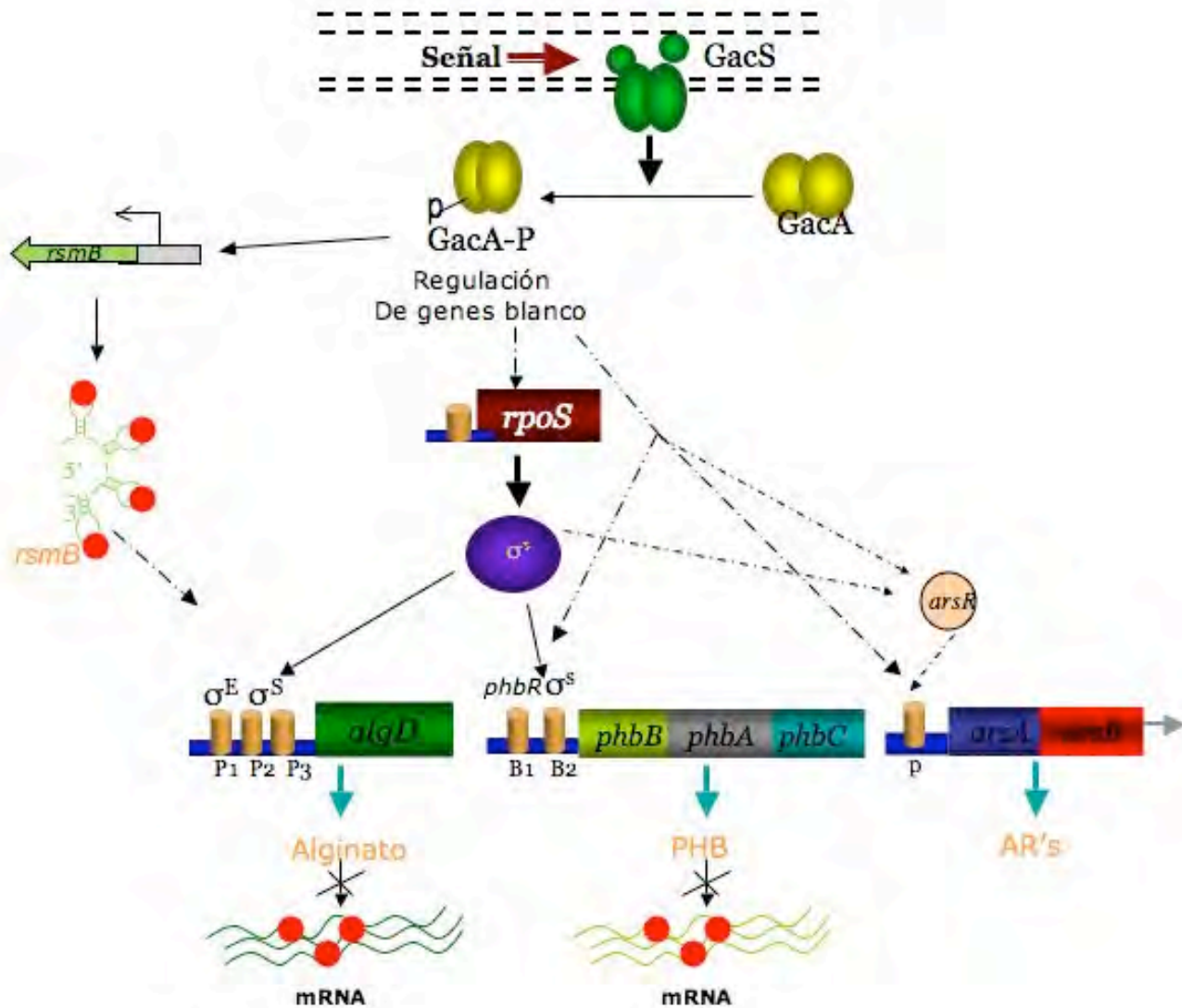


Fig. 4. Modelo de regulación de los polímeros a través del sistema Gac, RpoS y Rsm.

En últimos años se reportó en *E. coli* un gen homólogo a *csrB*, llamado *csrC*, el cual funciona de manera similar a *csrB* formando parte también del sistema Csr. De manera similar se reportó en *P. fluorescens* un gen homólogo a *rsmZ* (homólogo a *rsmB*, también llamado *prfB*) el cual fue nombrado *rsmY* y que tiene una función similar a *rsmZ*. Por la cercanía filogenética entre *A. vinelandii* y *P. fluorescens* se buscó en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* un posible

homólogo a *rsmY*, dicha búsqueda no dió resultados positivos, sin embargo al utilizar como patrón de comparación el gen *rsmB* de *A. vinelandii*, se encontró un posible homólogo en un locus distinto en el que se encontró el gen *rsmB*, a dicho gen se le nombró *rsmC*. De forma interesante, las regiones reguladoras putativas de ambos genes se encuentran bastante conservadas. Solís-Conde (2006) demostró que dicho gen forma parte del sistema Rsm afectando la producción de los polímeros producidos por la bacteria.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

→ Estudiar el papel de PsrA en la síntesis de alginato, PHB y AR's y su relación con el sistema Gac/RpoS y/o Gac/Rsm.

3.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la inactivación del gen *psrA* en la síntesis de alginato, PHB y AR's.
2. Determinar si PsrA regula la transcripción de *rpoS*.
3. Determinar si PsrA afecta la expresión de *rsmA*.
4. Determinar el efecto de mutaciones en el sistema Gac y Rsm sobre la expresión de *psrA*.
5. Determinar si PsrA regula su propia expresión.

4. HIPOTESIS

La proteína PsrA de *A. vinelandii* participa en el control de la producción de alginato, PHB y alquilresorcinoles, formando parte de la cascada de regulación iniciada por el sistema GacS/GacA (Fig. 5).

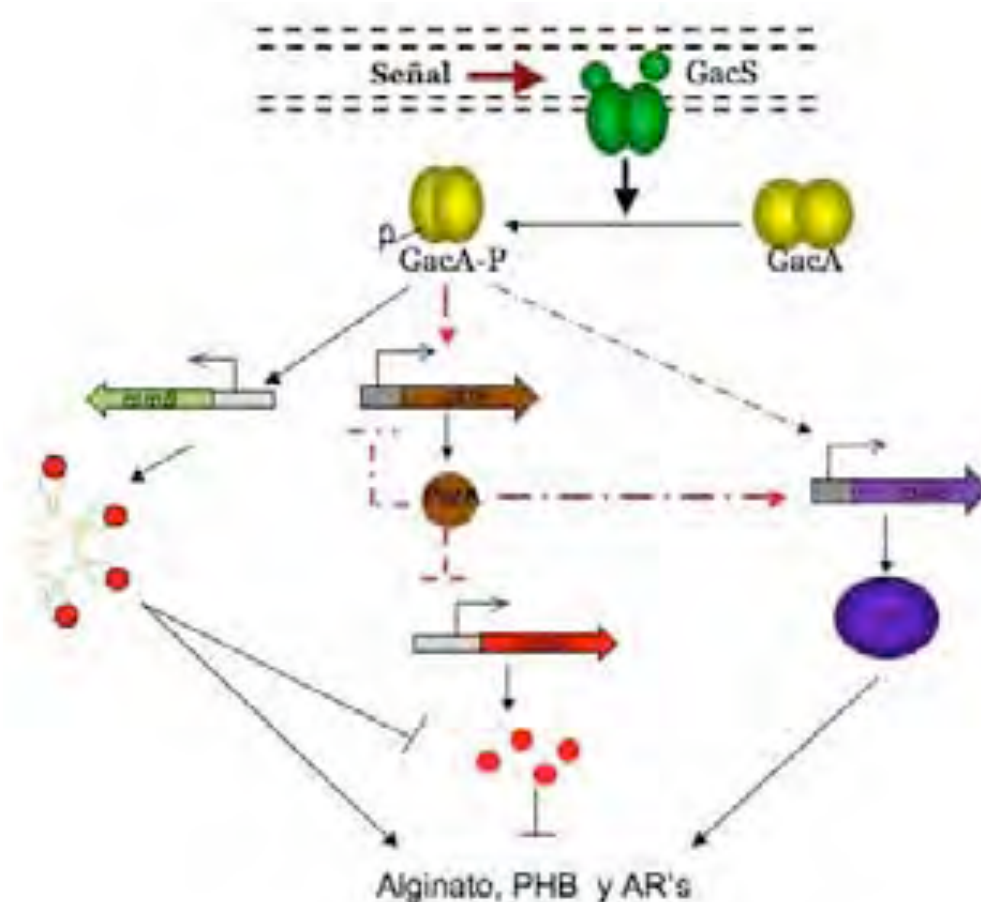


Fig. 5. Modelo hipotético de regulación de la biosíntesis de los polímeros que involucra a la proteína PsrA. Las flechas continuas indican regulación positiva, flechas punteadas indican regulación hipotética, mientras que la línea con barra indica regulación negativa.

5. JUSTIFICACIÓN.

En *A. vinelandii*, la regulación genética de la biosíntesis de alginato, PHB y AR's involucra los sistemas Gac, Rsm y RpoS. Sin embargo, la relación entre éstos no ha sido completamente clarificada. La proteína PsrA es un candidato potencial que podría regular a RpoS y podría ser el vínculo con los sistemas anteriormente descritos. Por ello, su estudio nos ayudará a comprender y ubicar a este regulador transcripcional dentro de la cascada iniciada por el sistema Gac y determinar su papel en la regulación de la biosíntesis de los polímeros. Además, nos permitirá determinar si PsrA es uno más de los reguladores que controlan la expresión de RpoS, ya que hasta ahora ha sido poco documentada la regulación de dicho factor sigma alternativo en esta bacteria.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Determinar el efecto de la inactivación del gen *psrA* en la síntesis de alginato, PHB y AR's.

Se utilizará la cepa ATpsrA, la cual es derivada de la cepa silvestre ATCC 9046 que porta la mutación *psrA::gusA*-Sp. Dicha mutación será confirmada a través de PCR. Para determinar si PsrA está relacionado con la síntesis de los polímeros en *A. vinelandii*, se cuantificará la producción de alginato, PHB y alquilresorcinoles en la mutante *psrA* y se comparará con la producción de la cepa silvestre así como en las cepas mutadas en el sistema Gac, Rsm y RpoS.

6.2 Determinar si PsrA regula la transcripción de *rpoS*.

Para determinar si PsrA regula la transcripción de *rpoS* se realizarán ensayos tipo RT-PCR en tiempo real (qPCR) para medir la expresión de *rpoS* en la mutante en el gen *psrA* y se comparará con la cepa silvestre. La disminución de la transcripción de *rpoS* en la mutante en *psrA* evidenciaría la regulación positiva de PsrA sobre este factor, tal y como se ha descrito en otras especies bacterianas y como lo sugiere la presencia de sitios de pegado de PsrA en el promotor de *rpoS*. Si se observa esta regulación, se determinará si es directa; para ello, se realizarán ensayos tipo EMSA de la proteína PsrA purificada y de la región reguladora de *rpoS* que contiene los hipotéticos de unión para PsrA. Finalmente, se realizará el ensayo de extensión del iniciador de *rpoS* para encontrar el sitio de inicio de la transcripción, determinar su tipo de promotor y ubicar las cajas de pegado de PsrA a partir del sitio de inicio.

6.3 Determinar si PsrA afecta la expresión de *rsmA*.

Para alcanzar este objetivo, a través de qPCR se cuantificará la expresión de *rsmA* en la cepa ATpsrA y se comparará con la cepa silvestre. Un aumento en la expresión de *rsmA* indicaría una regulación negativa a través de PsrA, tal y como ha sido documentado en *P. syringae*.

6.4 Determinar el efecto de mutaciones en *gacA*, *rpoS*, *rsmA* y *rsmB* sobre la transcripción de *psrA*.

Por medio de qPCR se medirán los niveles de transcripción del gen *psrA* en la cepa silvestre y en las mutantes *gacA*, *rpoS*, *rsmA* y *rsmB*. Esto nos dará información sobre la posible regulación que podría ejercer el sistema de regulación post-transcripcional Rsm y el sistema Gac sobre *psrA* y también permitirá descartar alguna regulación de RpoS sobre *psrA*.

6.5 Determinar si PsrA regula su propia expresión.

Debido a que la mutación en la cepa ATpsrA es una interrupción del gen PsrA, se medirá la expresión a través de qPCR de *psrA* en esta cepa y se comparará con la cepa silvestre, un aumento en su expresión nos indicará una posible autorregulación negativa la cual será confirmada realizando ensayos tipo EMSA de la región reguladora de PsrA y de la proteína purificada. Se realizarán ensayos de extensión del iniciador

para conocer el tipo de promotor de *psrA* y para ubicar alguna posible secuencia de pegado de PsrA.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa	Características	Referencia
A. vinelandii		
ATCC 9046	Cepa silvestre	Colección ATCC
ATgacA	Derivada de la ATCC que porta la mutación <i>gacA::Gm</i> .	Castañeda <i>et al.</i> , 2001
ATrpoS	Derivada de la ATCC que porta la mutación <i>rpoS::Sp</i> .	Sampieri-Hernandez., 2004
ATpsrA	Derivada de la ATCC que porta la mutación <i>psrA::Sp</i> .	Sampieri-Hernández, 2004
ATrsmA	Derivada de la ATCC que porta la mutación <i>rsmA::Sm</i> .	Manzo <i>et al.</i> , sometido
ATrsmB	Derivada de la ATCC que porta la mutación <i>rsmB::Km</i> .	Manzo <i>et al.</i> , sometido
E. coli		
Top10	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen ^R
Plasmidos		
pMOSBlue	Vector de clonación de productos de PCR.	Amershan ^R
pBAD-TOPO	Vector de clonación para expresar proteínas.	Invitrogen ^R
pMRpoS	Derivado del pMOS que porta un fragmento de 500 pb que corresponde a la region reguladora de <i>rpoS</i> .	Sampieri, A., 2004
pMPsrA	Derivado del pMOS que porta un fragmento de 262 pb que corresponde a la region reguladora de <i>psrA</i> .	Sampieri-Hernández, 2004.
pJrsmA	Derivado del plasmido pJB3Tc20 que porta un fragmento de 200 pb que corresponde a la región reguladora de <i>rsmA</i> .	Manzo <i>et al.</i> , sometido
pPsrAhis	Derivado del pBAD-TOPO que porta la región estructural de <i>psrA</i> fusionado a 6 residuos de histidina.	Este trabajo.
pMphbB	Derivado del plasmido pMOS que porta un fragmento de 290 pb que corresponde a la región reguladora de <i>phbB</i>	Hernández-Eligio, 2009

7.2 Secuencia de Oligonucleotidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm	Referencias
PCR			
PsrAMigF	GAATTCCAGACAGCGCTTGATGAAGG	60	Sampieri-Hernández, 2004
LWpsrA	CTGAGGATCCAGTCGCGG	60	Sampieri-Hernández, 2004
Reg psrAup	CGAGGCGTCAGTTTGTGC	56	Este trabajo
Reg rpoSup	CTCTGGTGGGACGCTTTTC	60	Este trabajo
RpoSP2	CCTTCACCTGTTGTCTTC	60	Este trabajo
Extensión del iniciador			
RpoSP1	CCATCAGGAGCACATCAT C	58	Sampieri-Hernández, 2004
PsrAPrim	CGAGGTCTCGGCGAATCCCC	56	Sampieri-Hernández, 2004
RsmAPrim	GACTGTACATCATCACC	58	Este trabajo
qPCR			
upRT-rpoS	AGGATGTCCTGGACGATGAG	60	Este trabajo

dwRT-rpoS	TCCAGCGCCCTAGTGTAGTC	60	Este trabajo
upRT-psrA	AAACTGTCGAGCGCATCCT	60	Este trabajo
dwRT-psrA	CAGATTGACATCGGCCTTG	60	Este trabajo
upRT-rsmA	GCTGGGCGTGAAAGGTAAT	60	Este trabajo
dwRT-rsmA	TTCTTTCTGAATGCGCTGGT	60	Este trabajo
fw-gyrA	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	60	Noguez <i>et al.</i> , 2008
rev-gyrA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	60	Noguez <i>et al.</i> , 2008
Expresión de PsrA-His			
upPsrAprot	CCCCACTCGGAAACTGTC	65	Este trabajo
dwPsrAprot	CTCGTCCGCCTCGGGCGA	65	Este trabajo
pBADfw	ATGCCATAGCATTTCATCC	62	Invitrogen ^R
pBADrev	GATTTAATCTGTATCAGG	62	Invitrogen ^R

7.3 Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en medio Buró-Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/l): K₂HPO₄, 0.8; KH₂PO₄, 0.2; Na₂SO₄, 0.183; MgCl₂-6H₂O, 0.16; FeSO₄-7H₂O, 0.005; Na₂MoO₄-2H₂O, 0.0002; CaCl₂-2H₂O, 0.073. El pH se ajusto a 7.2. Para medio de inducción a enquistamiento y síntesis de AR's (Burk Butanol o BOH) no se adiciona sacarosa y se suplementa con 0.2% de butanol.

Los cultivos en medio liquido se llevaron a cabo en matraces de 125 ml con 25 ml de medio o de 250 ml con 50 ml de medio en incubadora a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 36 o 72 h para inducción a enquistamiento.

Las concentraciones de antibioticos a usar para *A. vinelandii* son (ug/ml):

Ac. Nalidixico (Nal)	30
Espectinomicina (Sp)	50
Estreptomycin (Sm)	2
Kanamycin (Km)	4
Gentamicin (Gm)	2

Los cultivos de *Escherichia coli* se crecieron a 37 °C, 24 h, en medio Luria (LB) cuya composición es la siguiente (g/l): bacto peptona, 10; extracto de levadura, 5; cloruro de sodio 10. El antibiótico de ampicilina se uso a una concentración de 100 ug/ml

7.4 Manipulación de DNA y RNA

Los procedimientos para la purificación de DNA total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis de geles de agarosa para DNA y RNA así como geles de poliacrilamida, 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. La purificación de RNA se realizó según lo reportado por Barry *et al.*, 1992.

7.5 Curva de crecimiento bacteriano.

La curva de crecimiento fue determinada en base a la cuantificación de proteína por el método de Lowry *et al.*, 1951 a tiempos de 0, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h.

7.6 Cuantificación de proteína por el metodo de Lowry.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry *et al.*, 1951. Las células se lavaron con MgSO₄ 10 mM para eliminar el alginato y se resuspendieron en 1 ml

de H₂O. Del paquete celular se tomó una alícuota cuyo volumen fue de acuerdo a la cantidad de células en el cultivo, y se aforó con H₂O a 1 ml. Posteriormente se adicionaron 5 ml de la solución reactiva recién preparada. Se agitó y dejó reposar 10 min., se adicionaron 0.5 ml de reactivo de folin (Sigma) dilución 1:3 en H₂O. Se agitó y se dejó reposar 30 min, y se midió la absorbancia a 595 nm. Simultáneamente se corrió una curva de calibración utilizando un patrón de albúmina, con las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 400 y 600 µg/ml. Las soluciones utilizadas fueron: a) Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1; b) tartrato de Na y K 2%; c) CuSO₄ 1%. Para la solución reactiva se mezcla 1 ml de la solución C más 1 ml de la solución B y 98 ml de solución A.

7.7 Cuantificación de la producción de alginato por el método de Carbazol

Para la cuantificación de alginato se utilizaron cultivos crecidos durante 36 h, en matraces de 500 ml con 100 ml de medio. Se incubó a 30 °C a 200 rpm.

La producción del polisacárido se midió después de precipitar el alginato con isopropanol y mediante la cuantificación espectrofotométrica de ácidos urónicos a 530 nm, de acuerdo a lo reportado por Blumenkrantz *et al.*, 1973.

7.8 Cuantificación del contenido de PHB

La cuantificación de PHB se realizó por el método de Law y Slepecky (1961), mediante la separación del polímero por hipoclorito de sodio, su conversión a ácido crónico por tratamiento con ácido sulfúrico a 95 °C durante 10 minutos y su cuantificación espectrofotométrica a 235 nm. Las células fueron obtenidas a partir de un cultivo de 36 h con 100 ml de medio en matraces de 500 ml incubadas a 30 °C y 200 rpm.

7.9 Cuantificación de AR's.

Las células se crecieron por 5 días en medio Burk-Butanol líquido para inducir síntesis de AR'S y enquistamiento. La cuantificación de AR's se hizo utilizando el método reportado por Segura *et al.*, 2003. Los lípidos fenólicos fueron extraídos con acetona por 20 min a temperatura ambiente en tubos cerrados. Después de la centrifugación, la acetona extraída fue removida y se realizó una segunda extracción por 12 h a temperatura ambiente. Las extracciones resultantes fueron mezcladas y usadas en la determinación de los AR's, con el uso de Fast Blue B. El orcinol fue usado como estándar.

7.10 Cuantificación de RNA.

Se tomaron 4 ul de la extracción de RNA y se agregó 496 ul de agua para tener un volumen final de 500 ul (dilución 1:125), el blanco a usar fue agua pura. Se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración en base a la relación.

7.11 Tratamiento de RNA con DNAsa y síntesis de DNA.

El tratamiento de RNA con DNAsa se realizó según las especificaciones del fabricante Fermentas. Se usó 1 ul de DNAsa para 1 ug de RNA, se incubó por 30 min a 37 °C y se detuvo la reacción adicionando 5 ul de EDTA 25 mM a 65 °C por 10 min.

Se utilizaron 200 ng de RNA para realizar el cDNA utilizando el kit RevertAid™ Minus First Strand cDNA Síntesis Kit de Fermentas. Los oligonucleótidos fueron utilizados a una concentración de 2 pmol/ul.

7.12 Cuantificación de la expresión relativa – qPCR

Los ensayos de qPCR fueron realizados utilizando 1 ul de cDNA, 2 ul de la mezcla de oligos del gen a medir, 10 ul de SYBR Green de Fermentas y 7 ul de H²O. Los qPCR fueron realizados con el aparato ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 10 min a 95°C, un ciclo de dos pasos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos por un total de 40 ciclos. El análisis fue realizado con el $2^{-\Delta\Delta CT}$

El tamaño de los amplímeros fueron de 100 pb. La concentración final de los primers fueron de 250 nM. Todas las reacciones de qPCR fueron realizados en triplicado para cada gene de cada cepa. Los niveles de *gyrA* fueron usados como controles internos para normalizar los resultados obtenidos. La reproducibilidad del procedimiento completo fue determinado por realizar la síntesis de cDNA y los experimentos de qPCR de tres extracciones separadas de RNA de cada cepa.

7.13 Extensión del iniciador.

Los ensayos de extensión del iniciador se realizaron con 50 ug de RNA purificado de cultivos crecidos por 36 h en medio BS. La reacción de extensión se realizó marcando el oligo con gama ATP³² utilizando la enzima polinucleotido cinasa de Roche y 20 pmol del oligonucleotido e incubando 1 h a 37 °C. Para realizar el cDNA se utilizó la enzima AMV de Roche con una temperatura de extensión de 42 °C, se precipitó utilizando acetato de amonio 10 M mas 100 ul de etanol absoluto, se centrifugó a 14 mil rpm por 10 min, se lavo con etanol al 70% al menos tres veces y finalmente el pellet fue resuspendido en 8 ul de agua mas 4 ul de colorante. Posteriormente para realizar la secuencia nucleotidica se utilizó el kit Thermo SequenaseTM Cycle Sequencing Kit de USB siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.14 Obtención de PsaA-His

El gen que codifica para la proteína PsaA fue clonado en el vector de expresión pBAD-TOPO usando el kit pBAD TOPO^R TA Expresión Kit de Invitrogen^R. Se mezclo 0.4 ul de producto de PCR de PsaA y 1 ul del vector, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se transformó en células de *E. coli* Top10 químicamente competentes. Las clonas candidatas fueron sometidas a PCR usando un oligo del vector y del inserto para validar la orientación.

7.15 Expresión y purificación de PsaA-His bajo condiciones nativas.

La expresión de PsaA-His fue inducida en fase media-exponencial (D.O. 0.5) adicionando 0.2% de arabinosa al medio. Las células fueron colectadas luego de 4 horas después de la inducción. La purificación de la proteína fue realizada a 4°C bajo condiciones no desnaturizantes como se describe en el protocolo para la purificación nativa en el QIAexpression Manual (Qiagen). La proteína fue concentrada usando Microcon^R 10N (Amicon) y se almaceno a 4 °C.

7.16 PCR

Mientras no se indique lo contrario, las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C/45 seg.; alineamiento (especificado en la tabla de oligos)/1 min.; extensión a 72°C/40 seg., repetir 30 ciclos; extensión final 72°C/10 min.

Para el PCR radiactivo se utilizo una mezcla de dNTP's (GAT) a 200 uM, dCTP a 100 uM y 0.5 ul de dCTP radiactivo.

7.17 Purificación de DNA a partir de agarosa usando el kit Gene Clean^R

Se corto la banda a partir de gel de agarosa al 1% y se colocó en un tubo eppendorf. Se añadió 3 volúmenes de NaI y se incubó a 55 °C hasta que el gel se haya diluido. Posteriormente se le agregan 10 ul de glassmilk, se mezcla y se centrifuga por 3 min a 13 mil rpb. El pellet es lavado dos veces con 500 ul de New Wash y finalmente mezclado con agua. Se centrifuga y el sobrenadante contiene el DNA.

7.18 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Se tomaron 0.26 pmol de DNA purificado y varias cantidades de la proteína purificada PsrA-His según se indique, las cuales fueron incubadas por 25 min a temperatura ambiente en una mezcla de reacción de 20 ul conteniendo el buffer de unión a 1X (10 mM de Tris-HCL, 50 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0,5 mM de EDTA, 5% de glicerol y BSA 10 ug/ul). Las muestras fueron posteriormente separadas por electroforesis en gel de acrilamida no desnaturizante al 6% en buffer 1X de TBE el cual se corrió a 20 mA. El gel se seco y se expuso en un casete de Fosforimager^R, al cabo de 24 horas se reveló.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la inactivación del gen en la síntesis de alginato, PHB y AR's.

8.1.1 Confirmación de la mutante *psrA*

La cepa AT*psrA* es una derivada de la cepa silvestre ATCC9046 que lleva una mutación en el gen *psrA* que consiste en la inserción del casete de espectinomicina (*Sp*) fusionado al reportero *gusA* entre dos sitios *Xho*I dentro del gen (Sampieri-Hernandez, 2006). En este trabajo se confirmó la presencia de la mutación *psrA*::*Sp-gusA* en la cepa AT*psrA* a través de PCR; para ello, se extrajo DNA cromosomal tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante y se utilizaron los oligos que amplificaban un fragmento de 1.5 kb que corresponde al locus donde se encuentra el gen *psrA*. Mientras que para el DNA de la cepa silvestre se amplificó el gen, para la cepa mutante no se obtuvo dicho fragmento, esto debido a que las condiciones del PCR no permiten amplificar un fragmento de 5.5 kb que corresponde al gen *psrA* más el gen reportero *gusA* unido al casete de resistencia (Fig. 6).

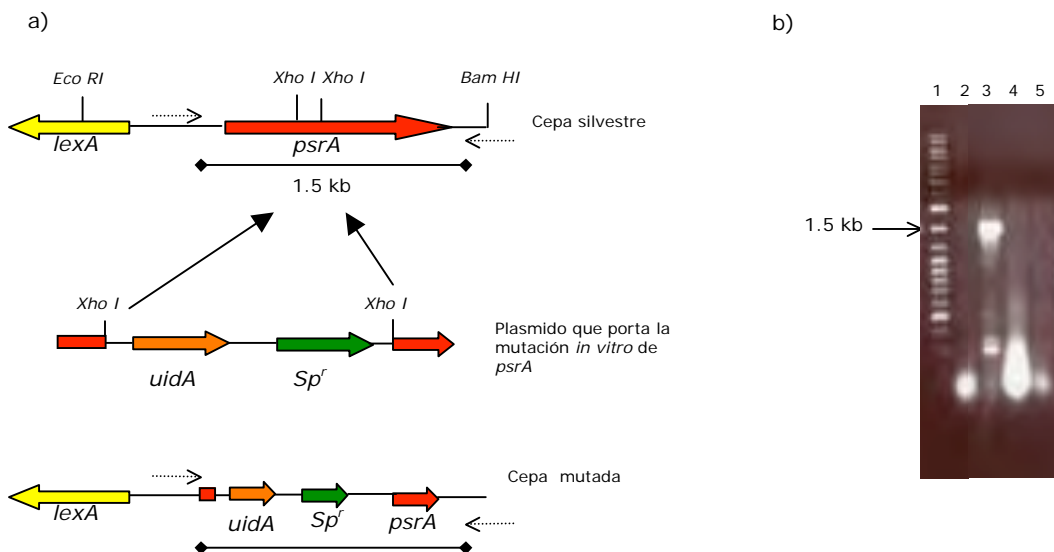


Fig 6. a) Esquema de la mutación en el gen *psrA* en el cual se le insertó el casete de *Sp^r* fusionado al reportero *gusA* en la misma orientación que la transcripción del gen, se muestran los tamaños de los fragmentos que flanquean los oligos de *psrA*, b) electroforesis de los PCR's, carril 1) MPM, 4) ATCC silvestre, 5 y 6) mutante en el gen *psrA*.

Finalmente, para confirmar que el fragmento amplificado contuviera el gen *psrA*, se realizó una digestión con la enzima *Pst*I ya que 194 pb después del ATG tiene un sitio de corte. Esta enzima genera dos fragmentos, uno de 652 pb y otro de 851 pb como se muestra en la figura 7. Por lo tanto, el producto amplificado del DNA de la cepa silvestre contiene en su parte central al gen *psrA*.

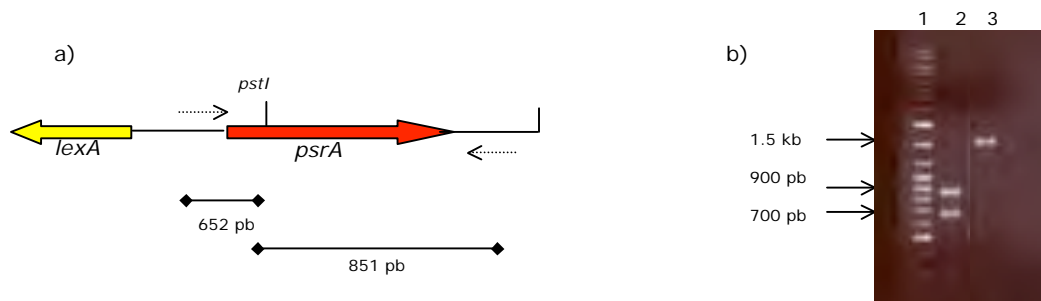


Fig. 7. a) Mapa de restricción del fragmento de 1.5 kb que en su parte central contiene el gen *psrA*, b) electroforesis de la restricción, 1) MPM, 2) Producto de PCR de 1.5 kb cortado con *PstI*, 3) Producto de PCR sin cortar.

8.1.2 Fenotipo de crecimiento.

Una vez confirmada la mutación en el gen *psrA*, se realizó una curva de crecimiento para determinar si esta mutación afecta el crecimiento celular. La mutante se comparó con la cepa silvestre y con las cepas mutadas en los genes *gacA* (ATgacA), *rpoS* (ATrpoS), *rsmA* (ATrsmA) y *rsmB* (ATrsmB) (Fig. 8).

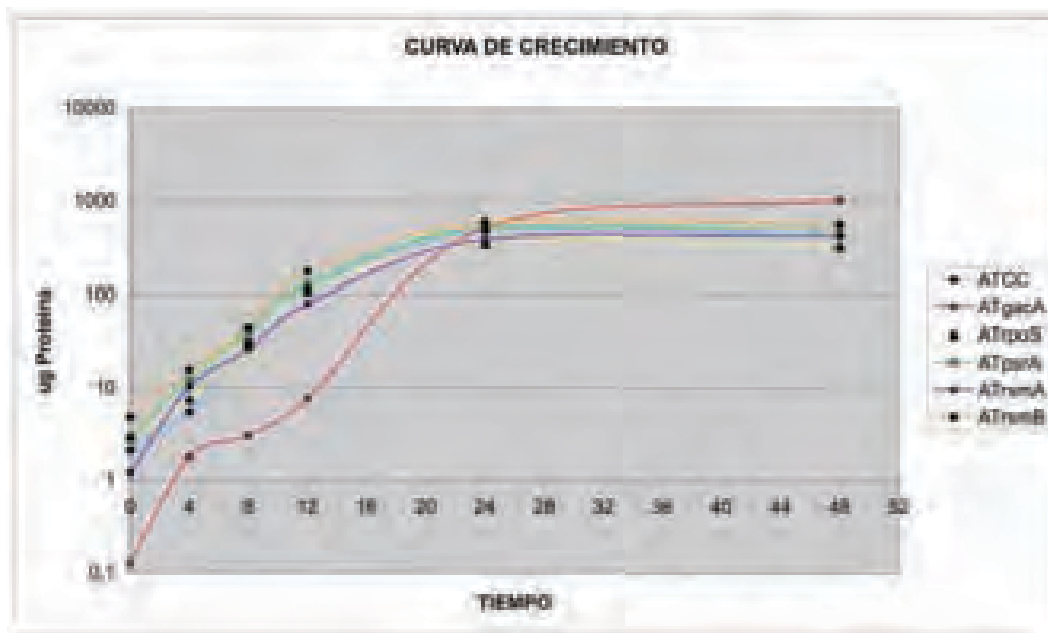


Fig. 8. Curva de crecimiento de las mutantes *psrA* (ATpsrA), *gacA* (ATgacA), *rpoS* (ATrpoS), *rsmA* (ATrsmA) *rsmB* (ATrsmB) y de la cepa silvestre (ATCC) crecidas en medio BS a 30 °C y 200 rpm.

Como se puede observar en la gráfica, la mutación en *psrA* no tuvo efecto en el crecimiento, así como tampoco lo hubo en las cepas mutadas en el sistema Rsm y RpoS. Sin embargo, la cepa que lleva la mutación en el regulador global GacA mostró una alteración en el crecimiento. Debido probablemente a que el inóculo (número de células) fue mucho menor en la cepa ATgacA que en las otras cepas, se realizó una curva de crecimiento de la mutante *gacA* estandarizando el inóculo con la cepa silvestre (Fig. 9).

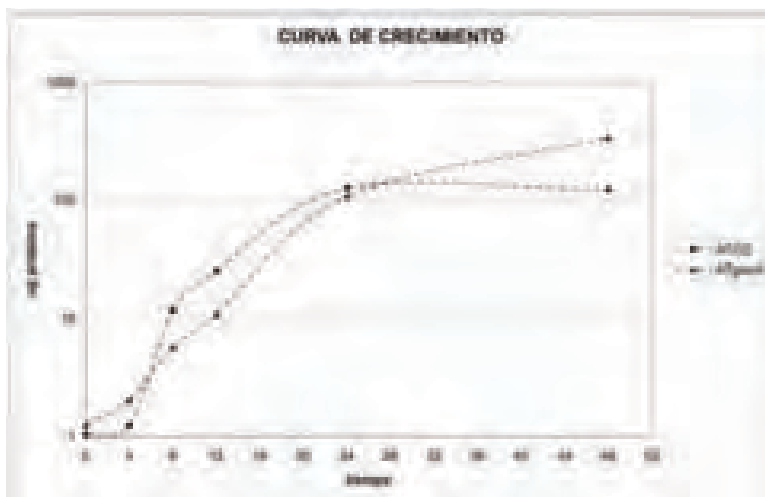


Fig. 9. Grafica de la curva de crecimiento de la cepa silvestre (ATCC) en comparación con la cepa ATgacA con un inóculo estandarizado.

En la gráfica se puede observar que al iniciar con un inóculo igual a la cepa silvestre el crecimiento de la cepa ATgacA es semejante a la de la silvestre. Sin embargo, el cultivo de la cepa ATgacA no presenta una fase lag al inicio del cultivo y produce mayor biomasa al final de la fase estacionaria.

8.1.3 Fenotipo de alginato

Posteriormente se determinó el fenotipo de la mutante *psrA* en la síntesis de alginato. Si ejercía un control sobre la transcripción de *rpoS* tan marcado como sucede en *Pseudomonas*, entonces el fenotipo tendría que ser parecido a la mutante en *rpoS*. Se cuantificó la producción de alginato de la mutante ATpsrA y se comparó con las cepas ATgacA, ATrpoS, ATrsmA, ATrsmB y con la cepa silvestre (Fig. 10). Por lo reportado anteriormente se sabe que GacA regula al factor transcripcional RpoS. Sin embargo, se desconoce si esta regulación es directa o indirecta; además también se ha reportado que GacA regula al sistema Rsm que está implicado en la regulación de la síntesis de dicho polímero (Manzo *et al.*, sometido).

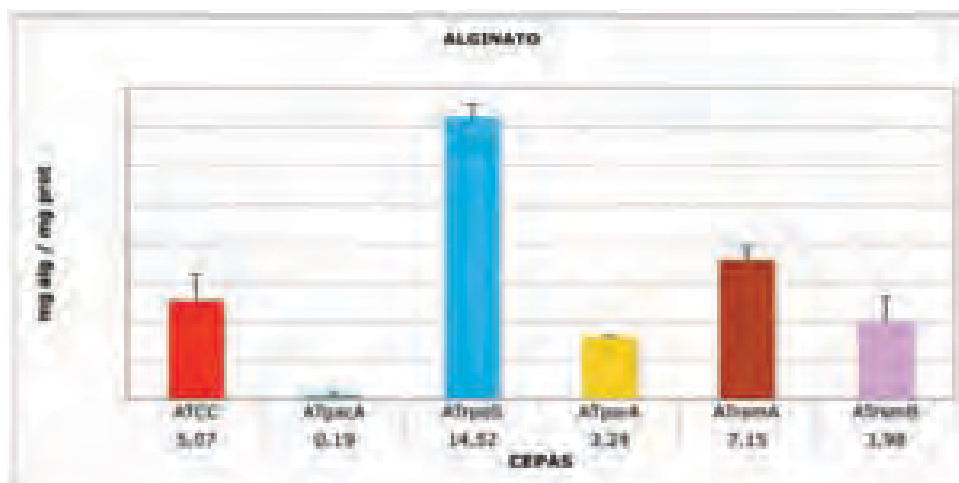


Fig. 10. Cuantificación de alginato en las cepas ATgacA, ATrpoS, ATpsrA, ATrsmA y ATrsmB comparado con la cepa silvestre (ATCC). Las barras muestran la desviación estándar de 3 repeticiones.

Como se muestra en la figura 10, en la cepa ATgacA se abate completamente la síntesis de alginato mientras que en la cepa ATrsmA, cuya mutación esta en la proteína represora del sistema Rsm, aumenta la síntesis y una mutante en el RNA que antagoniza el efecto de RsmA, ATrsmB, la disminuye parcialmente, estos datos son semejantes a los obtenidos por Manzo *et al.*, (sometido) en cepas de *A. vinelandii* derivadas de la AEIV, que a diferencia de la cepa ATCC, es una cepa no sobreproductora de alginato.

La producción de alginato en la cepa ATrpoS es 3 veces mayor con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, debido a que proponemos que PsaA regula a *rpoS*, en la mutante en *psrA* se esperaba un fenotipo similar al obtenido con la mutante *rpoS*, en la figura anterior se puede observar que la cepa ATpsrA disminuye la síntesis del polímero casi a la mitad con respecto a la cepa silvestre. Este resultado indica que, contrario a lo esperado, las mutaciones en *rpoS* y *psrA* tienen efectos diferentes en la producción de alginato.

8.1.4 Fenotipo de PHB

También se determinó el efecto de la mutación en *psrA* sobre la producción de PHB, como se muestra en la figura 11, el efecto es semejante al afecto sobre alginato, la cepa ATgacA tiene reducido hasta casi un 80% la producción de PHB al que la cepa ATrsmB (casi un 50%), mientras que para la ATrsmA hay una producción mayor con respecto a la silvestre, estos datos son semejantes a los obtenidos por Manzo *et al.*, (sometido).

Al igual que para la síntesis de alginato, la cepa ATrpoS tiene una producción de PHB de un 40% mas con respecto a la cepa silvestre mientras que la ATpsrA tiene una producción ligeramente menor que la silvestre y mucho menor que la cepa ATrpoS.

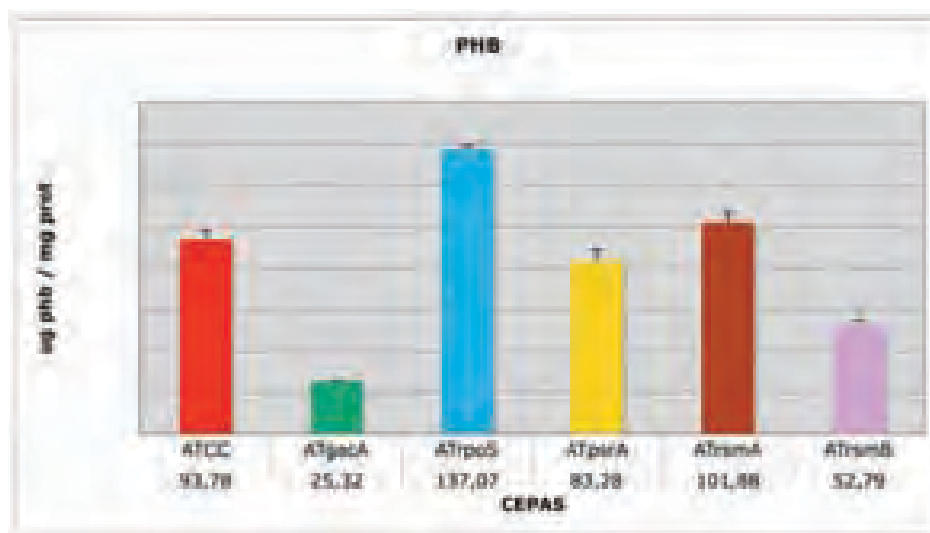


Fig. 11. Cuantificación de PHB en las cepas ATgacA, ATrpoS, ATpsrA, ATrsmA y ATrsmB comparadas con la cepa silvestre (ATCC), las barras representan la desviación estándar de 3 repeticiones.

8.1.5 Fenotipo de alquilresorcinoles

Una vez obtenidos los fenotipos de alginato y PHB, se determinó como afecta la mutación en *psrA* la síntesis de los lípidos fenólicos, alquilresorcinoles, ya que por lo

reportado anteriormente se sabe que el sistema Rsm, así como Gac/RpoS están implicados en su regulación (Romero-Ramírez, 2008). Inicialmente se observó el fenotipo en caja creciendo las cepas en agar Buk-butanol y tiñendolas con la solución reveladora la cual se intercala en los anillos fenólicos de los AR's (Fig. 12)

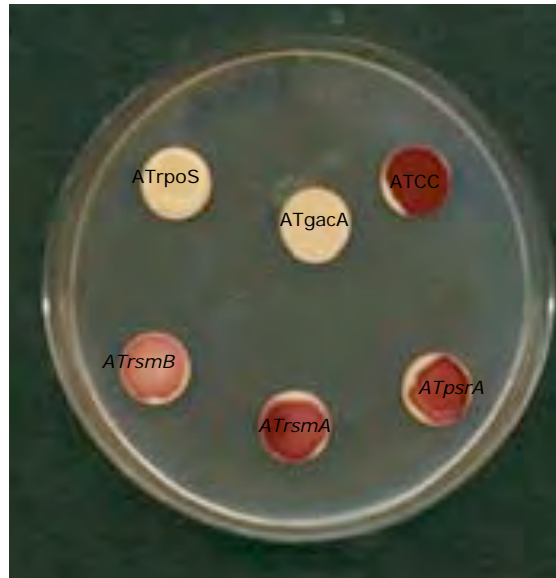


Fig. 12. Fenotipo en placa de producción de alquilresorcinoles en las cepas ATgacA, ATrpoS, ATpsrA, ATrsmA, ATrsmB y en la silvestre (ATCC).

Como se observa en la placa, las cepas ATrpoS y la ATgacA no producen alquilresorcinoles; sin embargo, la cepa ATpsrA si los producen, así como las mutantes en el sistema Rsm. Por ello realizamos la cuantificación de los lípidos para conocer el grado de afectación de las mutantes sobre la síntesis de lípidos fenólicos (Fig. 13).

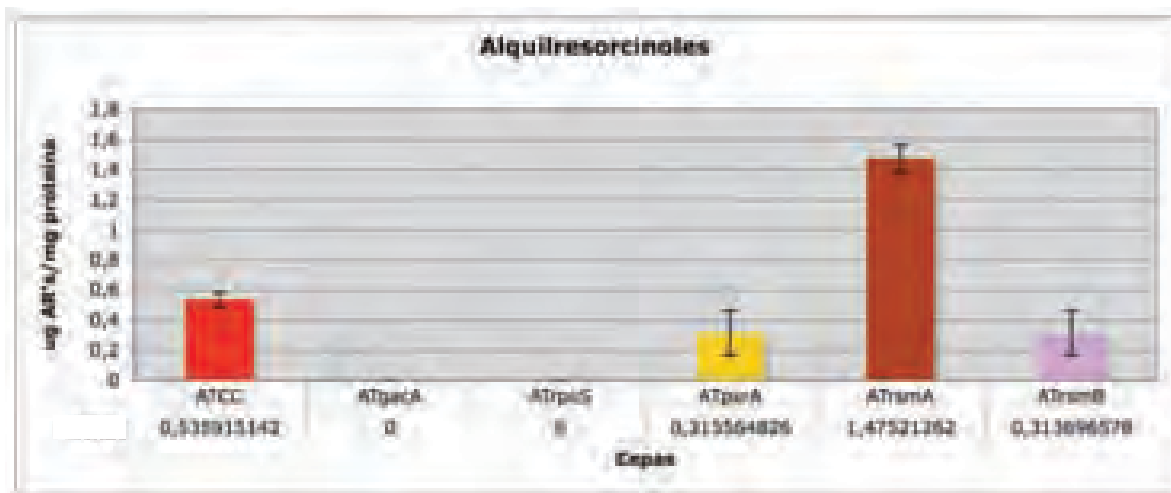


Fig. 13. Cuantificación de alquilresorcinoles en la cepa silvestre (ATCC) y en las cepas ATgacA, ATrpoS, ATpsrA, ATrsmA y ATrsmB. Las barras muestran la desviación estándar de 2 repeticiones.

En la figura 13 se puede corroborar que las mutantes en RpoS y GacA no producen los lípidos; sin embargo, las mutantes en el sistema Rsm muestran fenotipos contrarios: una sobre producción cuando se muta el gen que codifica para la proteína

represora, RsmA, y una disminución cuando se muta el gen que codifica para el RNA antagonista. Estos datos corroboran los obtenidos anteriormente por Romero-Ramírez (2008) quién propone que tanto GacA como RpoS regulan de forma positiva a un regulador transcripcional, ArsR, que está implicado en activar la transcripción de *arsA* el primer gen del operón que codifica para los genes biosintéticos de los alquilresorcinoles. Así la proteína RsmA podría unirse al RNA mensajero del regulador, *arsR*, o al RNA mensajero de *arsA*.

En lo que respecta a la mutante en *PsrA*, hay producción de los lípidos; sin embargo, la producción es menor que la cepa silvestre. Por lo tanto, es posible que haya aún cierta transcripción del gen *rpoS* que esté activando el operón de los genes que participan en la producción de los alquilresorcinoles.

8.2 *PsrA* regula positivamente la transcripción del gene *rpoS*

Para determinar si *PsrA* regula a *rpoS*, tal y como ha sido documentado en *Pseudomonas* spp. (Kojic *et al.*, 2001, 2002, 2005), se realizaron experimentos de qPCR en el cual se cuantificó el nivel del transcrito de *rpoS* en la cepa AT*psrA* y se comparó con la cepa silvestre (Fig. 14).

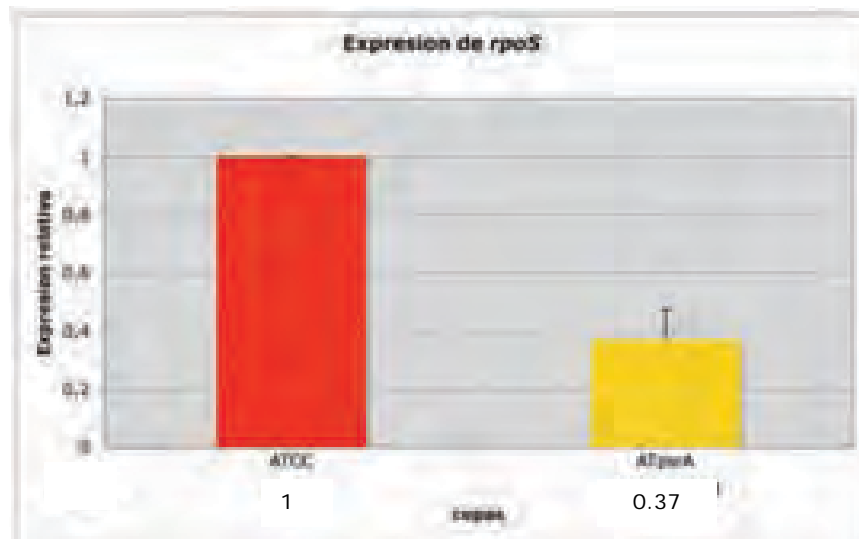


Fig. 14. Expresión del gen *rpoS* en la cepa AT*psrA* y en la cepa silvestre (ATCC), las barras muestran la desviación estándar.

Como se observa en la figura 14, el transcrito de *rpoS* disminuye casi un 60% en la cepa AT*psrA* con respecto a la silvestre, indicando que *PsrA* regula la expresión del factor transcripcional RpoS. Sin embargo, la disminución no es tan marcada como sucede en *P. putida*, en donde la expresión a partir del promotor de *rpoS* disminuye 90% en la mutante en *psrA*.

Una vez confirmada la hipótesis de que *PsrA* regula a *rpoS*, se identificó el sitio de inicio de la transcripción de *rpoS* a través de la extensión del iniciador para proponer el tipo de promotor que activa la transcripción de RpoS y para ubicar las cajas a las que hipotéticamente *PsrA* se une (Fig. 15).

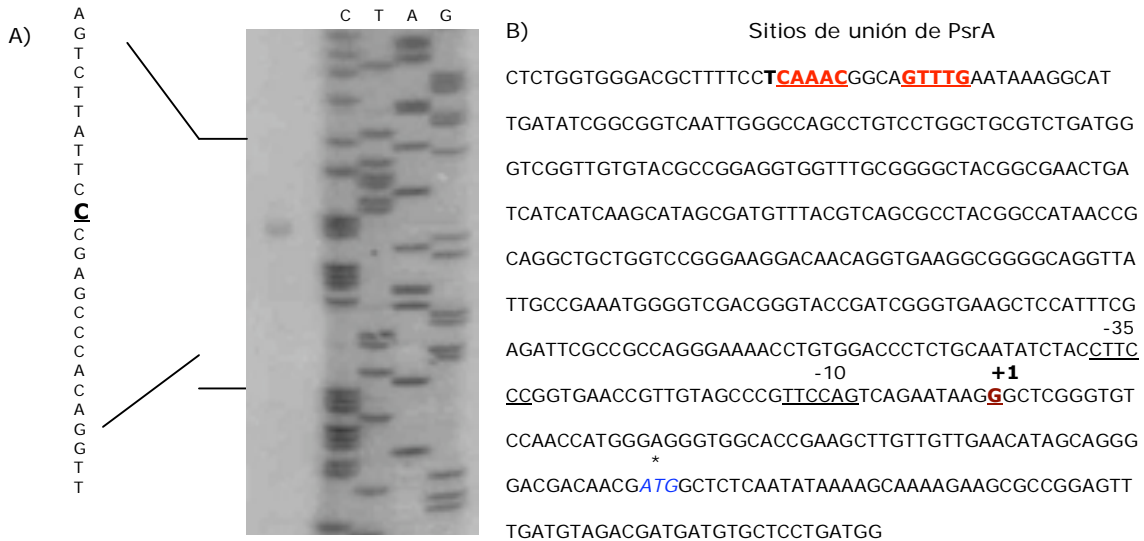


Fig. 15. A) Extensión del iniciador de *rpoS* mapeando el sitio de inicio de la transcripción, b) Secuencia nucleotídica de *rpoS*, el +1 y el asterisco indica los sitios de inicio transcripcional y traduccional respectivamente, en rojo y subrayado se indica el sitio putativo de unión a PsrA.

Como se observa en la imagen de la figura 15, el sitio de inicio de la transcripción se ubica a 68 nt con respecto al codón de inicio y la caja -10 y -35 no muestran consenso con algún promotor típico de sigma 70, contrariamente a lo reportado para *E. coli* (Lange *et al.*, 1995). El sitio putativo de pegado de PsrA se ubica en la región -336 a -350 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Esto difiere en gran medida con lo reportado en *Pseudomonas* spp. en la donde la secuencia de pegado de PsrA sobre *rpoS* se da en la región -35 a -59 con respecto del sitio de inicio de la transcripción.

Para determinar si PsrA activa directamente la transcripción de RpoS se realizaron los ensayos de unión correspondientes. Para clonar, expresar y purificar la proteína PsrA se diseñaron oligos que amplifican un fragmento de 700 pb que corresponde a la región estructural del gen *psrA* eliminando los codones de inicio y de término, esto con el fin de clonar la proteína bajo un promotor inducible y posteriormente expresarla. Una vez obtenido el fragmento de DNA se purificó y clonó en el vector pBAD TOPO (Invitrogen^R), el cual permite clonar en fase añadiendo una secuencia que codifica para 6 histidinas al carboxilo terminal, lo cual permite purificarla a través de una columna de níquel; además el promotor es inducible con arabinosa y porta el casete de resistencia a ampicilina (Fig. 16).

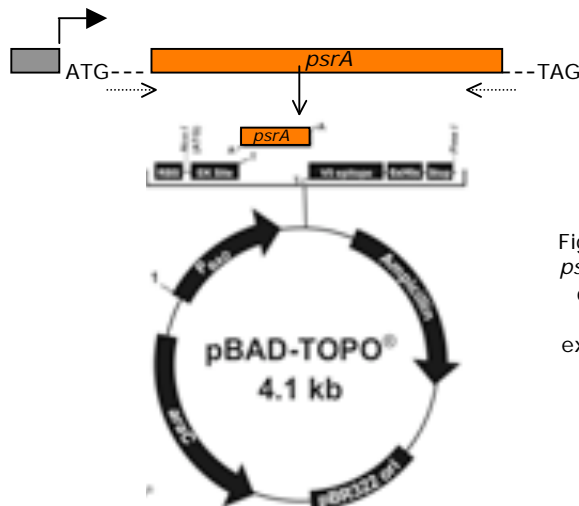


Fig. 16. La región estructural de *psrA*, sin los codones de inicio y de término fue clonada en el vector pBAD TOPO para expresar y purificar la proteína.

La reacción de ligación fue transformada en la cepa de *E. coli* Top10. Las bacterias transformadas se sembraron en cajas de agar con ampicilina. De las clonas obtenidas se eligieron 5 a las cuales se les extrajo DNA plasmídico que se digirió con la enzima de restricción *Xho* I linearizando el plásmido para dar un peso aproximado de 4.8 kb que corresponde al peso del vector (4.1 kb) mas el inserto (0.7 kb). Estas clonas se usaron como templado para un PCR con el oligo 5' del gen *psrA* y el oligo 3' del vector pBAD TOPO, las clonas conteniendo el inserto amplificaron un fragmento de 870 pb que corresponde al gen *psrA* (0.7 kb) mas un fragmento del vector (0.17 kb) (Fig. 17).

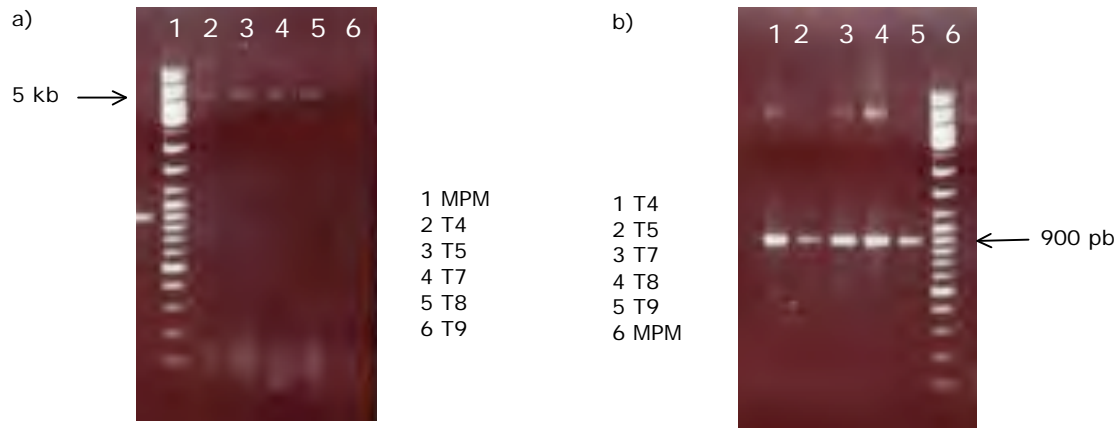


Fig. 17. a) Electroforesis de las posibles clonas que portan la región estructural de *psrA* en el vector pBAD-TOPO digeridas con *Xho*I, b) electroforesis del PCR de las clonas anteriores, que amplifican la región estructural de *psrA* y un fragmento del vector.

Posteriormente el plásmido de las clonas T5 y T8 fue secuenciado, los resultados (no mostrados) indicaron que en ambas el inserto estaba en fase y no tenía mutaciones. La clona T5 se eligió para expresar la proteína con una concentración de arabinosa del 0.2%. La proteína se expresó y purificó como se indica en material y métodos, colectando varias fracciones, las cuales fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y se tiñó con solución de Coomassie. Como se muestra en la figura 18, las fracciones eluidas de la columna muestran una proteína de alrededor de 29 kDa. La proteína *PsrA* tiene un peso de 27 kDa, sin embargo, al clonarse en el vector se fusiona con un fragmento que contiene las colas de histidinas en el carboxilo terminal, aumentando el peso de la proteína en ~2 kDa, por lo tanto, la proteína obtenida corresponde a *PsrA*. Finalmente, fue concentrada usando los filtros de Amicon^R, lo que permitió también cambiar el buffer en el cual la proteína estaba resuspendida.

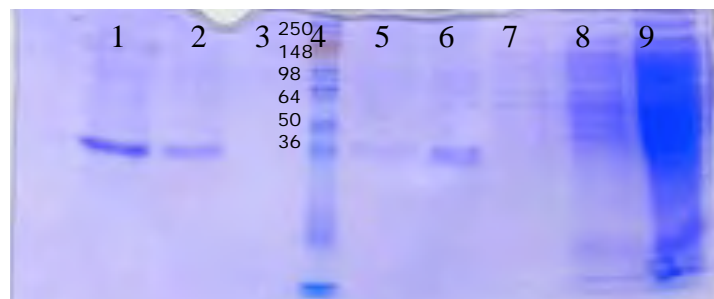


Fig. 18. Electroforesis en gel de acrilamida de las fracciones obtenidas en la purificación de *PsrA*, 1. Concentrado, 2-3. Lavado del concentrado, 4. MPM en kDa, 5-7. Elusiones, 8. Lavado, 9. Extracto crudo.

Para obtener el fragmento de DNA de *rpoS* al cual PsrA hipotéticamente se une, se diseñaron oligos que amplifican un fragmento de 500 pb, que corresponde a la región intergénica del gen *rpoS* incluyendo el promotor y las cajas de unión ubicadas 336 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. En la figura 19 se muestra el producto de PCR esperado.

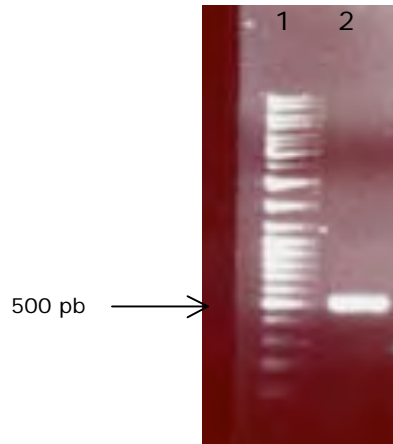


Fig. 19. Electroforesis del PCR para amplificar la región líder de *rpoS* de 500 pb.

Teniendo las condiciones para obtener el fragmento, se realizó un segundo PCR, usando dCTP con el fin de marcar todo el fragmento de DNA. El producto de PCR fue purificado a partir de agarosa usando el kit Gene Clean^R. El fragmento de DNA y la proteína se procedió a cuantificarlos.

Se realizaron ensayos tipo EMSA para evidenciar la posible interacción de PsrA sobre la región reguladora de *rpoS*; para ello se usaron 100 ng de DNA marcado radiactivamente y varias cantidades de la proteína PsrA-His purificada en el rango de 0 a 8 uM (Fig. 20)

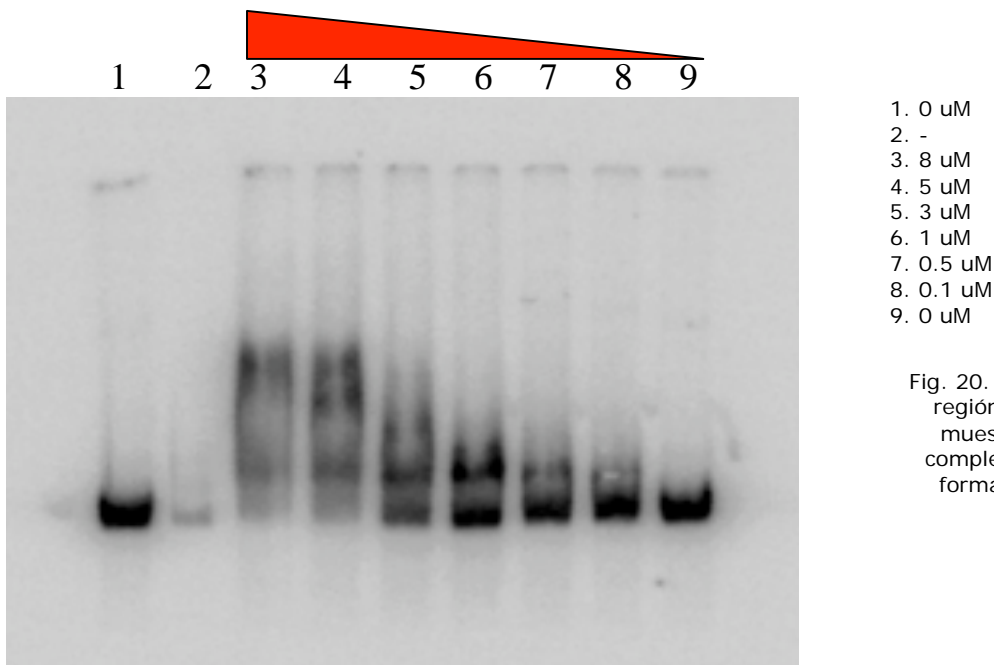


Fig. 20. EMSA de PsrA sobre la región líder *rpoS*, como se muestra en la imagen, el complejo Proteína – DNA se forma a partir de 0.1 uM.

Como se observa en la figura 20, la proteína PsrA se une a la región reguladora de *rpoS* desde 0.1 uM siendo mas evidente a 5 uM. Posteriormente se repitió el ensayo, pero esta vez se usó un fragmento de DNA de 210 pb el cual contiene las secuencias hipotéticas de unión a PsrA. En el mismo ensayo también se puso a interactuar la proteína con un fragmento de DNA inespecífico siendo esta la región intergénica de *phbB* de 290 pb. Las concentraciones de PsrA-His usadas fueron de 0 a 3 uM y se usaron 0.16 pmol de DNA de cada fragmento, tal y como está reportado en la literatura (Venturi *et al.*, 2002) (Fig. 21). Como se observa en la figura 21, no hay cambio de movilidad con el DNA inespecífico pero si con *rpoS*, por lo tanto, PsrA activa la transcripción de *rpoS* uniéndose directamente a su región reguladora.

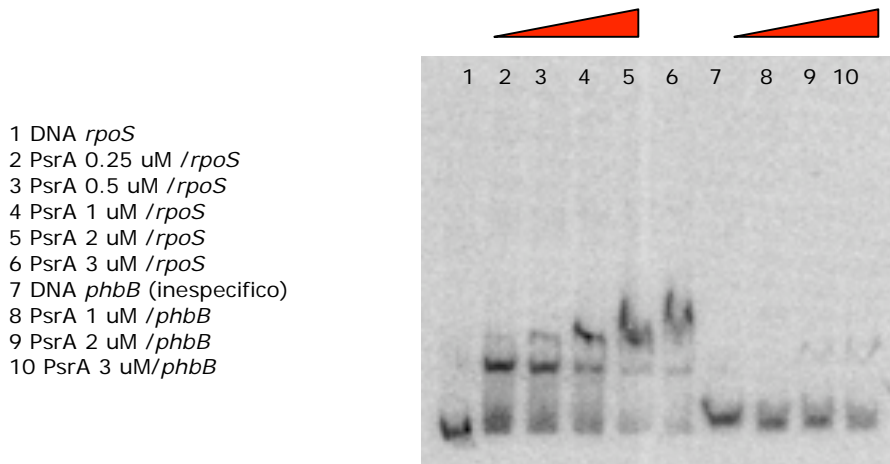


Fig. 21. EMSA de PsrA con la región líder de *rpoS* y la región líder de *phbB* como control negativo, no hay cambio de movilidad con la región líder de *phbB*.

Paralelamente se realizaron ensayos de competencia de la proteína PsrA con la región reguladora de *rpoS* de 210 pb marcada radiativamente (DNA caliente) y sin marcar (DNA frío) aumentando la concentración de esta última. Al haber mas DNA frío, éste competirá por la proteína y el retardo dejará de ser visible. De la misma manera se realizaron ensayos de competencia utilizando DNA frío inespecífico, el cual fue nuevamente la región reguladora de *phbB*, esperando que el retardo no cambiara aún en concentraciones crecientes del DNA inespecífico. Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente y se usó la concentración máxima a la que PsrA retarda a *rpoS* (Fig. 22)

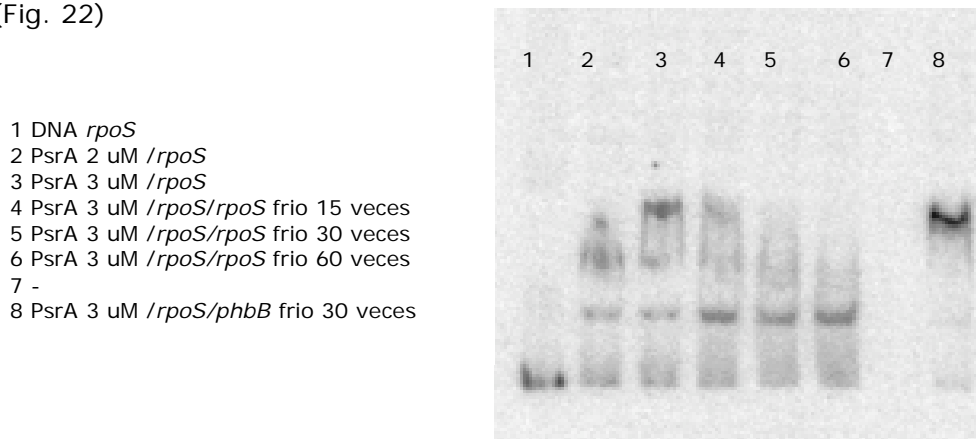


Fig. 22. Ensayos de competencia entre *rpoS* caliente con *rpoS* frío al interactuar con PsrA (carril 4-6), y de *rpoS* caliente con DNA frío inespecífico (*phbB*) (carril 8).

Como se puede observar en la figura 22, en los primeros carriles (2-3) se muestra nuevamente la interacción de PsrA con la región reguladora de *rpoS*. Sin embargo, cuando en la reacción se le añade DNA frío éste compite con el caliente uniéndose a la proteína. A medida que se aumentan las concentraciones (hasta 60 veces) de *rpoS* frío se dejan de observar los complejos del retardo (carriles 4 – 6). Por otra parte, cuando la competencia se da entre *rpoS* caliente y un DNA frío inespecífico, no hay cambios en la interacción PsrA/*rpoS*, esto es porque el DNA inespecífico no compite y no se une a la proteína aun cuando se aumenta en 30 veces su concentración (carril 8). De esta forma, se demuestra que la interacción PsrA/*rpoS* es específica.

8.3 La proteína PsrA no ejerce una regulación sobre la expresión de *rsmA*.

Como se mencionó anteriormente, en *Pseudomonas syringae* pv. tomato cepa DC300 se encontró que la mutación de PsrA afecta la expresión de *rsmA* y se concluyó que PsrA regula de forma negativa la expresión de *rsmA* (Chatterjee *et al.*, 2007). Por estos antecedentes decidimos explorar si en *A. vinelandii* PsrA regula a RsmA de la misma forma que lo hace en *Pseudomonas syringae* y de esta manera regular la producción de los polimeros PHB y alginato en la bacteria. Para ello realizamos qPCR utilizando oligos específicos que amplifican un fragmento de 100 pb del gen *rsmA* y medimos la expresión de *rsmA* en la cepa ATpsrA y en la cepa silvestre; los datos se muestran en la figura 23.

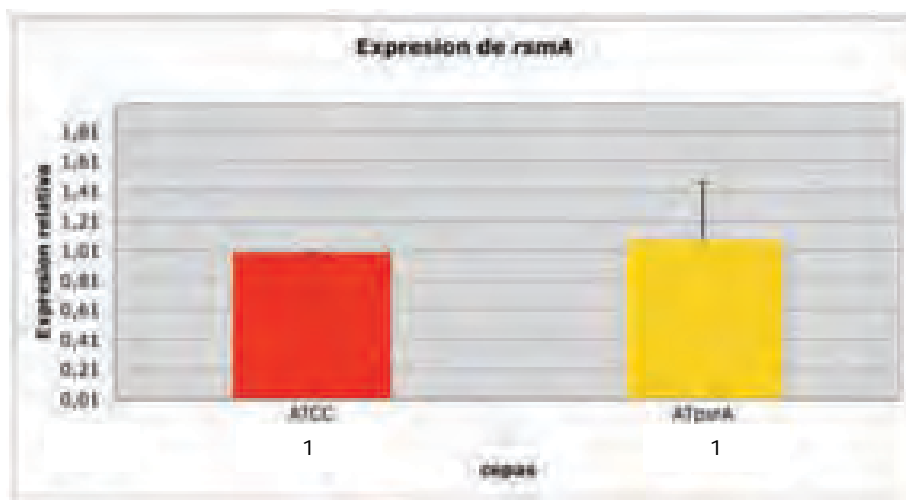


Fig. 23. qPCR donde se muestra la expresión del gen *rsmA* en la cepa silvestre (ATCC) y en la cepa ATpsrA, las barras indican la desviación estándar de tres repeticiones.

Como se observa, la transcripción de *rsmA* en la cepa ATpsrA es semejante a la cepa silvestre lo que parece indicar que PsrA no regula a *rsmA*.

8.3.1 RpoS regula a *rsmA*

La producción de alginato y PHB, superior a la cepa silvestre, en las mutantes en *rsmA* y *rpoS* sugería que puede existir una relación entre estas proteínas, además de que en la literatura se tiene documentado que en *E. carotovora* existe una disminución del transcrito en *rsmA* cuando se muta a RpoS, esto visualizado a través

de un ensayo tipo Northern (Mukherjee *et al.*, 1998). En base a esto realizamos experimentos de qPCR para saber si en *A. vinelandii* RpoS regula a *rsmA*, para ello se diseñaron oligos que amplifican un fragmento de alrededor de 100 pb de *rsmA* cercano al sitio de inicio de la traducción, se midió el transcrito de *rsmA* en la cepa ATrpoS y se comparó con la cepa silvestre (Fig. 24).

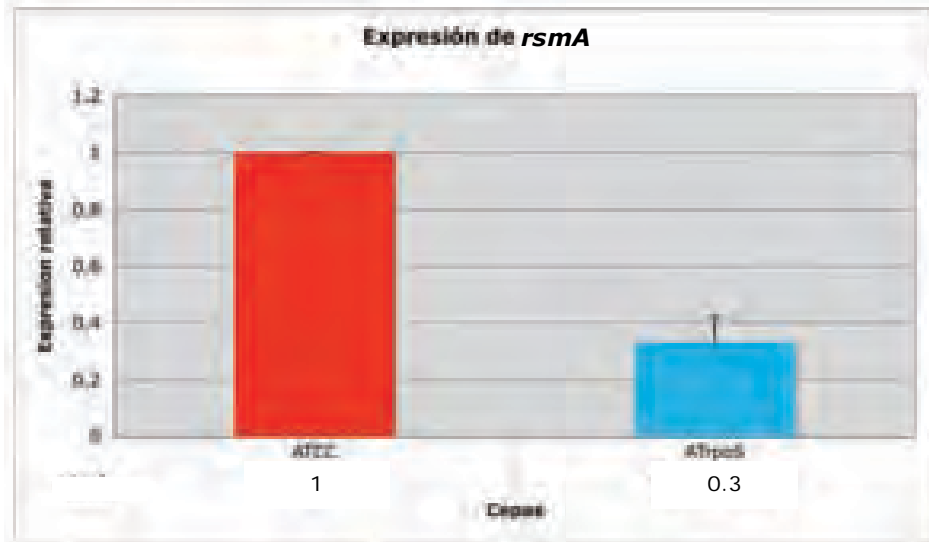


Fig. 24. qPCR donde se muestra la expresión del gen *rsmA* en la cepa silvestre y en la cepa ATrpoS, las barras indican la desviación estándar de tres experimentos.

Como se muestra en la figura 24, la transcripción de *rsmA* en ATrpoS disminuye hasta casi un 70% con respecto a la cepa silvestre. De esta forma, RpoS regula de forma positiva la expresión de la proteína represora del sistema Rsm.

Posteriormente, se realizaron experimentos de extensión del iniciador para conocer el sitio de inicio de la transcripción de *rsmA* y encontrar un posible promotor que sea reconocido por RpoS (Fig. 25)

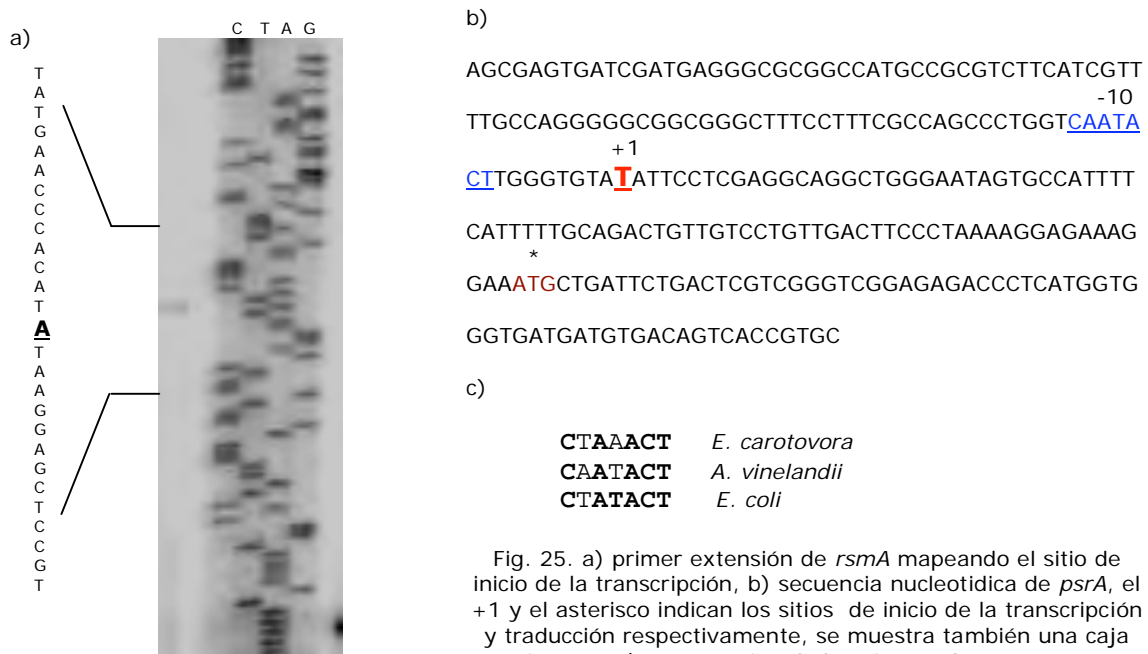


Fig. 25. a) primer extensión de *rsmA* mapeando el sitio de inicio de la transcripción, b) secuencia nucleotídica de *psrA*, el +1 y el asterisco indican los sitios de inicio de la transcripción y traducción respectivamente, se muestra también una caja putativa -10, c) comparación de la caja -10 de *E. carotovora* y *E. coli* con la de *A. vinelandii* que es reconocida por el factor sigma S.

Los datos obtenidos con la extensión del iniciador ubican un sitio de inicio de la transcripción -83 nt corriente arriba al sitio de inicio de la traducción del gen: la caja de -10 comprende la secuencia CAATACT y no parece haber un consenso para la caja -35. Esta caja -10 es muy parecida a aquellos promotores que son dependientes de RpoS y es semejante con la reportada por Mukherjee (1998) en *E. carotovora* y aún más con la de *E. coli*.

Para confirmar que el promotor de *rsmA* es dependiente de RpoS, se realizó nuevamente el ensayo de extensión del iniciador pero esta vez en la cepa ATrpoS y se comparó con la cepa silvestre, como se observa en la figura 26, la señal del inicio de *rsmA* no se detectó en la mutante en *rpoS*.

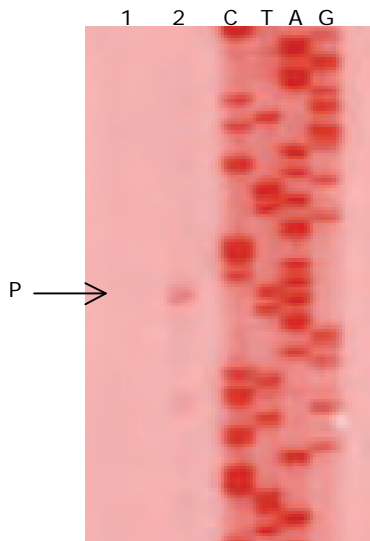


Fig. 26. Primer extensión de *rsmA* en la cepa ATrpoS (carril 1) y en la cepa silvestre (carril 2), la señal del iniciador de *rsmA* en la mutante en *rpoS* no se detectó, confirmando que el promotor de *rsmA* es sigma S dependiente.

Por lo tanto, en *A. vinelandii* RpoS activa la transcripción de *rsmA*, el gen que codifica para el represor postranscripcional.

8.4 Efecto de mutaciones en *gacA*, *rpoS*, *rsmA* y *rsmB* sobre la transcripción de *psrA*.

Otro de los objetivos importantes en este trabajo fue estudiar la regulación de la expresión de *psrA* y nos interesó saber si alguno de los componentes que integran del sistema Gac o Rsm participan en regular la expresión de nuestro gen de interés. Para ello se realizó la cuantificación del transcrito de *psrA* en las cepas ATgacA, ATrpoS, ATrsmA y ATrsmB. Se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 100 pb cerca del sitio de inicio del gen *psrA*; los datos obtenidos se muestran en la figura 27.

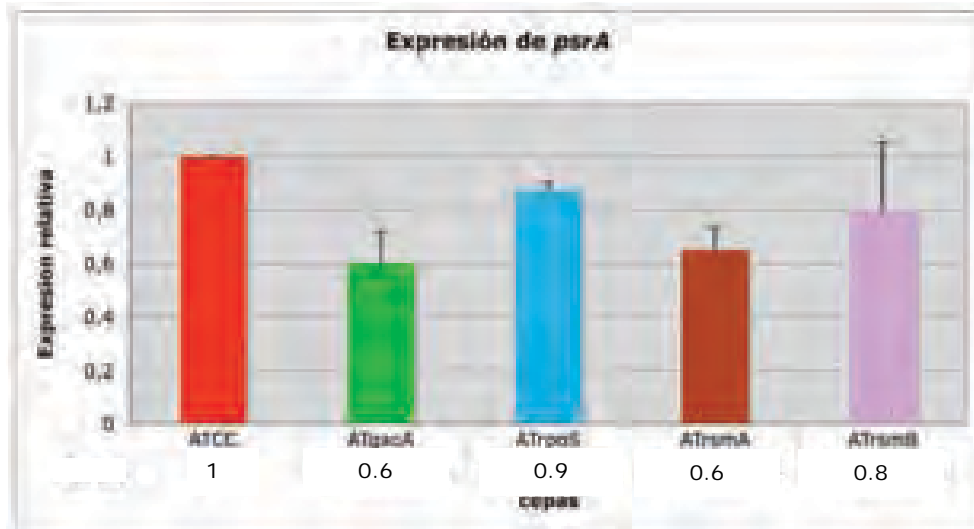


Fig. 27. Expresión relativa del gen *psrA* en las mutantes *gacA*, *rpoS*, *rsmA* y *rsmB* en comparación con la cepa silvestre, las barras muestran la desviación estándar de tres experimentos.

Los datos arrojados muestran que el regulador global GacA y RsmA estarían influenciando de manera positiva la expresión de PsrA ya que el transcrito en la cepa ATgacA se reduce en un 40% mientras que en la ATrsmA lo hace en un 35%, no siendo el caso para ATrpoS ni para ATrsmB.

8.4.1 GacA y su relación con *psrA*.

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de qPCR, hipotetizamos que GacA podría regular positivamente la expresión de *psrA*. Esta regulación, de existir, pudiera darse de manera directa, de modo que para comprobarlo nos propusimos realizar ensayos EMSA usando la proteína GacA purificada y la región líder de *psrA*.

Para expresar y obtener la proteína GacA utilizamos el plásmido que el Dr. Castañeda nos donó. Brevemente, Castañeda clonó la región estructural del gen sin los codones de inicio y término en el vector pBAD TOPO. La construcción fue transformada en la cepa de *E. coli* LMG194. La inducción se hizo con arabinosa en una concentración final de 2% en el medio; después de la extracción las fracciones fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. La figura 28 muestra que se logró purificar la proteína GacA la cual tiene un peso aproximado de 25 kDa más 2 kDa que añade el vector.

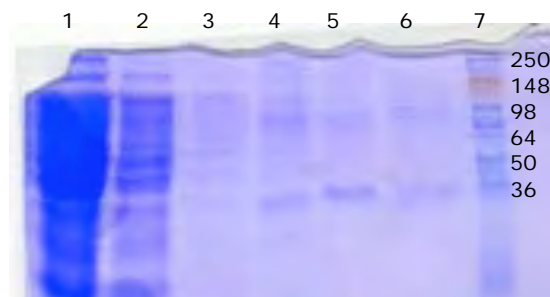


Fig. 28. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones obtenidas de la purificación de GacA, 1) Extracto crudo, 2-3) lavados, 4-6) eluciones, 7) Marcador de peso molecular.

Posteriormente se purificó la región líder de PsrA. Para ello se diseñaron oligos que amplifican un fragmento de 262 pb conteniendo al promotor y parte de la región intergénica (Fig. 29). Después de obtener las condiciones óptimas para amplificar el fragmento se realizó un segundo PCR utilizando el dCTP marcado radiactivamente, se realizó electroforesis en gel de agarosa y la banda obtenida fue purificada. La proteína concentrada y el DNA purificado fueron cuantificados.

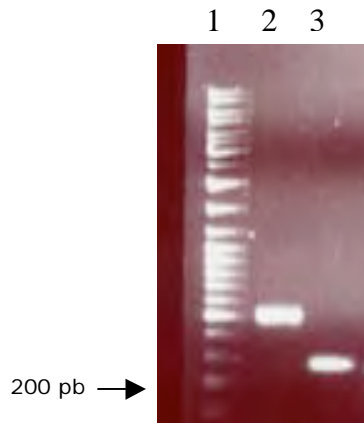


Fig 29. PCR de la región líder de *psrA* para realizar los ensayos de EMSA, carril 1) MPM, 3) región líder de *psrA*.

Se realizaron ensayos tipo EMSA para evaluar la posible interacción de GacA sobre la región reguladora de *psrA*; para ello se usaron 100 ng de DNA marcado radiactivamente y varias cantidades de la proteína purificada GacA-His cuyo rango fue de 0 a 8 uM. Sin embargo, intentos por visualizar la posible unión no fueron fructíferos esto debido a quizá un problema con la proteína.

8.5 PsrA regula negativamente su propia expresión.

En *Pseudomonas* spp., PsrA regula su expresión de forma negativa ya que se une en las secuencias -18 a +20 de su propio promotor (Kojic y Venturi, 2002). Sin embargo, en *A. vinelandii* *psrA* no presenta una secuencia consenso de unión para sí misma, por lo tanto era probable que no existiera dicha regulación negativa. Por esto, decidimos analizar si en *A. vinelandii* PsrA escapaba de su propia autorregulación. Para validarlo cuantificamos la expresión relativa del transcrito de *psrA* en la cepa ATpsrA, esto a través de qPCR. Debido a que la mutación en *psrA* es una interrupción a mitad del gen, se diseñaron oligos que amplifican una región de 100 pb cerca del sitio de inicio de traducción y que están fuera del sitio de inserción del casete de *Sp^R-gusA*. De esta forma se puede cuantificar la expresión del transcrito aún en la mutante en el gen *psrA* (Fig. 30).

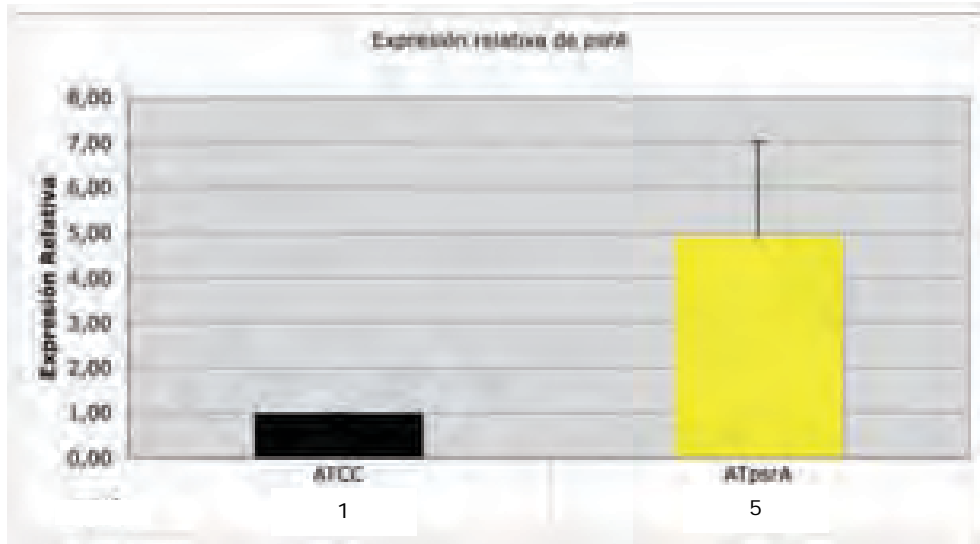


Fig. 30. Expresión relativa de *psrA* en la cepa silvestre (ATCC) y en la cepa AT*psrA*, nótese el incremento de hasta 5 veces con respecto a la cepa padre. Las barras representan la desviación estándar de tres repeticiones.

Como se muestra en la figura 31, la expresión relativa de *psrA* en una mutante en el mismo gen aumentó hasta 4 veces en comparación con la cepa silvestre. Este dato sugiere que existe una autorregulación negativa de PsrA y si fuera directa, tal y como sucede en *Pseudomonas*, entonces PsrA tendría que unirse a su propio promotor. Para comprobarlo, realizamos ensayos de pegado de la proteína con la región reguladora de sí misma. Se purificó la proteína PsrA-His y se realizó PCR radiactivo y no radiactivo para amplificar una región de 262 pb de bases que corresponde a la región reguladora de *psrA*. Además, se amplificó la región reguladora de *phbB*, que se usó como control negativo, tanto frío como caliente. Las bandas de cada fragmento se purificarón y se cuantificó el DNA y la proteína.

Posteriormente se realizaron los ensayos tipo EMSA. Para ello se tomaron 25 ng de DNA purificado de *psrA* radiactivo (0.16 pmol) y varias cantidades de la proteína purificada PsrA-His (de 0.25 a 3 μ M) y se usó como control negativo la región reguladora de *phbB* (Fig. 31).

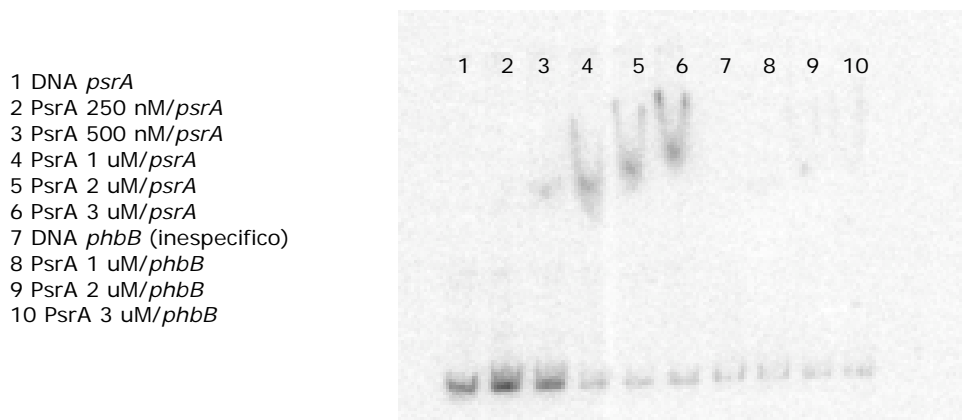


Fig. 31. Ensayo tipo EMSA que muestra la interacción de PsrA con su propia región reguladora (carril 2 – 6) mientras que no hay cambio de movilidad con el DNA inespecifico (carril 7 – 10).

Como se puede observar en la figura 31, PsrA es capaz de unirse a su propia región reguladora de forma directa. El cambio de movilidad se da desde 1 uM y es evidente a 3 uM, además de que no hay interacción entre la proteína y la región líder de *phbB* a cualquier concentración. Finalmente, para demostrar que esta interacción es específica, se realizaron ensayos de competencia de la región líder de *psrA* frío con caliente además de competencias de *psrA* caliente con un DNA frío inespecífico (*phbB*). La imagen 32 muestra que a mayores concentraciones de *psrA* frío éste se une a PsrA por lo tanto el retardo deja de ser visible, no así cuando se pone a competir con DNA frío inespecífico en el cual aún a concentraciones altas no hay cambio de movilidad.

- 1 DNA *psrA*
- 2 PsrA 2 uM/*psrA*
- 3 PsrA 3 uM/*psrA*
- 4 PsrA 3 uM/*psrA*/*psrA* frío 15 veces
- 5 PsrA 3 uM/*psrA*/*psrA* frío 30 veces
- 6 PsrA 3 uM/*psrA*/*psrA* frío 60 veces
- 7 -
- 8 PsrA 3 uM /*psrA*/*phbB* (competencia inespecífico frío) 30 veces.

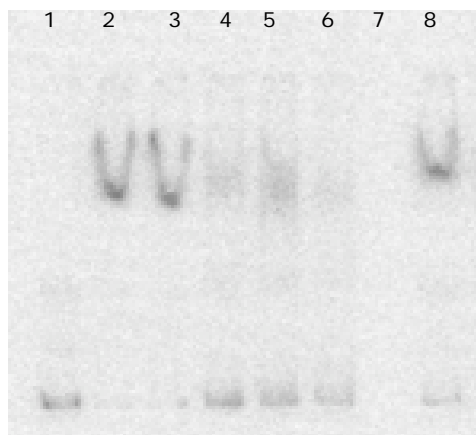


Fig. 32. Ensayos de competencia entre *psrA* caliente con *psrA* frío al interactuar con PsrA (carril 4-6), y de *psrA* caliente con DNA frío inespecífico (*phbB*) (carril 8).

Finalmente, se realizó un ensayo de extensión del iniciador con el objetivo de ubicar el sitio de inicio de la transcripción y proponer alguna posible secuencia a la que pueda unirse PsrA (Fig. 33).

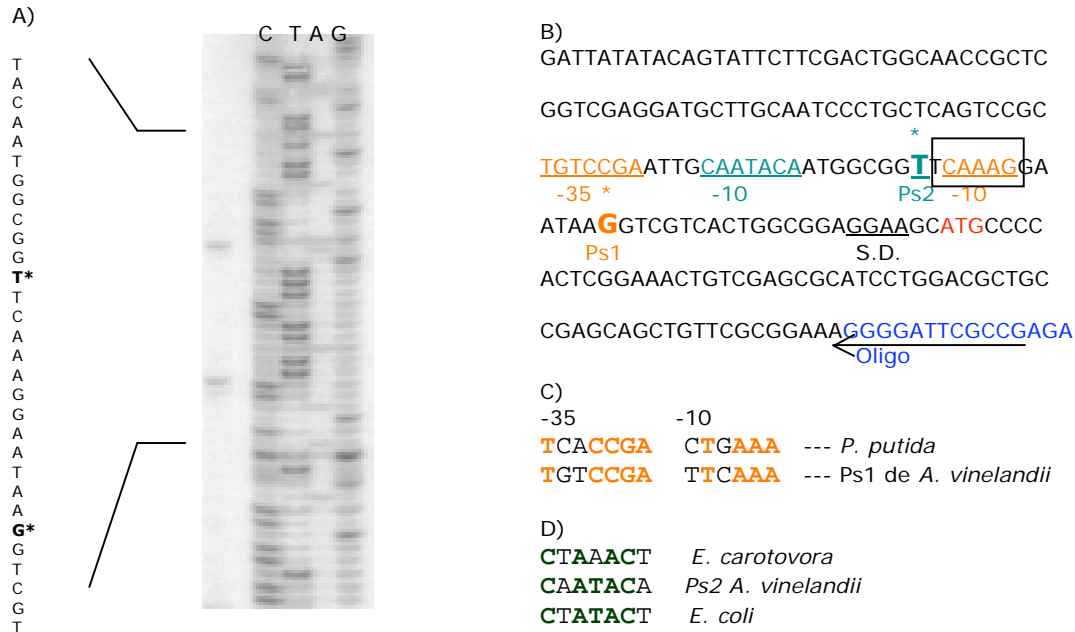


Fig. 33. A) Extensión del iniciador de *psrA* en el cual muestra dos posibles inicios de la transcripción; B) secuencia nucleotídica de *psrA*, los asteriscos muestran los sitios de inicio de la transcripción y subrayados sus posibles secuencias -10 y -35, en el cuadro se muestra el posible sitio de unión de PsrA; C) alineamiento de las cajas -10 y -35 del promotor 1 de *A. vinelandii* con el promotor de *psrA* de *P. putida*; D) alineamiento de la caja -10 de *E. carotovora* y *E. coli* con el promotor 2 de *A. vinelandii* que es reconocida por el factor sigma S

En la figura 33 se pueden observar dos posibles sitios de inicio de la transcripción de *psrA*. El primero, llamado Ps1, se ubica 21 pb río arriba del codón de inicio y sus posibles secuencias -10 y -35 tienen una considerable similitud con las ya reportadas para *psrA* de *P. putida*, difiriendo en sólo dos bases en cada caja. El promotor 2, llamado Ps2, se ubica 35 pb río arriba del codón de inicio y está sobrepuesto a la caja -10 de P1; su secuencia -10 está definida y no hay una posible secuencia -35. Estas características son típicas de promotores dependientes de sigma S y, como se puede apreciar en la figura, dicha caja sólo difiere en dos bases para las secuencias -10 dependientes de *rpoS* ya reportadas para *E. coli* y *E. carotovora*.

Finalmente, la secuencia CAAAG, que forma parte de la secuencia -10 de Ps1, pudiera ser un posible sitio de unión para PsrA. Sin embargo, no hay ninguna secuencia que represente el segundo sitio de unión para la proteína.

9. DISCUSIÓN

En *P. putida* y *P. aeruginosa* la proteína PsrA tiene un papel fundamental en controlar positivamente la expresión de *rpoS*, un factor sigma cuya función es regular la expresión de genes u operones que están involucrados en virulencia y colonización además de la sobrevivencia al estrés (Venturi, 2003). En *A. vinelandii* *rpoS* es un gen clave que, junto con el sistema Rsm, controla la síntesis de los polímeros que produce esta bacteria: alginato, PHB y alquilresorcinoles (Manzo *et al.*, sometido; Hernandez-Eligio, 2009; Romero-Ramirez, 2008). Además, por experimentos previos se tienen datos que el sistema de doble componente GacS/GacA controla a *rpoS* de forma positiva; sin embargo, se desconoce si lo hace de manera directa o indirecta (Castañeda *et al.*, 2001). Debido a la cercanía filogenética que presenta *A. vinelandii* con *Pseudomonas* se tomó como patrón de comparación la secuencia de *psrA* de *P. putida* para buscar en el genoma de *A. vinelandii* un homólogo. Así se encontró una secuencia que presenta un 73% de identidad y cuyo producto genera una proteína con características similares a PsrA de *Pseudomonas*. Este trabajo se enfocó en estudiar la posible relación que podía presentar PsrA con *rpoS*, su papel en la producción de los polímeros producidos por la bacteria y su relación con el sistema Gac y/o Rsm.

Se sabe que mutaciones en genes clave para la bacteria provoca un cambio en el crecimiento celular. Al evaluar este fenotipo de la mutante en *psrA*, se pudo comprobar que no está afectada en su crecimiento, así como tampoco lo está la mutante en *rpoS*, cuyos patrones son similares a los de la cepa parental. Sin embargo, la cepa que porta la mutación en el regulador global GacA tiene un crecimiento mayor a la cepa silvestre, ya que mientras la cepa parental deja de crecer a las 30 horas, la mutante en *gacA* sigue aumentando su biomasa. En *A. vinelandii* se ha reportado que mutantes en el sistema Gac están afectadas en la producción de alginato, PHB y alquilresorcinoles (Castañeda *et al.*, 2001; Romero-Ramirez, 2008). Es probable que el aumento en el crecimiento pueda deberse a que al no dirigir el metabolismo a la síntesis de estos polímeros y otros metabolitos secundarios, lo canalizaría para la producción de biomasa; esto concuerda con lo reportado en la literatura referente a que las mutantes en el sistema Gac crecen bien y de hecho pueden tener una ventaja temporal con respecto a la cepa silvestre (Bull *et al.*, 2001).

Al cuantificar la producción de alginato, se obtuvieron datos semejantes a los reportados previamente, donde la mutante en *gacA* tiene disminuido considerablemente la síntesis de este polímero. Además, las mutaciones en el sistema Rsm muestran un fenotipo con tendencia a lo ya reportado. La mutante en *rsmA*, la proteína represora del sistema, tiene un aumento de producción en comparación con la cepa silvestre, mientras que la mutación en el RNA no codificante, *rsmB*, tiene una producción menor a la cepa parental. Debido a que GacA regula positivamente a *rsmB* y éste a su vez la síntesis de alginato de manera positiva (Manzo *et al.*, sometido), se esperaba que dicha mutación en el RNA no codificante tuviera un fenotipo parecido a la mutante *gacA*. Sin embargo no fue así; esto puede deberse a que por una parte, GacA estaría activando a *rpoS* el cual activaría al promotor p1 del gen *algD* y transcribiría al operón implicado en la síntesis del polímero. La otra opción es que en *A. vinelandii* se ha encontrado más de un RNA homólogo a *rsmB*, de los cuales uno, *rsmC*, ha sido caracterizado y se ha demostrado que tiene una función parecida a *rsmB* regulando la síntesis de los polímeros de la bacteria (Solís-Conde, 2006). Así pues, en ausencia de *rsmB*, *rsmC* es suficiente para seguir sintetizando el polímero y no abatirlo como la mutante en GacA.

Como anteriormente se describió, el gen *algD* es transcrito a partir de tres promotores: p1 el cual es dependiente de sigma S, p2 dependiente de sigma E y p3. Por ello, en una mutante en *rpoS* se esperaría que la cantidad de alginato disminuyera o que al menos se mantuviera como en la cepa silvestre, pero los datos obtenidos muestran que no fue así, ya que la mutante aumentó casi 3 veces más la producción de alginato con respecto a la cepa parental. Esto puede ser explicado debido a que, por datos obtenidos en nuestro laboratorio, el promotor p2 dependiente de sigma E del gen *algD* aumenta considerablemente su expresión en la mutante en el gen *rpoS* (Castañeda *et al.*, 2001), lo que podría provocar una desregulación del control de la síntesis del polímero. Cabe mencionar que en una mutante *rpoS* en *Pseudomonas* spp., varios genes de virulencia que son controlados por dicho factor aumentan significativamente (Ge *et al.*, 2006). La otra explicación, como se discutirá más adelante, es que el transcrito proveniente de *algD* es más estable por una disminución de RsmA en la mutante *rpoS*. La mutante en *psrA* presentó una producción de alginato similar a la cepa silvestre y menor que la mutante en el factor sigma S, indicando que el control de *rpoS* por *PsrA* en *A. vinelandii* es diferente al que se da en especies de *Pseudomonas*.

La cuantificación de PHB mostró un fenotipo con tendencias parecidas a las del alginato. El hallazgo de que la mutante en *rpoS* también tiene una producción de PHB superior a la cepa silvestre es explicado, inicialmente, por el hecho de que el operón que transcribe a los genes de PHB tiene dos promotores, siendo pB2 dependiente de sigma S, aunque es el promotor pB1, dependiente de *PhbR*, el que tiene el papel fundamental en la transcripción de estos genes (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Por lo tanto, es posible que al igual que como sucede en alginatos, exista una desregulación en la síntesis de este polímero al estar mutado *rpoS* dando el fenotipo obtenido. Por otra parte, la mutante en *psrA* mostró una producción similar a su cepa parental y menor que en la mutante en *rpoS*. Finalmente, la producción de los AR's en las cepas mutadas en los genes *gacA* y *rpoS* se abate completamente, ya que no se detectó presencia de estos lípidos fenólicos, a diferencia de la mutante en el gen *psrA* donde sí hubo producción de éstos aunque en niveles por debajo de la cepa parental. En conjunto, los fenotipos parciales de la mutante en *psrA* nos sugiere que la regulación que *PsrA* ejerce sobre *rpoS* puede no ser tan fuerte como lo es en *Pseudomonas*, o que incluso puede no existir tal interacción.

La cuantificación del transcrito de *rpoS* por qPCR en la mutante en *psrA* mostró una reducción de un 60% con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, esto difiere con *P. putida* y *P. aeruginosa* donde hay una disminución del 90% de la actividad del promotor en la mutante en el gen *psrA* (Kojic y Venturi, 2001). Este dato explica los fenotipos parciales que se obtuvieron en la producción de los polímeros en la cepa AT*psrA*, ya que a pesar de reducir un 60% su transcripción *RpoS* es capaz de mantener un fenotipo cercano a la cepa parental. Es posible que en *A. vinelandii* la regulación de la expresión de *rpoS* sea completada con la regulación que se ejerce a nivel traduccional y post-traduccional, cómo sucede en *E. coli* (Hengge-Aronis, R., 2002) o que *GacA* active la expresión independientemente de *PsrA*. Los ensayos tipo EMSA validaron la hipótesis de que *PsrA* es capaz de unirse a la región reguladora de *rpoS*, por lo tanto esta regulación es de manera directa y específica, pues no hubo interacción de la proteína con la región líder de *phbB*. Sin embargo, el ensayo de extensión del iniciador de *rpoS* ubicó a las secuencias hipotéticas de unión a *PsrA* 335 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción y las cajas -10 y -35 no mostraron ser dependientes de *RpoD* tal y como es reportado en *E. coli* (Lange *et al.*, 1995). En *E. coli*, *rpoS* tiene 2 sitios de inicio de la transcripción para fase estacionaria, uno de los cuales es más fuerte que el otro y se encuentra dentro de la región codificante del

gen adyacente a *rpoS*, *nlpD*. Es posible que, al igual que *E. coli*, *A. vinelandii* tenga dos promotores para controlar la expresión de este factor sigma pudiendo ubicarse el promotor fuerte en una región más cercana a las secuencias de pegado de PsrA y que en los ensayos realizados en este trabajo sólo se pudo ubicar el promotor débil. De hecho, en la cepa UW de *A. vinelandii* se han encontrado dos promotores para *rpoS* (Sampieri-Hernandez., 2004) uno de los cuales está ubicado a tres bases río arriba del reportado aquí y uno más que se ubica 48 pb río abajo de las cajas de unión a PsrA. De otro modo, si *rpoS* en esta cepa en particular sólo tuviera un promotor, entonces las cajas de unión a PsrA se encontrarían bastante alejadas a lo que se reporta, pudiendo activar la transcripción pero no tan eficientemente como en *Pseudomonas*.

Chatterjee y cols. (2007) propusieron que en *Pseudomonas*, PsrA ejerce un control negativo en la expresión de la proteína represora del sistema Rsm, RsmA, ya que el transcrito de *rsmA* en una mutante *psrA*, visualizada por un Northern, aumenta considerablemente cuando se compara con la cepa silvestre. Por ello se evaluó la expresión relativa de *rsmA* en la mutante en *psrA*. Los resultados obtenidos parecen indicar que no es así, sin embargo experimentos alternos, como una fusión transcripcional de *rsmA* podría ayudar a determinarlo. Por otra parte, las similitudes de los fenotipos de las mutantes en los genes *rpoS* y *rsmA* nos condujo a buscar una posible interacción entre ambas. Mukherjee (1998) reportó que en *E. carotovora* *rsmA* es dependiente de RpoS, ya que a través de un Northern observó que la expresión de *rsmA* en una mutante *rpoS* se reduce considerablemente. En este trabajo los ensayos de qPCR mostraron que la expresión relativa de *rsmA* en una mutante *rpoS* disminuye alrededor de un 75%; esto nos indicaba que RsmA es dependiente de sigma S. Sin embargo, la pregunta que surgió es si esta relación se da de manera directa o no, así que buscamos un posible promotor de *rsmA* que fuera dependiente de RpoS. El ensayo de extensión del iniciador ubicó un consenso para la caja -10 pero no para la -35; estas características son típicas de los promotores dependientes de RpoS. Finalmente, al realizar el ensayo de extensión del iniciador de *rsmA* en la mutante en *rpoS* y en la cepa silvestre se pudo confirmar que la proteína represora del sistema Rsm tiene un promotor dependiente de sigma S, puesto que la señal del inicio no se detecta cuando está mutado RpoS. Así, esta dependencia de *rsmA* a través de RpoS explica los fenotipos de alginato y PHB en la mutante en *rpoS*, de modo que al no estar RpoS no hay quien active a *rsmA* y esto es un factor para aumentar la producción de los polímeros ya que se ha demostrado que RsmA actúa como un regulador negativo en la síntesis de alginato y PHB ya que su sobre expresión reduce dramáticamente su síntesis (Cocotl-Yáñez, 2006). Además, se ha encontrado que RsmA se une directamente al RNA mensajero de *algD* evitando su traducción (Manzo *et al.*, sometido), así como también se une a los mensajeros de *phbR* y *phbB* implicados en la síntesis de PHB (Hernández-Eligio, 2009). En los experimentos de qPCR también se evidenció que en la mutante *rpoS* aún se detecta transcrito de *rsmA*, lo que puede deberse a que *rsmA* sea activado por RpoD, ya que se ha observado que en *E. coli* genes dependientes de sigma S pueden ser también activados por sigma 70 (Tanaka *et al.*, 1993). Por otra parte, en los experimentos de qPCR podía esperarse que la expresión relativa de *rsmA* en la mutante en *psrA* bajara, puesto que PsrA activa a *rpoS* y éste a *rsmA*; sin embargo, debido a que esta dependencia es parcial, pudiera no verse reflejado en la expresión de *rsmA*.

Por datos reportados (Castañeda *et al.*, 2001), se sabe que GacA regula positivamente a *rpoS*, sin embargo, se desconoce si lo hace de forma directa o no; por los datos obtenidos al medir el transcrito de *psrA* en la mutante *gacA* se hipotetizó que la regulación que ejerce GacA sobre *rpoS* tendría como intermediario a PsrA, ya que la mutante en el regulador global redujo casi un 40% los niveles del transcrito de *psrA*, lo

cual reduciría los niveles de *rpoS*. Con respecto a esto, Chin-A-Woeng *et al.* (2005) reportó que en *P. chlororaphis* PCL1392 una mutación en *gacS*, la proteína sensora del sistema, reducía considerablemente la expresión de *psrA*. En base a esto tratamos de buscar si la regulación en *A. vinelandii*, si es que existe, es de forma directa. Sin embargo, intentos por visualizar el posible pegado de GacA sobre la región reguladora de *psrA* no fueron fructíferos, pudiendo deberse a un problema con la proteína. Debido a que GacA es un regulador global, no se descarta que la reducción del transcrito sea sólo un efecto pleiotrópico; es decir, que pudiera haber genes afectados por GacA que tengan alguna participación en regular la expresión de *psrA*. De otro modo, si existiera dicha regulación, podría no ser directo ya que se ha documentado que GacA ejerce su control a través del sistema Rsm (Lapouge *et al.*, 2008). Los resultados de qPCR también mostraron una disminución del transcrito de *psrA* en la mutante en *rsmA*. En caso de que RsmA regule a *psrA* de manera positiva podría ser de dos maneras: la primera; que RsmA se una al RNA mensajero de *psrA* y lo estabilice, tal y como lo hace con *flhDC* (Wei *et al.*, 2001). De esta forma, en la mutante *rsmA*, al no estabilizar el RNAm disminuye su concentración. Por otro lado, debido a que sólo en un caso se ha demostrado la regulación positiva de RsmA sobre su gen blanco y que PsrA no presenta secuencias de unión a RsmA en el SD, es posible que en *A. vinelandii* RsmA regule la concentración del RNAm de *psrA* de forma indirecta, probablemente regulando negativamente a un represor de la transcripción de *psrA*. Así, al no estar RsmA, el represor se encuentra libre para reprimir la expresión de *psrA*.

En *A. vinelandii* el gen *psrA* carece de las cajas palindrómicas a las que se une para autorregularse negativamente; sin embargo, los ensayos de qPCR mostrarán un elevado aumento de hasta 4 veces más en el transcrito en el fondo de la mutante *psrA*. Los ensayos tipo EMSA confirmaron que efectivamente PsrA se une a su propia región promotora, tal y como sucede en *Pseudomonas*, regulando negativamente su expresión y que esta interacción es específica. En la búsqueda por ubicar alguna secuencia que pudiera ser reconocida por PsrA realizamos el ensayo de extensión del iniciador de *psrA*. Los resultados detectaron dos sitios de inicio de la transcripción: Ps1 y Ps2. Ps1 tiene una secuencia -10 y -35 muy parecida a las reportadas para las especies de *Pseudomonas* y en la caja -10 existe una secuencia potencial para ser reconocida por PsrA. Dicha secuencia no es palindrómica pero difiere sólo en una base a la secuencia reconocida por PsrA en *P. putida* que también se encuentra sobrepuesto a la caja -10 de su promotor. Sin embargo, no existe una segunda secuencia que pudiera representar la segunda caja reconocida por PsrA. En un trabajo realizado por Kang y cols. (2008), documentaron el pegado de PsrA a la región promotora del operón *fadBA5* teniendo solo una caja palindrómica ubicada 7 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción. Por ello, es posible que en *A. vinelandii* PsrA pueda reconocer la primera caja en su propio promotor, unirse y de esta forma impedir la unión de la RNAPol. El segundo promotor, Ps2, tiene características de ser un promotor dependiente de RpoS y el sitio de inicio de la transcripción se sobrepone con la caja -10 de Ps1. Este dato sugiere una regulación bidireccional entre PsrA y RpoS. Sin embargo, cuando se mide el transcrito de PsrA en la mutante en RpoS, sólo se puede detectar una disminución de un 10% con respecto a la cepa silvestre, lo que nos indica que es probable que Ps1 sea el promotor principal de PsrA. Además, es posible que al estar sobrepuesto Ps2 a la caja -10 de Ps1 haya un impedimento para la transcripción dependiente de RpoS.

10. CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permitió conocer el papel de PsaA en la regulación de RpoS y su papel en la producción de alginato, PHB y AR's producidos por *A. vineandii*. Además, encontramos la relación entre RpoS y RsmA, lo que nos permitió proponer una explicación del fenotipo de sobreproducción de alginato y PHB en la mutante en sigma S. Las conclusiones principales a las que se llega son:

1. La mutante en *psrA* no está afectada en el crecimiento celular.
2. PsaA regula parcialmente la síntesis de alginato, PHB y alquilresorcinoles.
3. PsaA regula directamente la transcripción de *rpoS* uniéndose a su región reguladora.
4. RsmA, así como GacA, tienen efectos positivos en la expresión de *psrA*.
5. RpoS regula positivamente la expresión de *rsmA*, ya que éste tiene un promotor sigma S dependiente.
6. PsaA regula de forma negativa su propia expresión, uniéndose a su región reguladora y sin tener las cajas consenso.
7. PsaA inicia su transcripción a partir de dos promotores, los cuales están sobrepuestos.

Finalmente, con los datos obtenidos en este trabajo, proponemos el siguiente modelo de regulación (Fig. 34), en el cual PsaA forma parte de los reguladores que participan en el control de la síntesis de los polímeros:

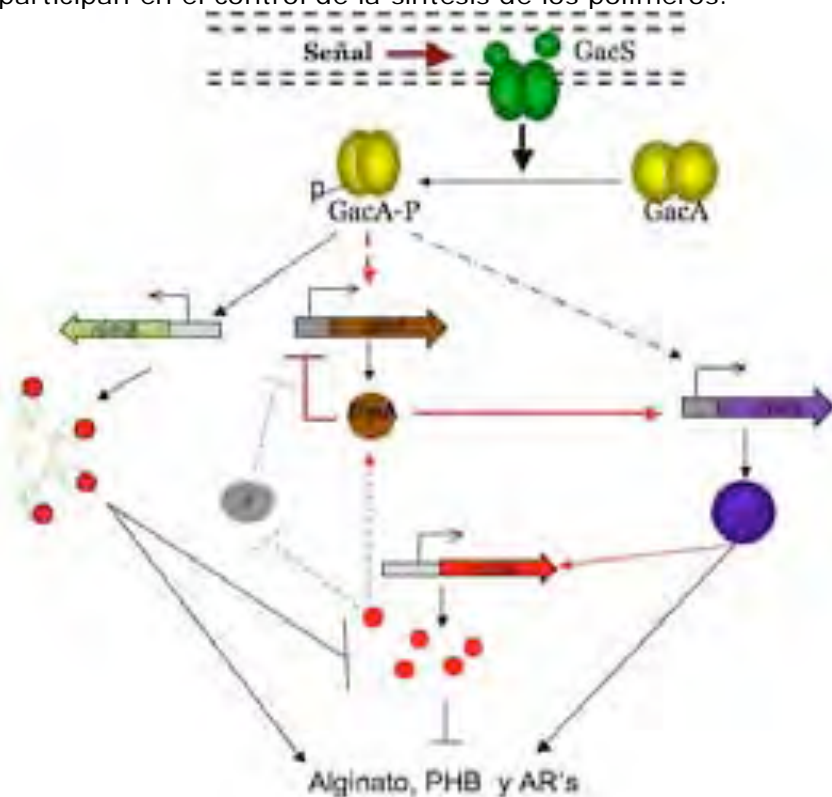


Fig. 34. Modelo de regulación que implica a PsaA y su relación con el sistema Gac, Rsm y RpoS implicados en la síntesis de alginato, PHB y alquilresorcinoles. Las flechas continuas indican regulación directa, las flechas punteadas regulación hipotética y líneas con barras regulación negativa.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar si GacA regula de manera positiva la expresión de *psrA*.
- Determinar la relación entre RsmA y *psrA*.
- Determinar cómo regula GacA la expresión de *rpoS*.
- Utilizando las secuencias de unión a PsrA, buscar en el genoma de *A. vinelandii* posibles blancos de regulación de dicha proteína.
- Determinar un posible segundo inicio de la transcripción de *rpoS* en la cepa ATCC 9046.

12. BIBLIOGRAFIA

- Anderson, A. J., and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54: 450-472.
- Barry, T., Geary, S., Hannify, S., MacGearait, C., Shallo, M., Heery, D., Gannon, F., and Powell, R. 1992. Rapad mini-preparation of total RNA from bacteria. *Nucleic Acid. Res.* 20: 4940.
- Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484 – 489.
- Bull C., Duffy B., Voisard C., Défago G., Keel C. and Haas D. 2001. Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO. *Antonie van Leeuwenhoek.* 79: 327 – 336.
- Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Nuñez, G. Espín, and G. Soberón-Chávez. 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín., G. 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., and Espín, G. 2001. The global regulators GacA and sigma S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787-6793.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H., and Chatterjee K. 2007. PsaA, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulator of epiphytic fitness, quorum-sensing signals and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. Tomato strain DC3000. *Applied and environmental microbiology.* 73: 3684 – 3694.
- Chin-A-Woeng, TF., Van den Broek, D., Lugtenberg, BJ., and Bloemberg, GV. 2005. *The Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 sigma regulator *psrA* represses the production of the antifungal metabolite phenazine-1-carboxamide. *Mol. Plant Microbe Interact.* Mar;18(3):244-53.
- Clementi F. 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*; *Crit.Rev.Biotech.*; 17: 327-361.
- Cocotl-Yañez, M., 2006. Caracterización del gen *rsmA* involucrado en la síntesis de alginato y PHB en *A. vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Biomedicina, Facultad de Medicina. BUAP.
- van Delden, C., comte, R., and Bally, A.M. 2001. Stringen response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183: 5376 – 5384.
- Fyfe, J. A. M. and J. R. W. Govan. 1983. Synthesis regulation and biological function of bacterial alginate. In: *Progress in Industrial Microbiol.* Vol. 18 pp. 45-83.
- Gacesa P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis recent progress and future prospects. *Microbiology*; 144: 1133-1143.
- Ge Y., Yang S., Fang Y., Yang R., Mou D., Cui J. and Wen L. 2007. RpoS as an intermediate in RsmA-dependent regulation of secondary antifungal metabolites biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiology Letters.* 268: .1574-6968
- Gooderham, W., Bains, M., McPhee, J., Wiegand, I., and Hancock, W. 2008. Induction by cationic antimicrobial peptides and involvement in intrinsic polymyxin and antimicrobial peptide resistance, biofilm formation, and swarming motility of PsaA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 190 (16): 5624 - 5634.

- Goodier R. I., and B. M. Ahmer. 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol.* 183:2249-58
- Haug A. and Larsen B. 1971. Biosynthesis of alginate: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*; *Carbohydrate Res.*; 17: 287-296.
- Heeb S, 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
- Heeb S., Valverde C., Bonnefoy-Gigot C. and Haas D. 2005. Role of the stress factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *FEMS Microbiology Letters.* 243: 251-258.
- Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 373–395
- Hernández-Eligio, A., 2009. Estudio de la regulación transcripcional del operón *phbBAC* y del gen *phbR* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado en proceso. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hirsch, M., and Elliott, T. 2002. Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 5077 – 5087.
- Kang, Y., Nguyen, DT., Son, MS., and Hoang, TT. 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* beta-oxidation operon. *Microbiology.* 154:158-98.
- Kojic, M. and Venturi, V. 2001. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J Bacteriol* 183: 3712 – 3720.
- Kojic, M., Aguilar, C., and Venturi, V. 2002. TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J Bacteriol* 184: 2324 – 2330.
- Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F., Venturi, V. 2005. Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 246: 175 – 181.
- Kozubek A., and Tyman J., 1999 Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem. Rev.*; 99: 1 – 26.
- Lafferty, R. M., B. Korsatko, and W. Korsatko. 1990. Microbial production of Poly-β-hydroxybutiric acid. Rehm H. J., G. Reed (Eds.) *Biotechnology.*
- Lange R., Fischer D. and Hengge-Aronis R. 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4676 – 4680.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. 1994. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Genes Dev.* 8: 1600 – 1612.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F., and Haas, D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology.* 67: 241 - 253.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR

(VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol.* 21: 1137 – 1146.

Law, J., and Slepcky, A. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82: 33 – 36.

Lin, L. P. and H. A. Sadoff, 1969. Chemical composition of *Azotobacter vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* 100: 480-486.

Lloret L., R. Barreto, R. Leon, S. Moreno, J. Martinez-Salazar, G. Espin, G. Soberón-Chavez. 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters; *Molecular Microbiology*; 21: 449-457.

Lowry O. H., Rosenbrough A. L., Farr A. L. and Randall R. L. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *Jornal of Biol. Chem.* 193: 265-275.

Manchak J., W. J. Page. 1994. Control of poly hydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology.* 149: 953-963.

Manzo J., Cocotl M., Sanchez E., Velazquez C., Montes L. A., Goiz Y., Carreño R., Fuentes L/E., Nunez C., Segura D., Espín G., Castaneda M. The GacS/A-RsmA/B signal transduction pathway, involved in alginate production, controls the *algD* gene expression in *Azotobacter vinelandii*. Sometido.

Martínez Salazar, J., S. Moreno, R. Najera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chavez and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucO in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178: 1800 – 1808.

Moreno, S., J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1998. Role of the alternative sigma factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180:2766-2769.

Mukherjee A., Cui Y., Ma W., Liu Y., Ishihama A., Eisenstark A. and Chatterjee K. 1998. RpoS (Sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. *Journal of bacteriology.* 180: 3629 – 3634.

Mukhopadhyay, S., Audia, J.P., roy, R.N. and Schellhorn, H.E. 2000. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is independent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol Microbiol.* 37: 371 – 381.

Nagpal, P., S. Jafri, M. A., Reddy, and H. K. Das. 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 171:3133-3138.

Nobutaka F, Hiroki O, Aiko H and Suehara H. 2006. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 6356-6361.

Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K., and Espín, G. 2008. Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 15:244-254.

Núñez, C., Moreno, S., Soberon-Chávez, G., and Espín, G. 1999. The *Azotobacter vinelandii* Response Regulator AlgR is Essential for Cyst Formation. *J. Bacteriol.* 181:141-148.

Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L. 2002. Transcriptional analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 225 – 231.

Parkinson J.S., Kofoid E.C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins: Annual Rev: Gene. 26; 71-112.

Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán J., Servín-González, L. y Espín, G. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hidroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. J. Bacteriol. 184:5672-5677.

Ramos, J., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M., Brennan, R. and Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol mol. 69: 326 – 356.

Reusch, R. N. and Sadoff H L. 1981. Lipid Metabolism During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 145: 889-895.

Reyes-Valencia, L. 2009. Estudio de la regulación genética de la producción del sideróforo azotobactina en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. CICM-BUAP.

Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol Microbiol. 29:1321-1330

Romero-Ramirez, Y. 2008. Regulación de la expresión genética de *arsA* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-85.

Sadoff H.L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*; Bacteriology Rev.; 39: 519-539.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Sampieri-Hernández, A. 2004. Los reguladores globales GacA y RpoS en *Azotobacter vinelandii*. Resultados de proyecto. Instituto de Biotecnología. UNAM

Sandercock, J. And Page W. 2008. RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. J. Bacteriol. 190: 946-53.

Segura, D., Cruz, T. and Espin, G. 2003. Encystment and alkylresorcinols production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hidroxybutyrate synthesis. Arch Microbiol. 179: 437-443.

Segura, D. Vite, O. Romero, Y. Moreno, S. Castañeda, M. Espin, G. 2009. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol síntesis: Alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. J Bacterial. 191: 3142-3148.

Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. Richie, and E. A. Dawes. 1972. The role of oxigen limitation in the formation of poly- β -hidroxybutyrate during batch and continous culture of *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 128:1193-1201.

Shen, D., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B. and Toussaint, B. 2006. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity. 74: 1121 – 1129.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. PNAS. 94: 11210 – 11215.

Solis-Conde, Y. 2006. Caracterización del Regulador Post-transcripcional *rsmC* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Microbiología. Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Steinbüchel, A., and H. E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalcanoic acids. FEMS Microbiol. Lett. 128: 219-228.

Stock J., Surette, M.G., Levit, M. and Park, P. 1995. "Two-Component Signal Transduction Systems: Structure-Function Relationships and Mechanisms of Catalysis." Two-component signal transduction, eds. Hoch and Silhavy, T.J. (ASM, Washington D.C.) pp 25-51.

Suzuki, K., Wang, X., T. Weilbacher, A.K. Pernesting, Ö. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 184:5130-5140.

Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., Takahashi, H. 1993. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. PNAS. 90:8303.

Ueguchi, C., Misonou, N., and Mizuno, T. 2001. Negative control of *rpoS* expression by phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183: 2265 – 2272.

Vázquez, A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado and G. Espín. 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. Gene. 232: 217-219.

Venturi V. 2003. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different?. Molecular Microbiology. 49 : 1 – 9.

Wei B., Brun-Zinkernagel A., Simecka J., Prüb B., Babitzke P. And Romeo T. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 40: 245 – 256.

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.