



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Biotecnología

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Departamento de Microbiología Molecular

**Caracterización del gen *hexR1* como posible
regulador de la vía Entner-Doudoroff y su papel
en la síntesis de alginato en *Azotobacter
vinelandii***

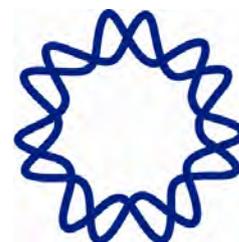
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Claudia Velázquez Sánchez

Director de Tesis:
Cinthia E. Núñez López



OCTUBRE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 realizó en el Departamento de Microbiología
Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la
dirección de la Dra. Cinthia E. Núñez López.*

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

- Dios: que desde algún lugar me protege y me guía. La razón de mi vivir.
- A mi Rocksi: una meta más cumplida. El camino estuvo lleno de dificultades, dudas, tristezas y hasta lágrimas, pero, aunque físicamente lejos, todo el tiempo estuviste conmigo y no tengo palabras para agradecerte todo tu apoyo; lo único que puedo hacer es dedicarte este pequeño trabajo, pues se que, sin ti, hubiera sido casi imposible de lograr. Ojalá estés la mitad de orgullosa de mí, de lo que yo te amo.
- A mi Pacito, Mijo y Lero: los rocksitos somos todos, y mi corazón no estaría completo sin ustedes, los amo. Estar lejos fue difícil para mí, pero el solo hecho de saber que estaban siempre conmigo era un gran alivio. Gracias.
- A mi familia: en especial, con mucho cariño y respeto, a la memoria de mi abuela, Alicia Sánchez, pues gracias a ella tengo mi propio ángel en tierra.
- A la Dra. Cinthia: gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted y de brindarme su apoyo, dentro y fuera del Instituto, por las enseñanzas y por su tiempo.
- Al Dr. Alfredo Martínez y al Dr. Víctor Bustamante: fui muy afortunada de tenerlos como parte de mi comité tutorial; no hay duda de que todos sus consejos y sus observaciones hicieron de éste, un mejor proyecto.
- Al comité revisor de tesis: muchas gracias por su paciencia y por el tiempo que invirtieron en la revisión de éste documento, que, sin duda, contribuyó a realizar un trabajo de mejor calidad.
- Al Dr. Miguel Castañeda: gracias a usted fue que comencé esta nueva etapa de mi vida profesional y personal. Es una de las personas que más admiro y respeto por toda su sabiduría y su inagotable paciencia.
- A todos mis amigos:
 - Monse: sin duda alguna, me cambiaste la vida con tu llegada y en verdad, no sabes como agradezco que hayamos vivido juntas estos dos años. Te quiero mucho Mon.
 - Ada: que me has escuchado tantas veces y aún así no te cansas de recetarte mis traumas psicológicos. Te quiero mucho nenita.

- Elva y Luis: la familia completa. Gracias por todo su apoyo y por compartir conmigo su tiempo y su amistad. En especial, gracias Elva por abrirme las puertas de tu casa.
- En Puebla: a Omar, Cocol, Poncho, David, los biomédicos y a todos esos nombres que no caben aquí, pero que en algún momento han sido y son parte de mi vida.
- A todos en el grupo Espín: gracias por ser, más que mis compañeros, mis amigos. A la Dra. Lupita por la oportunidad de trabajar en su grupo. A doña Sol: sin su ayuda, éste trabajo no hubiera podido culminarse, gracias por todos sus consejos y su paciencia. A los “alginatos”, en especial a Armando: eres un gran compañero y amigo, gracias por tu amistad. Miguel y Yanet: gracias por escucharme y ayudarme cuando las cosas se estancaban. Viri, Elva, Beto, Liber, Felipe, Miguel M, Deborah, Don Lalo, gracias a todos.

Y una vez más, gracias a las personas que creen en mí, y de igual forma a las que no creen: eso me impulsa a no detenerme.

ÍNDICE

- RESUMEN
- TABLA DE ABREVIATURAS
- 1. INTRODUCCIÓN
 - 1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*
 - 1.2 Ciclo de vida de *A. vinelandii*
 - 1.3 Metabolismo de carbono: la vía Entner-Doudoroff y el ciclo de las triosas-fosfato
 - 1.4 Alginato: composición y aplicaciones
 - 1.5 Biosíntesis del alginato por *A. vinelandii*
 - 1.6 Genética y regulación de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*
- 2. ANTECEDENTES
 - 2.1 La vía Entner-Doudoroff y su contribución a la síntesis de alginato en *A. vinelandii*
 - 2.2 Genética de la vía Entner-Doudoroff y el represor *hexR* en *Pseudomonas*
 - 2.3 En una mutante *hexR1::mTn5* de *A. vinelandii* se elevan los niveles de alginato
- 3. HIPÓTESIS
- 4. OBJETIVOS
- 5. MATERIAL Y MÉTODOS
 - 5.1 Material biológico
 - 5.2 Secuencias de oligonucleótidos
 - 5.3 Medios y condiciones de cultivo
 - 5.4 Manipulación de ácidos nucleicos

- 5.5 PCR
 - 5.6 Cuantificación de la expresión relativa - qPCR
 - 5.7 Construcción de los plásmidos pMOS*hexR1*, pCV02, pCV03 y pCV04
 - 5.8 Cuantificaciones de proteína y alginato
 - 5.9 Actividades enzimáticas
 - 5.10 Herramientas bioinformáticas
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- 6.1 Análisis *in silico* de la proteína HexR1 de *A. vinelandii*
 - 6.2 Identificación y análisis del *locus hexR1*
 - 6.3 Complementación génica de la mutante *hexR1::mTn5* (GG88)
 - 6.4 Cuantificación del crecimiento
 - 6.5 Cuantificación de alginato en diferentes fuentes de carbono
 - 6.6 Expresión de los genes de la vía Entner-Doudoroff
 - 6.7 Cuantificación de la actividad enzimática de Zwf
 - 6.8 Cuantificación de la actividad enzimática de Edd-Eda
 - 6.9 Expresión de los genes de la biosíntesis de alginato
 - 6.10 Búsqueda *in silico* de los blancos de regulación de HexR1
 - 6.11 Comentarios finales
7. CONCLUSIONES
8. PERSPECTIVAS
9. BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una gamma-Proteobacteria Gram negativa, capaz de producir el polisacárido extracelular alginato cuyo sustrato inicial es la fructosa 6-fosfato. El metabolismo de carbono en *A. vinelandii* se lleva a cabo vía Entner-Doudoroff (ED) como única vía glucolítica, la cual oxida azúcares de seis carbonos produciendo piruvato y gliceraldehído 3-fosfato. Éste último puede interconvertirse a dihidroxiacetona fosfato, para después condensarse por gluconeogénesis y convertirse en fructosa 6-fosfato. A pesar de conocerse la ruta biosintética por la cual *A. vinelandii* produce alginato, poco se sabe acerca de la genética molecular de la vía ED, mucho menos de su regulación. Previo a este trabajo, se creó una mutante que exhibe un incremento de dos veces en la producción de alginato; dicha mutante denominada GG88 (*hexR1::Tn5*), tiene interrumpido un gen ortólogo a *hexR* de *Pseudomonas putida*, el cual codifica para un represor de la familia RpiR que regula la expresión de genes de la vía ED. Debido al fenotipo de producción elevada de alginato, el objetivo de este trabajo se centró en la caracterización del regulador HexR1 y su papel en la vía ED, así como su relación con la síntesis de alginato en *A. vinelandii*. Después de analizar la secuencia del genoma de la cepa DJ de *A. vinelandii*, se identificó al gen *hexR1*, el cual se encuentra flanqueado por genes de la vía glucolítica, incluidos los genes de la vía ED. El operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* se localiza río arriba y se transcribe de manera divergente con respecto a *hexR1*, mientras que *edd2* se localiza río abajo y también se transcribe en dirección contraria a *hexR1*. Ambos, el operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* y el gen *edd2* son reprimidos por HexR1, tal como se comprobó mediante experimentos de qRT-PCR, realizados a partir del RNA de la cepa silvestre y la mutante GG88. Como era de esperarse esta represión fue mayor en presencia de succinato con respecto a glucosa como fuente de carbono. Por otro lado, la actividad enzimática de Zwf, la primera enzima de la vía ED, fue aproximadamente un 50 por ciento mayor en la mutante GG88. Sorpresivamente, no se observó un incremento en la actividad enzimática de Edd-Eda en dicha cepa. Nuestros resultados indican que en la mutante GG88 la transcripción de los genes estructurales para la biosíntesis de alginato *algD* y *algC* se elevó dos veces. Un análisis *in silico* para la búsqueda de posibles secuencias de unión de HexR1 en el genoma de *A. vinelandii* indica que este regulador sólo reconoce genes de la vía glucolítica ED como genes blanco. Colectivamente, estos resultados sugieren que el incremento en la síntesis de alginato en la cepa GG88 se debe a una desrepresión de la vía ED y no a una participación directa de HexR1 como regulador de los genes biosintéticos de alginato. Esto muestra la plasticidad de la regulación, tanto del metabolismo primario de carbono, como de la síntesis de alginato, en respuesta a diversas condiciones ambientales, tales como la presencia de distintas fuentes de carbono.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Amp: Ampicilina
- BLAST: Basic Local Alignment Tool (herramienta de alineamiento)
- cDNA: complementary DNA (DNA complementario)
- ED: Entner-Doudoroff
- Eda: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa
- Edd: 6-fosfogluconato deshidratasa
- EMP: Embden-Meyerhof-Parnas
- EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay (Ensayos de Retardo en la Movilidad Electroforética)
- FQ: Fibrosis Quística
- G: Ácido α -L-gulurónico
- Glk: Glucocinasa
- GFP: Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)
- Gm: Gentamicina
- HTH: Helix-Turn-Helix (Hélice-Vuelta-Hélice)
- Km: Kanamicina
- KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
- KHG: 2-ceto-hidroxiglutarato
- M: Ácido β -D-manurónico
- MAST: Motif Alignment and Search Tool
- Mb: Megabase
- MEME: Multiple Em for Motif Elicitation
- Nal: Ácido Nalidíxico
- NMR: Nuclear Magnetic Resonance (Resonancia Magnética Nuclear)
- pb: Pares de bases
- PCR: Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
- PDB: Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas)
- PHB: Poli- β -hidroxibutirato

- Pgi: Fosfoglucoosa isomerasa
- PTS: Phosphotransferase System (Sistema Fosfotransferasa)
- SIS: Sugar Isomerase (dominio de unión a azúcar fosfato)
- Sp: Espectinomicina
- TCA: Tricarboxylic Acid cycle (ciclo de los ácidos tricarboxílicos)
- Tpi: Triosa fosfato isomerasa
- Zwf: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una Proteobacteria de la subdivisión γ que pertenece a la familia Azotobacteriaceae. Son bacterias Gram negativas, pleomórficas (su morfología varía desde bacilos hasta cocos) de 2 a 5 μ de diámetro. Habitan en suelos, se mueven gracias a la presencia de flagelos peritricos. Poseen la habilidad de sufrir un proceso de diferenciación formando quistes metabólicamente inactivos resistentes a condiciones adversas (como altas temperaturas) (Sadoff, 1975).

A. vinelandii vive en condiciones aeróbicas, pero también puede hacerlo en ambientes con concentraciones bajas de oxígeno. Fija nitrógeno y requiere de molibdeno para la fijación, que puede ser parcialmente sustituido por vanadio. El pH adecuado para su crecimiento en presencia de nitrógeno es de 4.5 a 8.5; el pH óptimo para su crecimiento en condiciones diazotróficas es de 7.0 a 7.5 (Bergey *et al.*, 2001).

Esta bacteria no posee plásmidos endógenos, pero puede recibir DNA exógeno mediante transformación (con ciertos plásmidos de amplio rango de hospedero) o conjugación. Alcanza el estado de competencia al crecer en medio de cultivo sin hierro ni molibdeno. Su genoma tiene un tamaño de ~4.5 megabases (Mb) con un porcentaje de G+C que varía entre 64.9-66.5%, e incluye un origen de replicación de 200 pares de bases (pb); un fragmento más largo de 1652 (que incluye las 200 pb del origen) contiene 14 sitios putativos de unión a DnaA, diez sitios putativos de unión a IHF y 19 cajas GATC (sitios potenciales de unión a Dam metilasas); es pertinente mencionar que el genoma de la cepa DJ ya se encuentra secuenciado (<http://agro.vbi.vt.edu/servlets-examples/annotation-azoto.html>) (Setubal *et al.*, 2009). Comúnmente *A. vinelandii* posee múltiples copias de su genoma, pudiendo alcanzar hasta 80 copias por célula en fase de crecimiento exponencial tardía; en

fase estacionaria tardía la cantidad de DNA se reduce drásticamente, probablemente como una forma de prepararse para el proceso de enquistamiento (Bergey *et al.*, 2001).

A. vinelandii presenta características por las que es objeto de estudio, como el hecho de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno por tres complejos diferentes de nitrogenasa, o por poseer mecanismos poco usuales que protegen a este complejo de la inactivación por oxígeno. Otra característica interesante es la versatilidad de su metabolismo, pues es capaz de producir metabolitos secundarios de uso industrial: el poliéster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB) y el polisacárido extracelular alginato (Galindo *et al.*, 2007).

1.2 CICLO DE VIDA DE *A. vinelandii*

A. vinelandii presenta dos fases en su ciclo de vida: una fase de crecimiento vegetativo y una fase de vida latente. Hasta el momento no se conoce cuales son las condiciones ambientales precisas por las que se da el término de la fase vegetativa y se inicia el proceso de diferenciación (fase de vida latente) (Sadoff, 1975) (Fig.1).

En su ambiente natural, *A. vinelandii* inicia el proceso de diferenciación o enquistamiento cuando las condiciones para su supervivencia son adversas; esto le permite permanecer en suelos por periodos prolongados de tiempo, hasta que se vuelve a presentar un entorno favorable para su germinación. Bajo condiciones de laboratorio se puede inducir dicho proceso mediante medios de crecimiento adicionados con β -hidroxibutirato o n-butanol como única fuente de carbono (Sadoff, 1975).

Cuando se inicia el proceso de enquistamiento las células pierden sus flagelos y se presenta una última división celular donde se generan dos células esféricas de tamaño menor (cada una se convertirá en un quiste), las cuales se encapsulan

mediante la biosíntesis de dos capas, la intina y la exina, constituidas principalmente del polímero alginato (13 y 32% respectivamente) y de lipoproteínas (Sadoff, 1975). Una vez que termina este proceso, se presenta la formación del quiste maduro, que consiste en una célula pequeña metabólicamente inactiva, que conserva su membrana citoplasmática y una delgada pared celular de ácido murámico. Esta célula denominada cuerpo central o basal, contiene en su interior gránulos de PHB como fuente de carbono de reserva.

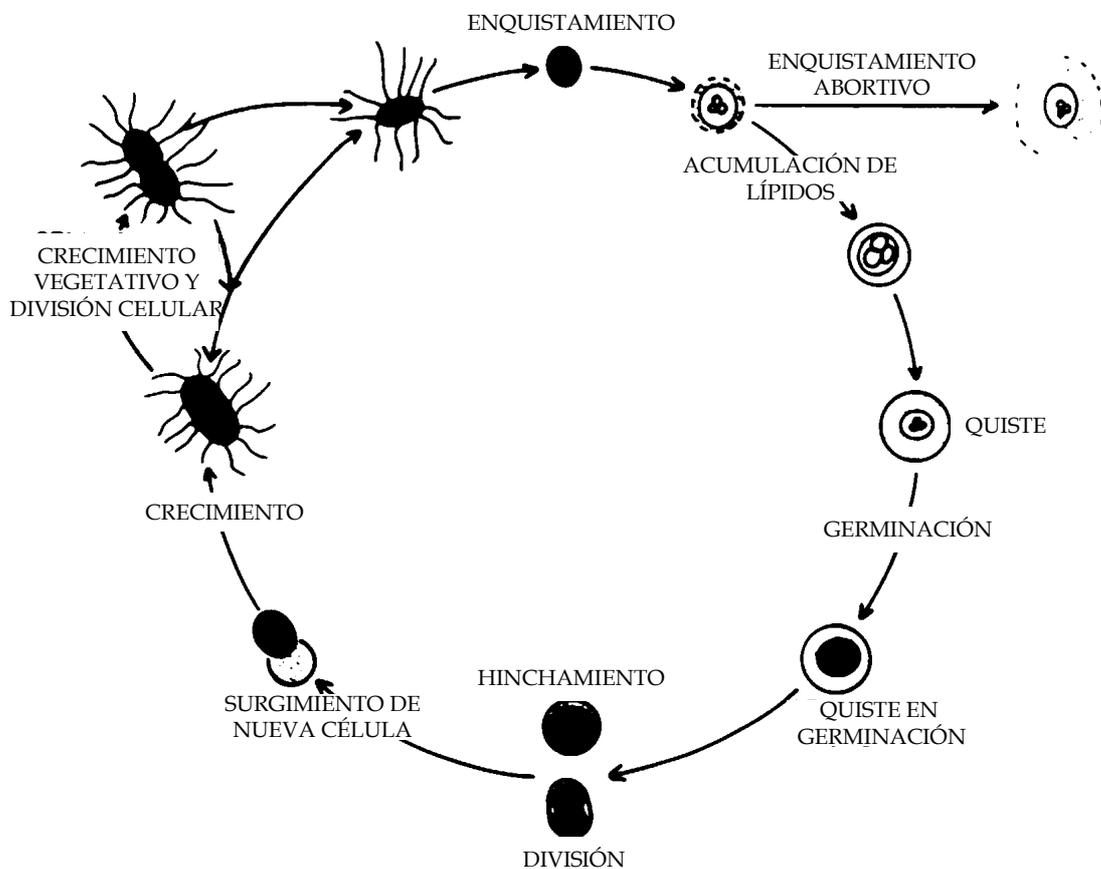


Figura 1: Ciclo de vida de *A. vinelandii* (modificado de Sadoff, 1975).

En condiciones favorables, el quiste inicia un proceso de germinación, proceso por el cual dichos quistes sufrirán los cambios necesarios para convertirse

nuevamente en células vegetativas. Al observar quistes en germinación al microscopio, se nota una pérdida en la refractibilidad, proceso que dura de 4 a 8 horas, tiempo durante el cual el cuerpo central se hincha y ocupa el volumen de la intina. El crecimiento del quiste causará una posterior ruptura de la exina, emergiendo una célula en división que aún no presenta movilidad, la cual será recuperada una vez que la célula sintetice nuevamente sus flagelos, esto ocurrirá antes de terminar la primera división después de la germinación (Sadoff, 1975).

1.3 METABOLISMO DE CARBONO: LA VÍA ENTNER-DOUDOROFF Y EL CICLO DE LAS TRIOSAS-FOSFATO

Una parte fundamental en los procesos bioquímicos que se llevan a cabo en la célula bacteriana lo constituye el metabolismo de carbono, ya que los carbohidratos son la principal fuente de energía. Es por eso que resulta de gran importancia conocer y entender el funcionamiento de las rutas metabólicas que involucren carbohidratos, pues esto conduce a un mejor entendimiento del comportamiento celular bajo ciertas condiciones.

Analizando la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, se comprobó que los genes necesarios para el metabolismo de diversos azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes se encuentran presentes, por lo que es capaz de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono: es posible que esta versatilidad de metabolismo se deba a la gran cantidad de compuestos derivados de la descomposición de plantas u otros materiales del suelo (Helga Ertesvag, comunicación personal).

En el género *Pseudomonas*, la vía Entner-Doudoroff (ED), junto con la gluconeogénesis, son la parte fundamental del metabolismo central de carbono. La vía ED fue descrita por primera vez en *Pseudomonas saccharophila* en 1952, y se considera como vía alternativa a la Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Conway, 1992).

Tanto la vía ED como la EMP comienzan con un azúcar de seis carbonos que es fosforilado y posteriormente escindido por acción de una aldolasa dando como resultado dos intermediarios de tres carbonos cada uno. La diferencia radica en la naturaleza del compuesto de seis carbonos que es sustrato de la aldolasa, pues la vía ED no involucra la formación de fructosa 1,6-bifosfato a partir de glucosa. En la vía ED la glucosa es convertida a 6-fosfogluconato por medio de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Zwf). Posteriormente, por acción de la 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd), el 6-fosfogluconato es convertido a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG), el que será escindido por acción de la KDPG aldolasa (Eda) para formar piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (Conway, 1992) (Fig. 2).

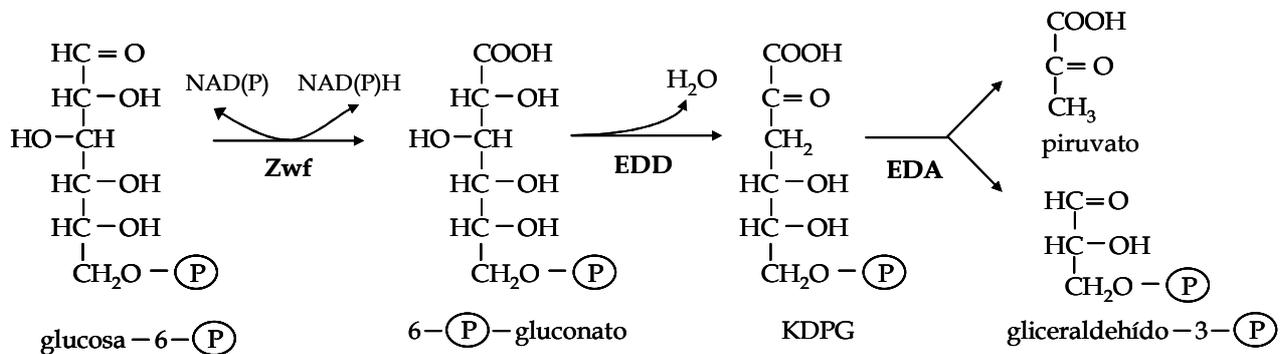


Figura 2: Reacciones de la vía ED (modificado de Conway, 1992). Abreviaturas: Zwf, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; EDD, 6-fosfogluconato deshidratasa; KDPG, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato; EDA, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa.

La primera de dos enzimas clave en la vía ED es la 6-fosfogluconato deshidratasa, que, como ya se ha mencionado, cataliza la conversión de 6-fosfogluconato en KDPG y el gen que la codifica se ha designado como *edd*. Esta enzima fue parcialmente purificada por primera vez a partir de *P. fluorescens* y caracterizada en 1954. Tiene un valor de K_m de 0.5 mM, un pH óptimo de 8.0 y es activada por cationes divalentes como Fe^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (nombrados en orden jerárquico de activación). El mecanismo de acción de la Edd involucra un intermediario enol-KDPG que experimenta un rearrreglo espontáneo a una forma

ceto esencialmente irreversible. La purificación de Edd de *Zymomonas mobilis* reveló que la enzima trabaja como un dímero de subunidades idénticas de 63 kDa cada una, y que dicha enzima es similar a otras enzimas que requieren iones hierro, como la gluconato deshidratasa, aconitasa y dihidroxiácido deshidratasa. Un análisis de la enzima Edd de *Z. mobilis* y de *Escherichia coli* reveló que la secuencia de aminoácidos de los dos organismos está bastante conservada. Las dos enzimas Edd exhiben un 57.7% de identidad y un 75.3% de similitud (residuos químicamente equivalentes) (Conway, 1992).

La segunda enzima, la KDPG aldolasa, corta el KDPG para convertirlo en piruvato y gliceraldehído 3-fosfato. Esta enzima, purificada por primera vez a partir de *P. fluorescens*, tiene una K_m de 0.1 mM, con un valor de pH óptimo de 7.0 a 8.5 y un rango limitado de acción catalítica, ya que es bastante específica, al no escindir otros sustratos como ceto-desoxigluconato o fructosa-1,6-bifosfato. En contraste con Edd, la enzima Eda no es exclusiva de la vía ED; en realidad, es una enzima multifuncional y se encuentra en diversos organismos, incluso en eucariotes superiores. En *E. coli*, por ejemplo, también cataliza la conversión de 2-ceto-4-hidroxiglutarato (KHG) a piruvato y glioxilato: se ha propuesto que esta actividad KHG aldolasa juega un papel en la regulación de los niveles de glioxilato en dicha bacteria. Del mismo modo, la KHG aldolasa ha podido purificarse de mamíferos superiores, donde está involucrada en la biosíntesis de hidroxiprolina. La purificación de Eda de *Z. mobilis* muestra que la enzima trabaja como un trímero de subunidades idénticas de 23 kDa cada una. Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima Eda de *E. coli*, *Z. mobilis* y *P. putida* demuestra que la enzima de *E. coli* es un 51.5% idéntica y 68.4% similar a la de *Z. mobilis*, y un 44.4% idéntica y 65.4% similar a la de *P. putida*. Una inspección detallada de la secuencia revela la presencia de cinco regiones de cuatro o más aminoácidos idénticos consecutivos. El sitio activo, lisina 133 y arginina 49 están conservados en las tres enzimas Eda: se cree que dichos aminoácidos están

involucrados en la ruptura y condensación por medio de la formación de bases de Schiff (Conway, 1992).

Se sabe que la vía ED puede presentar algunas variantes en cuanto a su funcionamiento. En algunos organismos la vía ED se emplea en un sentido estrictamente catabólico, se expresa constitutivamente y conforma de manera única el metabolismo central de carbono, en contraste con otros géneros bacterianos (incluyendo bacterias entéricas) en los que la vía ED opera en un arreglo lineal, inducida por ciertas fuentes de carbono como el gluconato, pero no como vía metabólica central (la vía principal la constituye la EMP). En géneros como *Clostridium* y algunas arqueobacterias el catabolismo de carbono emplea versiones modificadas de la vía ED que involucran intermediarios no fosforilados. En ciertas bacterias metilótrofas la vía ED juega un papel importante en la asimilación de formaldehído (Conway, 1992).

Otra modalidad, que opera en la mayoría de las Pseudomonadaceas es la modalidad cíclica de la vía ED, la cual involucra el reciclaje de intermediarios de tres carbonos mediante el ciclo de las triosas-fosfato. Este ciclo puede asociarse a cualquier ruta metabólica y consiste en la generación por anabolismo de hexosas-fosfato a partir de las triosas provenientes del catabolismo. La parte anabólica del ciclo siempre es la misma, e incluye la actividad de las enzimas gluconeogénicas triosa-fosfato isomerasa (Tpi), aldolasa, fructosa bifosfatasa y fosfoglucosa isomerasa; no obstante, este ciclo es muy diverso, pues la parte catabólica varía según la ruta metabólica que cada especie bacteriana use. El ciclo de las triosas-fosfato en organismos que presentan la vía ED se logra cuando el intermediario glucolítico gliceraldehído 3-fosfato es reciclado para formar, otra vez, una hexosa-fosfato (Portais y Delort, 2002).

Existen numerosos estudios que indican que el metabolismo de carbono en *Pseudomonas* se lleva a cabo vía ED como única vía glucolítica, al igual que en *A. vinelandii*, ya que estas bacterias carecen de actividad 6-fosfofructocinasa, y por lo tanto son incapaces de catabolizar carbohidratos vía EMP (Mortenson *et al.*, 1955).

Tanto en *Pseudomonas* como en *A. vinelandii* (así como en otros géneros bacterianos como *Xanthomonas* y especies de *Rhizobium*) se ha demostrado la modalidad cíclica de la vía ED; estas bacterias presentan características comunes como el uso preferencial de ácidos orgánicos sobre carbohidratos como fuente de carbono y la habilidad de producir exopolisacáridos como el alginato. En estas bacterias el ciclo de las triosas-fosfato es crucial en el cauce del flujo de carbono hacia la síntesis de fructosa (Beale y Foster, 1996). La glucosa se metaboliza a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. Ulteriormente, por acción de la triosa fosfato isomerasa, se forman moléculas de dihidroxiacetona-fosfato a partir del gliceraldehído-3-fosfato; la aldolasa condensa estos dos compuestos para sintetizar fructosa-1,6-bifosfato, sustrato de la fructosa-1,6 bifosfatasa, que elimina el grupo fosfato del carbono 1 para obtener fructosa-6-fosfato, el sustrato inicial de la síntesis de alginato (Portais y Delort, 2002).

1.4 ALGINATO: COMPOSICIÓN Y APLICACIONES

El alginato es un polisacárido que se extrae principalmente de algunas algas marrones, algas de gran tamaño entre las que se encuentran fundamentalmente *Laminaria hyperborea* y *L. digitata*, que proliferan en el Mar Cantábrico y en las costas de Noruega, donde incluso se recogen en forma mecanizada en aguas poco profundas; *L. japonica*, que se cultiva en China y Japón; *Macrocystis pyrifera*, de aguas del Pacífico y algunas especies de los géneros *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durvillaea* y *Ascophyllum* (McHugh, 2002).

El alginato es un copolímero lineal formado por monómeros de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero, el ácido α -L-gulurónico (G), los cuales están unidos por enlaces $\beta(1-4)$. Dichos monómeros pueden formar cadenas homopoliméricas (poli M o poli G) o bloques heteropoliméricos en los que varía la secuencia y el número de monómeros (Remminghorst y Rehm, 2006) (Fig. 3).

En presencia de calcio, el alginato puede formar una estructura conocida como “caja de huevos”. En esta estructura, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico (Sabra *et al.*, 2001).

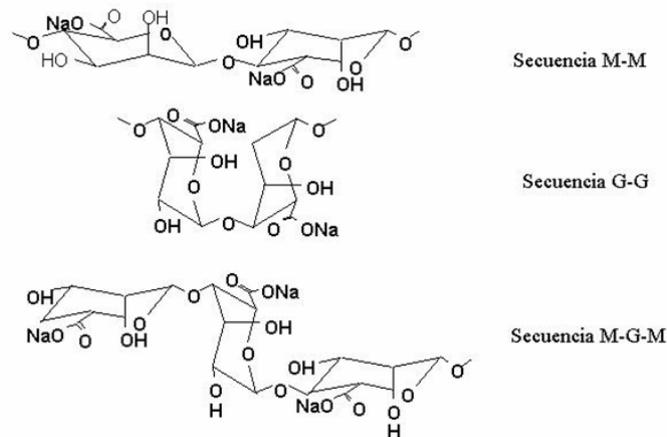


Figura 3: Estructura del alginato (Espín, 2003).

Las zonas con G pueden considerarse como zonas de unión entre cadenas, mientras que las de M son las de interacción preferente con el agua. Consecuentemente, el contenido y la distribución de los bloques M y G repercute directamente en la capacidad de gelificación, entendiéndose con esto que los alginatos ricos en G forman geles más resistentes y rígidos; por el contrario los alginatos ricos en M forman geles menos firmes, más suaves y de mayor elasticidad (Clementi, 1997).

En 1881 el químico británico E. E. C. Stanford describió por primera vez la existencia de alginato algal. Desde entonces y hasta ahora la producción de alginato se realiza a partir de extractos de algas cafés. Si bien es cierto que todas las algas marrones contienen alginato, hay grandes diferencias en la cantidad y calidad presente. Un alga comercial debe contener alrededor del 20% de su peso seco de alginato. La calidad se basa en dos aspectos importantes:

- 1) La viscosidad que producirá el alginato disuelto en agua al 1%. Cuanto mayor es la viscosidad de la solución mayor se considera la calidad. Las algas cafés que crecen en aguas frías suelen producir un alginato de

buena calidad, mientras que las que crecen en aguas entre templadas y tropicales producen a menudo un alginato de poca viscosidad.

- 2) El grado de desarrollo del alga. Las algas más jóvenes tienen menor contenido de alginato, y con menor viscosidad y capacidad gelificante, que las algas maduras. El alginato puede tener un peso molecular variable, dependiendo del tipo de alga, siendo el más largo el de *L. japonica*. A veces se hidroliza también para su comercialización a distintos tamaños, dependiendo de la aplicación a la que se destine. Durante el almacenamiento de las algas secas antes de su procesamiento, o incluso del producto en polvo, el alginato se degrada con facilidad en presencia de oxígeno, disminuyendo su viscosidad. La forma ácida es la menos estable, y la sal sódica la más estable. En disolución, es estable entre pH 5,5 y pH 10 (McHugh, 2002).

Gracias a sus propiedades, el alginato se utiliza como espesante y viscosificante. Tiene una amplia variedad de usos en industrias como la de alimentos, farmacéutica y biotecnológica. Sin embargo, la producción a gran escala de alginato se realiza a partir de extractos de algas marinas silvestres, pues resulta demasiado costoso cultivar algas para obtener materias primas destinadas a usos industriales. Además, como ya se ha comentado, el contenido y composición del alginato así extraído es variable, lo que afecta su calidad (Clementi, 1997). Por esta razón se ha comenzado a pensar en el alginato de origen bacteriano como una opción en su producción, por presentar ventajas como tener una calidad constante y no estar sujeta a variaciones climáticas.

Si bien es cierto que tanto *Pseudomonas* como *Azotobacter* son capaces de sintetizar alginato, *A. vinelandii* representa una mejor opción para el desarrollo de procesos biotecnológicos para optimizar la producción de alginato a escala industrial, por ser una bacteria de suelo no patógena (Galindo *et al.*, 2007).

1.5 BIOSÍNTESIS DEL ALGINATO POR *A. vinelandii*

A mediados de la década de 1960 Linker y Jones descubrieron fuentes de alginato provenientes de bacterias como *P. aeruginosa*. Sin embargo, *A. vinelandii*, también puede sintetizar alginato, ya sea en su fase vegetativa o como parte del proceso de enquistamiento.

Gorin y Spencer (1966) demostraron que el alginato producido por *A. vinelandii* era muy similar al algal, con la diferencia de tener algunos residuos acetilados. Fue hasta 1975 cuando Pindar y Bucke esclarecieron la vía de biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*, basados en un ensayo de actividad enzimática.

Para efectos prácticos, la biosíntesis de alginato puede ser dividida en cuatro procesos: síntesis de los precursores, polimerización, transporte, modificación y exportación del polímero (Remminghorst y Rehm, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el sustrato inicial para la biosíntesis de alginato es la fructosa 6-fosfato, la cual mediante la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa-guanosina difosfomanosa pirofosforilasa (AlgA) es convertida a manosa 6-fosfato y posteriormente a manosa 1-fosfato por la acción de la fosfomanosa mutasa (AlgC). Ésta es activada vía GTP por AlgA para generar GDP-manosa, que después se oxida a ácido GDP-manurónico por la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (AlgD). El ácido GDP-manurónico es polimerizado gracias a la enzima manuronato polimerasa (Alg8) para formar ácido polimanurónico. Para su posterior modificación este polímero tiene que ser transportado a través de un complejo de proteínas (AlgG, AlgK, AlgX, AlgL) que forman una plataforma que protege y alinea la cadena en su paso por el periplasma (Remminghorst y Rehm, 2006) (Fig. 4).

La primera modificación del alginato es la acetilación, que se lleva a cabo por un complejo de acetilasas (AlgF, AlgI, AlgV) en el espacio periplásmico. Una vez acetilado, el polímero es exportado al exterior celular por medio de AlgJ (una proteína formadora de poro); fuera de la célula, residuos no acetilados son

epimerizados por un conjunto de 7 epimerasas (AlgE1-AlgE7) que generan residuos G para dar al alginato su composición final (Sabra *et al.*, 2001).

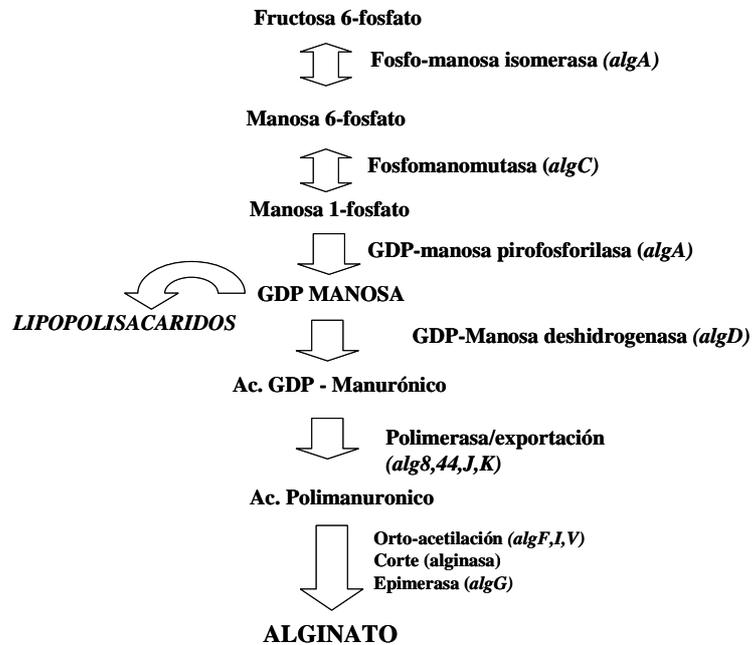


Figura 4: Biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* (modificado de Galindo *et al.*, 2007).

La producción de alginato cumple una función biológica en *A. vinelandii*: este polímero es esencial para la biogénesis del quiste maduro ya que es un componente esencial de las dos capas que cubren a los quistes maduros, la exina e intina de las cuales el 32 y 13% de su peso seco es alginato (Page y Sadoff, 1975); las mutantes no productoras de alginato son incapaces de formar quistes maduros (Campos *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, 1997). El alginato también es producido en células vegetativas no diferenciadas, en estas condiciones la función del alginato pudiera ser la formación de películas que le permiten a la bacteria adherirse a superficies (Clementi, 1997). La acumulación extracelular del alginato actúa como una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados (Clementi, 1997) o de protección contra otro tipo de agresiones del medio ambiente.

1.6 GENÉTICA Y REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ALGINATO EN *A. vinelandii*

Con excepción de *algC*, todos los genes que codifican las enzimas involucradas en el proceso anterior están agrupados en una misma región del cromosoma (Galindo *et al.*, 2007) (Fig. 5). *algC* se transcribe a partir de dos promotores y por si solo es un operón (Gaona *et al.*, 2004).

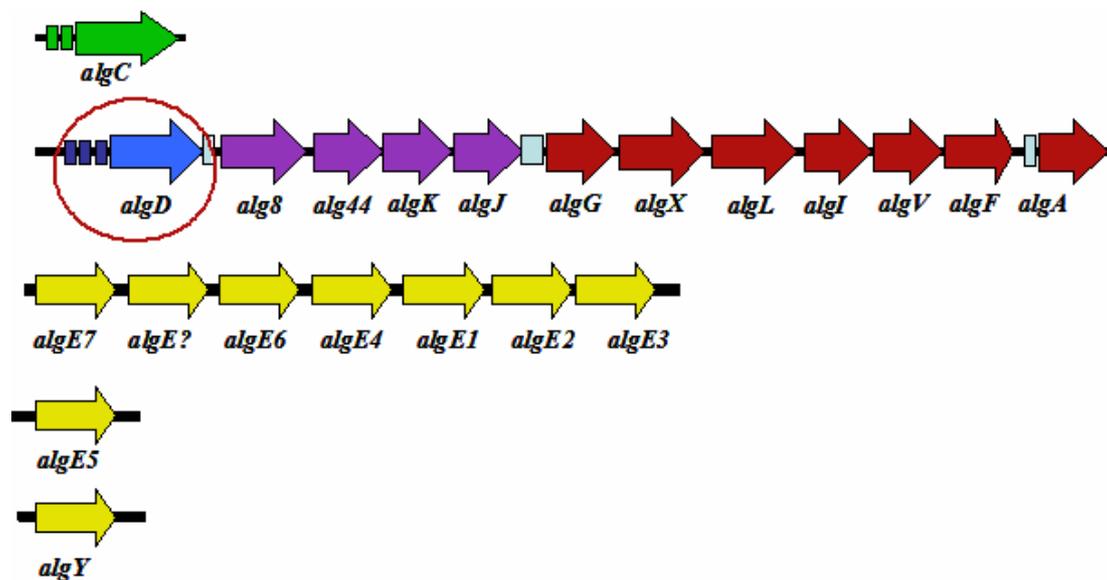


Figura 5: Genes involucrados en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

El gen *algD* codifica a la GDP-manosa deshidrogenasa, la enzima clave en la biosíntesis del alginato (Campos *et al.*, 1996) y se transcribe a partir de tres promotores: el primero de ellos (P1) es dependiente del factor σ^E (Moreno *et al.*, 1998); el segundo promotor (P2) depende de σ^S y un tercer promotor (P3) cuya naturaleza se desconoce (Castañeda *et al.*, 2001).

Los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* se localizan inmediatamente río abajo de *algD* y constituyen un operón. Sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997). Inmediatamente después de ése, se encuentra

el operón *algGXLIVFA*. *algG* codifica para una epimerasa; *algL* para una alginasa. Los productos de *algX*, *algV* *algI* y *algF* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos y *algA* codifica para la enzima que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a manosa 6-fosfato y para la conversión de manosa 1-fosfato a GDP-manosa (Vázquez *et al.*, 1999).

Existen además otros genes, cuyos productos participan en el control de la síntesis de alginato, entre ellos el operón *algUmucABCD* (Martínez-Salazar *et al.*, 1996). El gen *algU* codifica para el factor σ^E alternativo, requerido para la transcripción de los genes *algC* (a partir de su promotor 1) y *algD*; por otra parte, MucA y MucB actúan como factores anti- σ^E . De esta manera la producción de alginato en una mutante *algU* se abate, mientras que en mutantes *mucABCD* la producción de alginato se eleva (Moreno *et al.*, 1998; Núñez *et al.*, 2000).

Igualmente, los genes que codifican para el sistema de transducción de señales de dos componentes GacS/GacA regulan positivamente la biosíntesis de alginato. La regulación de la síntesis de alginato por GacS durante la fase estacionaria se lleva a cabo por medio de los tres promotores de *algD*. Por otra parte, la expresión de genes regulada por GacS/A echa mano de otros sistemas intermediarios de regulación. El gen *rpoS*, por ejemplo, regula positivamente al gen *algD*, cuya transcripción a partir del promotor dos es dependiente del factor σ^S , regulado a su vez por el sistema GacS/A (Castañeda *et al.*, 2000; Castañeda *et al.*, 2001). Por otro lado, recientemente se ha comprobado que el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmB también es un intermediario en la cascada de señalización que inicia el sistema GacS/A. En mutantes *rsmB*, la producción de alginato disminuye en un 20% comparada con la producida por la cepa silvestre: estos datos indican que GacS/A y el gen *rsmB* forman parte del sistema que controla la síntesis de alginato (Manzo *et al.*, 2010, en preparación). Sin embargo, la producción de alginato no se abate, lo cual puede ser explicado por la presencia de alelos adicionales del gen *rsmB* (datos no publicados).

2. ANTECEDENTES

2.1 LA VÍA ED Y SU CONTRIBUCIÓN A LA SÍNTESIS DE ALGINATO EN *A. vinelandii*

A pesar de conocer la ruta biosintética por la cual *A. vinelandii* produce alginato, poco o nada se sabe acerca de la genética molecular de la vía ED, mucho menos de su regulación, algo decisivo cuando lo que se quiere es aumentar el rendimiento en la producción de este polímero. Por el contrario, las rutas metabólicas de carbohidratos en diferentes especies de *Pseudomonas* (en especial de *P. aeruginosa*) están bien documentadas, particularmente la vía ED por ser la ruta metabólica principal. Se sabe, por ejemplo, que las enzimas Zwf, Edd, Eda y Glk (glucocinasa) son inducidas por la presencia de glucosa, gluconato, manitol, fructosa y glicerol, mientras que son reprimidas por intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA por sus siglas en inglés) (del Castillo *et al.*, 2008).

En cuanto a la biosíntesis de alginato, tanto en *A. vinelandii* como en *P. aeruginosa* se ha demostrado que la vía ED contribuye a la síntesis de este polímero cuando se usa glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, la participación de la vía no es tan evidente, pues sería lógico suponer que la glucosa se isomerice directamente a fructosa por acción de la fosfoglucoisomerasa (Pgi). A este respecto, existen dos observaciones en especies de *Pseudomonas* (las cuales, muy posiblemente, también sean válidas para *A. vinelandii*) que descartan esta posibilidad: 1) la actividad de la Pgi es muy baja; aunado a esto, la enzima se inhibe en presencia de 6-fosfogluconato, y la rápida oxidación de glucosa en este último compuesto inhibe eficientemente a la Pgi, previniendo la isomerización de glucosa en fructosa; 2) la oxidación irreversible de la glucosa se lleva a cabo en el espacio periplásmico, por lo cual el 6-fosfogluconato resultante puede entrar a la célula y alimentar directamente la vía. De acuerdo con lo anterior, la formación de

glucosa 6-fosfato y su isomerización en fructosa 6-fosfato parece estar limitada en células crecidas en glucosa (Portais y Delort, 2002).

Para dar mayor fuerza a las observaciones previamente comentadas, existe un reporte detallado en *A. vinelandii* que provee evidencia contundente de que todas las unidades de alginato son generadas vía ED si la fuente de carbono es glucosa. Mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) utilizando glucosa marcada con ^{13}C en distintas posiciones, se pudo establecer la distribución de los carbonos marcados en las unidades de alginato (Beale y Foster, 1996; Narbad *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos demuestran que todos los monómeros de alginato son generados a partir de la vía ED, descartando de manera definitiva la participación de la vía EMP y de las pentosas fosfato en la síntesis de alginato y recalando que la isomerización de glucosa a fructosa está bloqueada.

Como previamente se comentó, en *P. aeruginosa* las enzimas de la vía ED se inducen por la presencia de fructosa y glicerol y a pesar de haber evidencia genética clara de la contribución de la vía ED en el catabolismo de estas dos fuentes de carbono (mediante el estudio de mutantes en los genes que codifican para las enzimas de la vía ED), esto no era suficiente para sustentar su participación directa: nuevamente se recurrió a los ensayos de NMR, pero ahora utilizando ^{13}C -fructosa. Al analizar los patrones de distribución de los carbonos marcados, se comprobó que la hexosa se mantenía intacta en las unidades de alginato; asimismo, descubrieron que un porcentaje significativo (40%) de la fructosa es metabolizada vía EMP y el resto por la vía ED (Portais y Delort, 2002). No obstante, la presencia de una vía EMP funcional no está documentada de manera concluyente y se desconoce si esto mismo sucede en *A. vinelandii*.

2.2 GENÉTICA DE LA VÍA ED Y EL REPRESOR *hexR* EN *Pseudomonas*

En relación a la genética molecular del metabolismo central de carbono, recientemente se han identificado los genes necesarios para la vía ED, gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato (excepto el gen *gnd* que codifica para la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa) y el TCA en el genoma de *A. vinelandii*. De igual manera, se halló un gen que codifica para una proteína similar a la 6-fosfofructocinasa II (PfkB) de *E. coli* (41% de identidad), sin embargo, no se ha comprobado su funcionalidad (Helga Ertesvag, comunicación personal). Por otro lado, se sabe que en *P. aeruginosa* y en *P. putida* los genes *zwf*, *pgl* (que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa), *eda*, *edd* y *glk* se localizan en una sola región del cromosoma y que *zwf*, *pgl* y *eda* forman un operón; estos genes se encuentran bajo el control de un gen adyacente, conocido como *hexR* (Fig. 6).

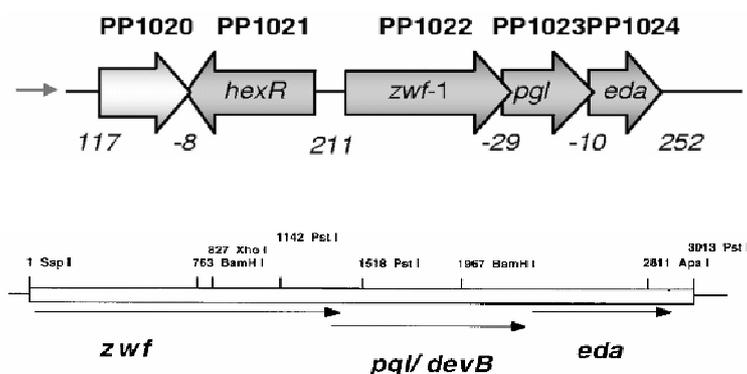


Figura 6: Arreglo genético de la vía ED en el género *Pseudomonas*. Tanto en *P. putida* (arriba) como en *P. aeruginosa* (abajo) los genes *zwf*, *pgl* y *eda* forman un operón regulado por HexR (del Castillo *et al.*, 2008; Hager *et al.*, 2000).

Se ha descrito a HexR como una proteína de 285 aminoácidos que pertenece a la poco documentada familia de reguladores transcripcionales RpiR; los miembros de dicha familia (que pueden ser represores o activadores) presentan un dominio de unión a DNA de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) en su extremo N-terminal,

mientras que en el extremo C-terminal presentan un dominio de unión a un azúcar-fosfato (SIS), el cual también se encuentra en algunas fosfoazúcar isomerasas y proteínas de unión a azúcares fosforilados. Los tres miembros conocidos de esta familia controlan vías metabólicas que involucran cierto tipo de azúcares-fosfato: el regulador arquetipo de esta familia, RpiR (AlsR), controla la utilización de ribosa-fosfato en *E. coli*, regulando la expresión del gen *rpiB*, cuyo producto, RpiB, interconvierte ribulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato. MurR regula el catabolismo de ácido N-acetilmurámico también en *E. coli*. GlvR (YfiA) es el activador del sistema PTS de maltosa en *Bacillus subtilis*, que controla la captación y el metabolismo de maltosa en dicha bacteria (Jaeger y Mayer, 2008).

Tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida* HexR regula la expresión del operón *zwf-pgl-eda*, además de otros genes de la vía ED como el gen *edd* y *gap* (que codifica la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Análisis tipo *northern* y ensayos con el gen reportero GFP demostraron que *zwf* es altamente inducible cuando *P. putida* es crecida en medios de cultivo adicionados con fuentes de carbono como glucosa o gluconato; sin embargo, su expresión no fue detectada en presencia de succinato o malato. La inactivación del gen *hexR* deriva en una expresión constitutiva del operón *zwf-pgl-eda*, sin importar la fuente de carbono que se utilice, lo que permite concluir que HexR es un represor de dicho operón (Kim *et al.*, 2008). Se sabe también que HexR no regula su propia expresión (del Castillo *et al.*, 2008).

C	P_{zwf}	5'	TTGTGGTTTT- ACTA	3'
	P_{gap-1}	5'	TTGTTGGAATT- ACAA	3'
	P_{edd}	5'	TTGTTTAAATATACAA	3'
	Consensus sequence		TTGT. . . N _{7/8} . . . ACAA	

Figura 7: Alineamiento de las secuencias reconocidas por HexR en las regiones promotoras de los genes regulados por HexR y la secuencia palíndromo consenso (Daddaoua *et al.*, 2009).

El tipo de promotor que presentan los blancos de regulación de HexR son aquellos reconocidos por σ^{70} ; al mismo tiempo, estos genes presentan en su región promotora secuencias invertidas repetidas que se sabe, pueden ser sitios de unión a represores, pues dichas secuencias se superponen parcialmente con el sitio de unión a la RNA polimerasa (del Castillo *et al.*, 2008). A este respecto, ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) muestran que HexR se une a la región promotora de *zwf*, *gap*, y *edd* en *P. putida*, indicando la presencia de un sitio operador para la unión de la proteína (Kim *et al.*, 2008; Daddaoua *et al.*, 2009). Posteriormente, se identificaron los sitios de unión (Fig. 7) mediante ensayos tipo *footprinting* y se comprobó que las secuencias de unión de HexR tienen un alto grado de identidad (65.4%) y una secuencia invertida repetida común (Daddaoua *et al.*, 2009). Por otro lado, se había propuesto al 6-fosfogluconato como la molécula inductora de HexR, no obstante, se ha demostrado que la unión de HexR a su sitio operador se inhibe por el KDPG y no por el 6-fosfogluconato: es posible que el KDPG se una al dominio SIS, alterando la conformación del represor e inhibiendo su unión al DNA (Kim *et al.*, 2008). Además, existe un reporte que indica que el KDPG generado durante el metabolismo de glucosa es también una molécula señal involucrada en la represión del catabolismo de tolueno en *P. putida* (del Castillo *et al.*, 2007): es posible que el KDPG sea un intermediario importante para la regulación eficiente del metabolismo energético.

El regulador HexR es una proteína monomérica cuando se encuentra en solución, con un peso molecular de ~30 kDa; sin embargo, al analizar la estequiometría de unión de la proteína a su sitio en el DNA, se comprobó que en realidad hay dos moléculas de proteína por sitio de unión, lo cual sugiere que HexR, a pesar de ser un monómero en solución, su mecanismo de acción es mediante la formación de un dímero (Daddaoua *et al.*, 2009).

2.3 EN UNA MUTANTE *hexR::mTn5* DE *A. vinelandii* SE ELEVAN LOS NIVELES DE ALGINATO

En experimentos de mutagénesis al azar en el fondo genético de la cepa AEIV (recientemente renombrada como cepa E) de *A. vinelandii* usando el transposón mTn5, Núñez *et al.* encontraron 12 mutantes que exhiben una producción elevada de alginato (en comparación con su cepa parental) cuando se les suministra sacarosa como fuente de carbono (Guzmán 2001; Núñez, datos no publicados). En particular, se identificó una mutante denominada GG88 en la que el mTn5 interrumpe un gen ortólogo a *hexR* de *P. aeruginosa* (datos no publicados), al cual se le llamo *hexR1*. La producción específica de alginato en la mutante GG88 se elevó aproximadamente tres veces (ver tabla 1). Se comprobó que este efecto no fuese exclusivo del fondo genético de la cepa AEIV, pues en una mutante *hexR1::mTn5* derivada de la cepa ATCC9046 (a la cual se llamó ATCN88) se observó también un incremento de tres a cuatro veces en la producción específica de alginato. Es importante señalar que el fenotipo de sobreproducción de alginato fue estable en ambos fondos genéticos.

Tabla 1: Producción específica de alginato en diferentes fondos genéticos y en sus mutantes *hexR1::mTn5* derivadas.

µg alginato/mg proteína			
AEIV	GG88	ATCC9046	ATCN88
52.4 ± 8	150 ± 9	800 ±	3400 ±

HexR1 (Avin27270) de *A. vinelandii* es una proteína de 289 aminoácidos que posee un 87% de identidad con su homólogo en *P. aeruginosa*. Debido a que la producción de alginato en la cepa GG88 presenta un incremento de dos veces la obtenida por la cepa silvestre, es probable que HexR actúe como un represor de la

vía ED, lo cual concordaría con los datos obtenidos en Pseudomonadaceas. De igual forma, vale la pena mencionar que el crecimiento celular parece no estar comprometido (fenómeno muy común en cepas con elevada producción de alginato) (Galindo *et al.*, 2007).

Después de un análisis de la secuencia del genoma de *A. vinelandii* (<http://agro.vbi.vt.edu/servlets-examples/annotation-azoto.html>), se identificó el gen *hexR1*, el cual se localiza de manera adyacente a genes de la vía ED, como en el género *Pseudomonas*. Un aspecto interesante del genoma de *A. vinelandii* es la multiplicidad de alelos de los genes de metabolismo de carbono: el porcentaje de identidad es variable, pero en la mayoría de los casos es muy alto. Por ejemplo, existen tres parálogos de *hexR*, y el porcentaje de identidad entre *hexR1* y *hexR2* es de 82% a nivel de secuencia de aminoácidos. Asimismo, se identificaron cuatro alelos que codifican para Zwf, tres de los cuales son casi idénticos. Se desconoce el significado de esta reiteración génica.

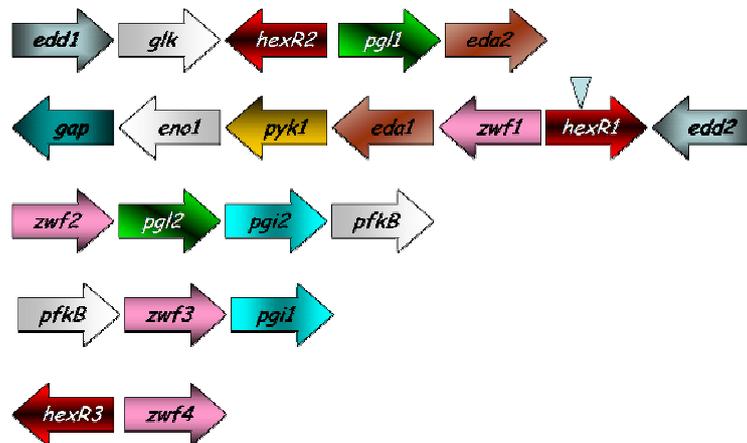


Figura 8: Loci de los genes de la vía ED en *A. vinelandii*, incluido el locus *hexR1* y el esquema de la inserción del mini-transposón (indicada con un triángulo) en la mutante GG88 (*hexR1::Tn5*).

Detalles de la nomenclatura de los genes en el texto.

Como puede observarse en la Figura 8, *hexR1* se encuentra contenido dentro de un grupo de genes, entre los cuales, además de *edd2*, *zwf1* y *eda1*, también se

encuentran otros genes de metabolismo de carbono, como *pykA1* (que codifica para una piruvato cinasa), *eno1* (que codifica para una enolasa) y *gap* (que codifica para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

Por todo lo anterior, es importante esclarecer la genética molecular de la vía ED, así como el papel que juega HexR1 como un regulador putativo de esta vía, pues entender el mecanismo molecular de acción de este regulador abriría la posibilidad de poder manipular el metabolismo central de *A. vinelandii* para construir cepas con mejores rendimientos en la producción de alginato sin comprometer el crecimiento celular.

3. HIPÓTESIS

En *A. vinelandii*, HexR1 es un regulador negativo de la vía ED, al reprimir, al menos, la transcripción del operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* y del gen *edd2*, y por esta razón en la mutante *hexR1::mTn5* dicha vía se encuentra desreprimida, dando como resultado una mayor disponibilidad de precursores para la síntesis de alginato.

4. OBJETIVOS

Objetivo General: Caracterizar funcionalmente el regulador HexR, en la vía ED y en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

Objetivos Particulares:

1. Caracterizar la mutante *hexR1::mTn5* en cuanto a su capacidad de crecimiento y producción de alginato en diferentes fuentes de carbono
2. Investigar el efecto de HexR1 sobre la actividad de las enzimas de la vía ED.
3. Determinar los genes blanco de regulación de HexR1 en la vía ED.
4. Evaluar el efecto de HexR1 sobre el grado de transcripción de los genes *alg*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa	Característica	Referencia o Fuente
<i>A. vinelandii</i> AEIV (E)	Fondo silvestre; Nal ^r	Larsen y Haug, 1971.
GG88	Mutante AEIV, con el gen <i>hexR1</i> interrumpido con el mini-Tn5; Sp ^r	Núñez, datos no publicados
CV23	Derivada de la cepa GG88; complementada en <i>trans</i> con el plásmido pCV04; Sp ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	EndA1 hsdR17 supE44 thi-1 λ -recA1 gyrA96 relA Δ lacU169 ϕ 80 (Δ lacZ Δ M15)	
Plásmido		
pMOSBlue	Vector de clonación para productos de PCR; <i>lacZ</i> , Amp ^r .	Amersham Biosciences®
pCV01	Derivado del pMOSBlue; porta un fragmento de aprox. 1600 pb que contiene al gen <i>hexR1</i> . Amp ^r	Este trabajo
pBSL142	Vector con un cartucho de resistencia a Gm; Amp ^r ; Gm ^r .	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pCV02	Derivado del pMOS <i>hexR1</i> ; contiene un cartucho de resistencia a Gm ligado en el sitio de multiclonación. Amp ^r ; Gm ^r	Este trabajo
pJET1.2	Vector de clonación para productos de PCR; Amp ^r	Fermentas®
pCV03	Derivado del pJET1.2; porta un fragmento de aprox. 700 pb que contiene la región intergénica <i>zwf1-hexR1</i> . Amp ^r	Este trabajo
pBBR1MCS-2	Vector de clonación; <i>lacZ</i> ; Km ^r	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pCV04	Derivado del pBBR1MCS-2; porta un fragmento de aprox. 1600 pb que contiene al gen <i>hexR1</i> . Km ^r	Este trabajo
pRK2013	Plásmido <i>helper</i> ; Tra ⁺ ; Km ^r	Figurski y Helinski, 1979

5.2 SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

NOMBRE	SECUENCIA (5' - 3')	Tm	REGIÓN AMPLIFICADA
Construcción del plásmido pMOS_{hexR1}			
hexR1F	ggc gca gat cgg ctc gta g	64	Región estructural y reguladora del gen <i>hexR1</i>
hexR1R	gtc gca ccg gca ctc tgg	62	
Amplificación por PCR sobrepuesto			
pyk-edaRIF	gtc gtc gag cag cag gat	58	Del gen <i>pykA1</i> al gen <i>eda1</i>
pyk-edaRIR	ccg agc aac gtc aag aac ta	60	
eda-zwfRIF	cgt agc cga gca tga gtt c	60	Del gen <i>eda1</i> al gen <i>zwf1</i>
eda-zwfRIR	gca gga gct ggt atg gag at	62	
zwf1-RR-F	agt tgc agt ttc agc tcc	54	Del gen <i>zwf1</i> al gen <i>hexR1</i>
zwf1-RR-R	tgg agg aaa tcc atc gac	54	
hex-eddRIF	caa gtt ctt ccg ctt caa cc	60	Del gen <i>hexR1</i> al gen <i>edd2</i>
hex-eddRIR	ggc act ctg gaa gtc ttg gt	62	
hex-eddRI2F	ccg gca aat cca ttt ctt c	56	Del gen <i>hexR1</i> al gen <i>edd2</i>
hex-eddRI2R	cag tct gga ggg gtt gaa gt	62	
q-PCR			
edd1F	cct gcg gct gat gga ttc	58	
edd1R	ctt gat ccg ctc ggg ata gt	62	
eda1F	cgc agt tca tcg tca ctc c	60	
eda1R	cgt agc cga gca tga gtt c	60	
algDRT2-F	cgt cta cga gtc cac cgt ct	64	
algDRT2-R	ctg tag ccg gcg tag aag tc	64	
algCRT1-F	gag ctg gtc gag ttg at	62	
algCRT1-R	atg ttg gcc gcg tag tag ag	62	
algGRTF	ctg gct gat cga ctc ggt at	62	
algGRTR	tga tgt tgt cgc ggt agg ta	60	
algARTF	ccg gca act act tct gga ac	62	
algARTR	ggg cag cag gca gtt atc gt	62	
alg8RT2F	cca tgg gaa tca tcc att tc	58	
alg8RT2R	gaa aca cat ggg aag gat cg	60	
fw-gyrA	cca gca agg gca agg tct a	60	
rev-gyrA	tcg tcc agc ggc aac agg t	60	

5.3 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en medio mínimo Burk-Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/l): K₂HPO₄, 8; KH₂PO₄, 2; sacarosa, 200; CaCl₂·2H₂O, 7.3; Na₂SO₄, 18.3; MgCl₂·6 H₂O, 160; FeSO₄·7H₂O, 5; NaMoO₄·2H₂O, 0.2. El pH se ajustó a un valor de 7.2. Se agrega agar bacteriológico (15 g/L) para solidificar el medio. *A. vinelandii* fue crecido a 30°C con una velocidad de agitación

de 200 rpm en matraces de 125 o 250 ml con un volumen de medio correspondiente a la quinta parte del volumen total del matraz. Para los ensayos de cuantificación de alginato se usaron placas de agar Burk, sustituyendo la fuente de carbono original con fructosa, glucosa, manitol o glicerol 50 mM, a 30°C durante 48 horas. En los casos de la cuantificación relativa de la expresión mediante qPCR y de los ensayos enzimáticos, la fuente de carbono original se sustituyó por glucosa o succinato 50mM.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron 24 horas a 37°C en medio Luria Bertani (LB) cuya composición es la siguiente (g/l): peptona de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 10. En medio líquido se coloca también en agitación constante.

Las concentraciones de antibiótico usadas para *A. vinelandii* y *E. coli*, respectivamente son: espectinomicina, 50 y 100 µg/ml; gentamicina, 0.5 y 10 µg/ml; kanamicina, 3 y 30 µg/ml; ampicilina, 100 µg/ml (no usada para *A. vinelandii*)

5.4 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

El DNA cromosomal fue extraído con el *kit* MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification (Epicentre). La extracción de material plasmídico se realizó con el *kit* de purificación GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas®) mientras que la purificación de productos de PCR se llevó a cabo con el *kit* PureLink PCR Purification de Invitrogen®. Los procedimientos estándar de digestión con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa para DNA y RNA, ligación de DNA, hibridación tipo *Southern* y transformación de *E. coli*, se realizaron según lo descrito por Sambrook *et al.*, (1989). La purificación de RNA se llevó a cabo según lo reportado por Barry *et al.*, (1992); el RNA obtenido mediante este protocolo de purificación fue tratado con la enzima DNase I, RNase-free (Fermentas®) según las especificaciones del fabricante; a partir de 200 µg de RNA

tratado se sintetizó el cDNA utilizando el RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas®); los oligonucleótidos fueron usados a una concentración de 2 pmol/μl.

5.5 PCR

Mientras no se indique lo contrario, las condiciones para la PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95°/2 minutos; alineamiento (la temperatura se especifica en la tabla de oligonucleótidos)/1 minuto; extensión a 72°C durante 1 minuto por cada 1000 pb que se deseen amplificar, todo esto durante 30 ciclos con un último ciclo de extensión final de 72°C/10 minutos. Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (Fermentas®). Para las reacciones de PCR acopladas, las regiones intergénicas del locus *hexR1* se amplificaron mediante PCR y el diseño de los cebadores se realizó de tal manera que el oligonucleótido delantero hibridara hacia la parte final de un gen, mientras que el oligonucleótido reverso hibridara hacia la parte inicial del siguiente gen.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA - qPCR

Para los ensayos de cuantificación relativa mediante qPCR se utilizaron 100 ng de cDNA, con la correspondiente mezcla de oligonucleótidos a una concentración final de 250 nM y SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas®). Las reacciones se realizaron en el LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche), con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de 95°C/1° min, un ciclo de dos pasos de 95°C/15 segundos seguido de 60°C/60 segundos, todo esto durante 40 ciclos. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) disponible en el sitio *web*

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; el tamaño de los amplicones fue de 100 pb. Todas las reacciones de qPCR fueron realizadas por triplicado para cada gen de cada cepa en cada una de las condiciones. Los niveles del gen *gyrA* fueron usados como control interno para normalizar los resultados obtenidos.

La reproducibilidad del procedimiento completo fue determinada realizando la síntesis de cDNA y los experimentos de qPCR de tres extracciones separadas de RNA de cada cepa en cada una de las condiciones.

5.7 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pCV01, pCV02, pCV03 y pCV04

El gen *hexR1* fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos hexR1F y hexrR1R con una T_m de 60°C y empleando DNA cromosomal de la cepa UW136 de *A. vinelandii* como templado; el producto de la reacción fue purificado y posteriormente clonado con el *kit* de clonación pMOSBlue Blunt Ended Cloning (Amersham Biosciences®), obteniendo el plásmido pCV01; con el fin tener un marcador de resistencia útil en *A. vinelandii*, se ligó un cartucho de resistencia a gentamicina (Gm), obtenido del plásmido pBSL141 mediante una reacción de restricción con la enzima *Bam*HI y ligado en el sitio de multiclonación del plásmido pCV01; a éste nuevo vector con el marcador de resistencia a Gm se le nombró pCV02. Para el plásmido pCV03 se amplificó por PCR la región intergénica entre *zwf1* y *hexR1* con los oligonucleótidos zwf1-RR-F y zwf1-RR-R usando DNA cromosomal de la cepa AEIV de *A. vinelandii* como templado; el producto de la reacción fue purificado y posteriormente clonado con el *kit* de clonación CloneJET™ PCR clonign (Fermentas®). Para la construcción del plásmido pCV04, se realizó una doble reacción de restricción con las enzimas *Hind*III/*Bam*HI (Fermentas®) tanto del vector pBBR1MCS-2 como del plásmido pCV02; una vez liberado el fragmento de 1600 pb del plásmido pCV02 (el cual corresponde al gen

hexR1), se purificó a partir de la banda de agarosa que corresponde al tamaño del gen para posteriormente ligarlo al vector pBBR1MCS-2.

5.8 CUANTIFICACIONES DE PROTEÍNA Y ALGINATO

Para el ensayo de cinética de crecimiento se realizó una cuantificación de proteína a 0, 8, 12, 24, 36 y 48 horas de crecimiento en base al método reportado por Lowry *et al.*, (1951). La pastilla obtenida del cultivo de *A. vinelandii* se lavó con $MgSO_4$ 10mM y se resuspendió en 1 ml. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 200 μ l, a la cual se le añadió 1 ml de solución reactiva. Se dejó reposar 10 minutos para posteriormente agregar 100 μ l de reactivo de Folín (Sigma) diluido en un volumen de agua, y se dejó otra vez en reposo por 30 minutos. Por último, la absorbancia se lee a 625 nm. Paralelamente se corrió la curva de calibración con concentraciones de albúmina de 25, 50, 100, 200 y 400 μ g/ml. Las soluciones utilizadas fueron: a) Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N; b) Tartrato de sodio y potasio 2%; c) $CuSO_4$ 1%. La solución reactiva se preparó con 1 ml de solución C, más 1 ml de solución B, más 98 ml de solución A.

Por otra parte, para medir la producción de alginato se usaron placas de agar Burk (ver Medios y Condiciones de Cultivo); se cosechó el tapete celular, se resuspendió en NaCl 0.85% y posteriormente se centrifugó para separar el paquete celular del sobrenadante. Dicho sobrenadante (en el cual está contenido el alginato) se mezcló con 4 volúmenes de isopropanol para que el polímero precipitara y pudiera separarse por centrifugación. Una vez obtenido el precipitado blanco, se lavó con etanol, se dejó secar y se resuspendió en un volumen adecuado de NaCl 0.85%. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 350 μ l, ésta se colocó cuidadosamente en un tubo de ensaye con 3 ml de una solución boratos-ácido sulfúrico, se adicionaron 100 μ l de carbazol y se dejó reposar en un baño de agua a 55°C durante 30 minutos. La cuantificación espectrofotométrica de ácidos urónicos a 530 nm se basa en la reacción del carbazol luego de la hidrólisis

del polímero en ácido sulfúrico, la cual desarrolla un color rosa-violeta. Paralelamente se corrió la curva de calibración con concentraciones de alginato de 25, 50, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los resultados se estandarizaron con las concentraciones de proteína (la cual se cuantifica mediante el método de Lowry a partir de la pastilla celular obtenida). Las soluciones utilizadas fueron: a) 10.09 g de KOH y 24.7 g de ácido bórico en 100 ml de agua; b) solución 25 ml boratos-975 ml ácido sulfúrico; c) carbazol 0.1% (diluido en etanol).

La reproducibilidad de los anteriores procedimientos fue determinada realizando la cinética de crecimiento y las cuantificaciones de alginato de tres experimentos separados de cada cepa en cada una de las condiciones de cultivo.

5.9 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Los cultivos bacterianos fueron centrifugados y lavados con buffer fosfatos modificado 0.2 M (0.1 M de KH_2PO_4 , 0.1 M de K_2HPO_4 , 0.1 M de 2-mercaptoetanol, 0.1 M de azida de sodio) con un pH de 6.8. Las bacterias fueron resuspendidas en este mismo buffer para luego ser sonicadas (cuatro pulsos de 7 MHz de 10 seg en hielo) y posteriormente centrifugadas (10 min a 4°C) para remover los restos celulares y conservar el extracto crudo. Las mezclas y condiciones de reacción (1 ml de volumen a 25°C y pH 8.5) para las actividades de Zwf y Edd-Eda se realizaron de acuerdo a lo reportado por Lessie y Vander Wyk (1972): para Zwf se mezcló Tris-HCl 200 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, NADP 0.5 mM, glucosa 6-fosfato 10 mM (como sustrato) y una cantidad adecuada de extracto celular; para Edd-Eda se mezcló Tris-HCl 200 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, NADH_2 0.3 mM, 10 μg de lactato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato 5mM (como sustrato) y una cantidad adecuada de extracto celular. El cambio registrado en la absorbancia a 340 nm se debe a la formación de NADPH (Zwf) o al consumo de NADH (Edd-Eda). La actividad enzimática es reportada como unidades internacionales (UI) por

miligramo de proteína celular total; ésta se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 nanomol de sustrato a un producto específico en un minuto por miligramo de proteína, la cual fue calculada usando el método de Lowry. Los cálculos se realizan a partir de las siguientes fórmulas:

- Unidades/ml = $[(\Delta \text{Abs}_{340\text{nm}}/\text{min}) / 6220 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}] \times 10^6$
- UI = (Unidades/ml)/(mg proteína/ml)

Donde:

$\Delta \text{Abs}_{340\text{nm}}/\text{min}$ = el cambio de la absorbancia medida a 340 nm en un minuto

$6220 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ = coeficiente de extinción molar para el NADP ó NADH a 340 nm

La reproducibilidad del procedimiento completo fue determinada realizando las actividades enzimáticas de tres cultivos separados de cada cepa en cada una de las condiciones de cultivo.

5.10 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

El análisis de la secuencia de aminoácidos de HexR1 para encontrar dominios conservados se realizó con PFAM (Finn *et al.*, 2008); los alineamientos de secuencias nucleotídicas se realizaron con BLAST (Altschul *et al.*, 1990), mientras que los alineamientos a nivel de secuencia de aminoácidos y el cladograma se realizaron con CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007); los modelos tridimensionales de HexR1, HexR2 y HexR3 se realizaron con SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006); para generar la matriz con el motivo de unión reconocido por HexR1 se utilizó el algoritmo MEME (Bailey y Elkan, 1994); ésta matriz fue usada para la búsqueda de sitios de unión de dicha proteína mediante el algoritmo MAST (Bailey y Gribskov, 1998).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis *in silico* de la proteína HexR1 de *A. vinelandii*

El gen *hexR1* de 870 pb, codifica para una proteína de 289 aminoácidos. Un análisis de ésta secuencia con PFAM reveló que, al igual que sus ortólogos del género *Pseudomonas*, pertenece a la familia de reguladores transcripcionales RpiR, ya que presenta dos dominios: el primero de ellos abarca los residuos 5-110, el cual es un dominio de unión a DNA de tipo HTH representativo de la familia RpiR; el segundo involucra los residuos 128-257, el cual es un dominio de unión tipo SIS.

Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de HexR provenientes de *P. aeruginosa*, la cual tiene dos parálogos en su genoma (HexR1, PA3184 y HexR2, PA5438), *P. putida*, que presenta también dos parálogos (HexR1, PP1021 y HexR2, PP5350) y *A. vinelandii* con sus tres parálogos (HexR1, Avin27270, HexR2, Avin15700 y HexR3, Avin02030). Posteriormente el alineamiento se usó para construir un cladograma (Fig. 9) que mostrara la relación que existe entre todos los ortólogos. Lo que se puede inferir, tanto del alineamiento como del cladograma es que, aunque todos ellos están bien conservados, es muy probable que las proteínas HexR1 y HexR2 de *A. vinelandii* compartan una misma función, pues están más relacionadas a las proteínas HexR de *Pseudomonas*. En contraste, los otros parálogos se ubican en otro brazo del cladograma, lo que permite suponer que, si bien estas proteínas pertenecen a la misma familia de reguladores transcripcionales RpiR, quizá no compartan la misma función y estén a cargo de la regulación de otros genes.

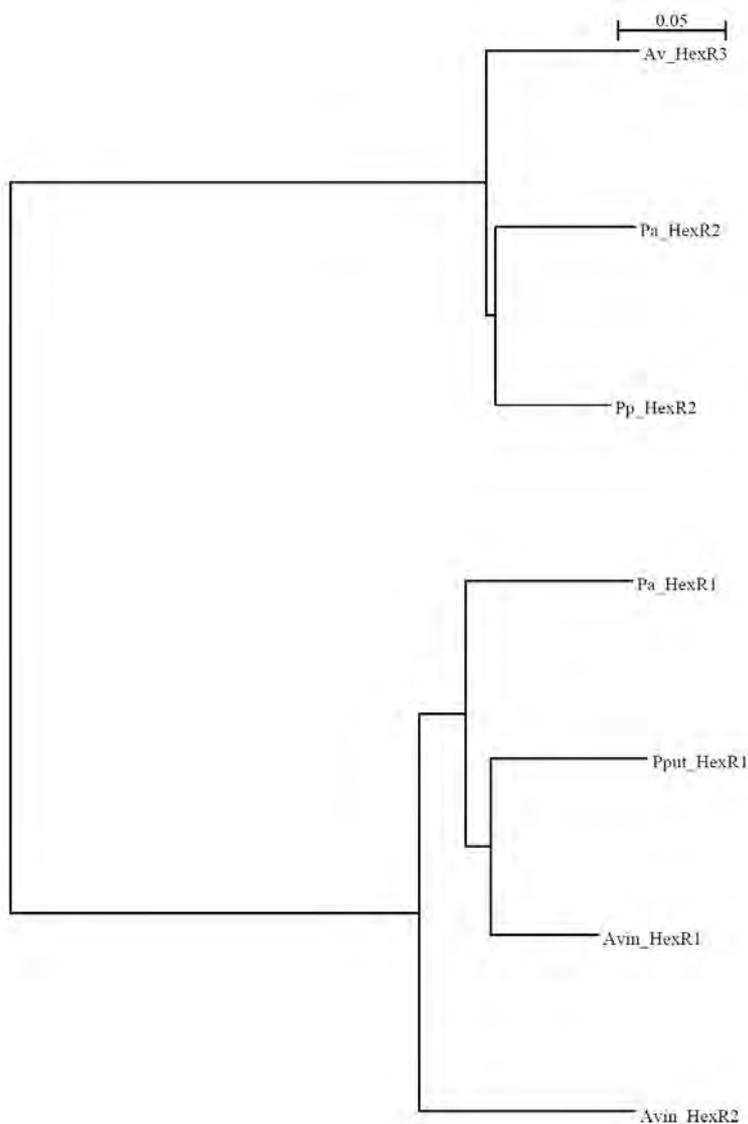


Figura 9: Cladograma construido a partir de un alineamiento realizado entre las secuencias de HexR de *P. aeruginosa* (Pa), *P. putida* (Pput) y *A. vinelandii* (Avin).

Un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de HexR1 de *A. vinelandii*, ahora con los miembros conocidos de la familia RpiR (RpiR y MurR en *E. coli*, y GlvR en *Bacillus*) demostró que, si bien la identidad que existe entre ellos es baja (del 30% aproximadamente), existen aminoácidos muy conservados, sobre todo en los dominios HTH y SIS. Al realizarse un BLAST de la secuencia de HexR1, éste mostró que su región N-terminal es 31% idéntica a la región N-terminal de YbbH,

un regulador transcripcional putativo de *B. subtilis*, cuya estructura tridimensional se conoce (código PDB 2O3F), así que se generó un modelo tridimensional del dominio HTH de HexR1 basado en la estructura de YbbH. El análisis tanto del alineamiento realizado de estas dos secuencias como del modelo sugiere que los aminoácidos Arg 57 y Arg 60 pudieran ser los que interactúan de manera directa con el DNA (Fig. 10A y 10B); cabe destacar que estos residuos de arginina están altamente conservados, tanto en las secuencias analizadas, como en los tres parálogos de *hexR* que existen en el genoma de *A. vinelandii*.

A CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

AvinHexR1  MDRTRNILLEQIQSRLEDLNKAERKVAEVILQDPQQATRYSIASLAQAAQVSEPTVNRFCR  60
BsubYbbH   --MATGGLAIIQSMKHKLPPSERKLADYILAHFPHKAIESTVNEISALANGSSDAVIRLCK  58
           ? . * *** ..* :****: ** .*: * . : : : * : * : * * : * :

AvinHexR1  SFGVSGYPELKLQLAQSLASGAAYVSRAVEADDGPEAYTRKIFGSTIASLDSACQILDPO  120
BsubYbbH   SLGLKGFQDLKMRVAGDLAKPTFQGYRDIVPHEPLPSTSEKTAGNAIQAIQDTSDLMDYK  118
           * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

AvinHexR1  AIDRAVDLLIQARQIHFFGLGASASVAQDAQHKFFRFNLAVSAQCQDVLMOQMLASVAHTG  180
BsubYbbH   EL-----  120
           ?

AvinHexR1  DLFVIIISYTGRTRELVEVAHLARENGASVLGLTAAGSFLARACTLSLNIPLPEDTDIYME  240
BsubYbbH   -----  240

AvinHexR1  MTSRIIQLTVLDVLATGMTLRRGIDFQPHLRKIKESLNSTRYPSDELL  289
BsubYbbH   -----  289

```

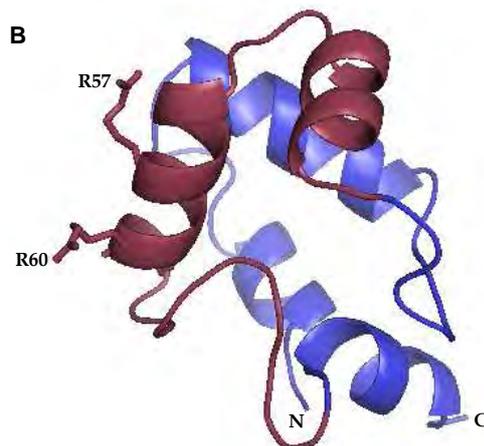


Figura 10: A) Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal de HexR1 (AvinHexR1) y YbbH (BsubYbbH). B) Modelo tridimensional por homología del extremo N-terminal de HexR1 (el motivo HTH se destaca en rojo así como los residuos de Arg 57 y Arg 60).

otros dos, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos y los modelos generados a partir de éste sugieren que el motivo HTH está bien conservado entre ellos, y de manera particular, los residuos de arginina que, se propone, hacen contacto con la secuencia de DNA de sus genes blanco, sin embargo, este motivo HTH se conserva en todas las proteínas que pertenecen a la misma familia, lo cual no significa que todas tengan los mismos blancos de regulación; del mismo modo, se desconoce hasta este momento si los genes *hexR2* y *hexR3* codifican para proteínas funcionales.

6.2 Identificación y análisis del locus *hexR1*

Como previamente se comentó en los Antecedentes, se identificó la secuencia del gen *hexR1* en el genoma de *A. vinelandii*; el arreglo que presenta el locus donde se encuentra contenido el gen *hexR1* es similar al que se encuentra en especies del género *Pseudomonas*, con genes de la vía ED adyacentes a él, además de otros genes implicados en el metabolismo de carbono (Fig. 12).

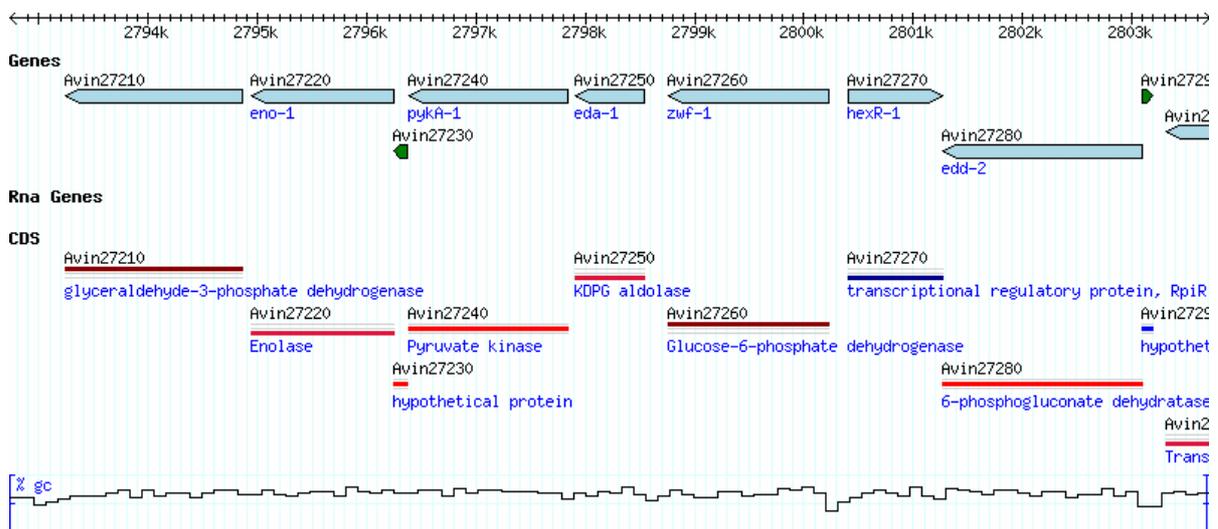


Figura 12: Arreglo genético del locus que contiene al gen *hexR1* en el genoma de *A. vinelandii*

(<http://agro.vbi.vt.edu/servlets-examples/annotation-azoto.html>)

Sin embargo, la secuencia publicada del genoma de *A. vinelandii* corresponde a la cepa DJ, la cual es una cepa diferente a la cepa AEIV, que es con la que se trabaja en nuestro grupo. Para saber si el *locus* obtenido se conserva en nuestra cepa se realizaron reacciones de PCR sobrepuestas, con cebadores que abarcaran el final de un gen y el principio del siguiente usando como templado DNA de la cepa AEIV, (Fig. 13 B). Las reacciones de amplificación (Fig. 13A) muestran que los genes *pykA1*, *eda1*, *zwf1*, *hexR1* y *edd2* sí se encuentran contenidos en ese orden dentro del locus *hexR1* en la cepa DJ; en la cepa AEIV parece estar sucediendo lo mismo, a excepción del gen *edd2*, cuya región intergénica no logró amplificarse. Sin embargo, se sabe que el gen sí se encuentra en el genoma de la cepa AEIV, puesto que previamente se amplificó una región de 100 pb con oligonucleótidos diseñados, inicialmente, para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Es posible que, debido a la reiteración génica, el gen que se encuentra río arriba de *hexR1* sea el parálogo de *edd2*, al cual se le denomina *edd1*.

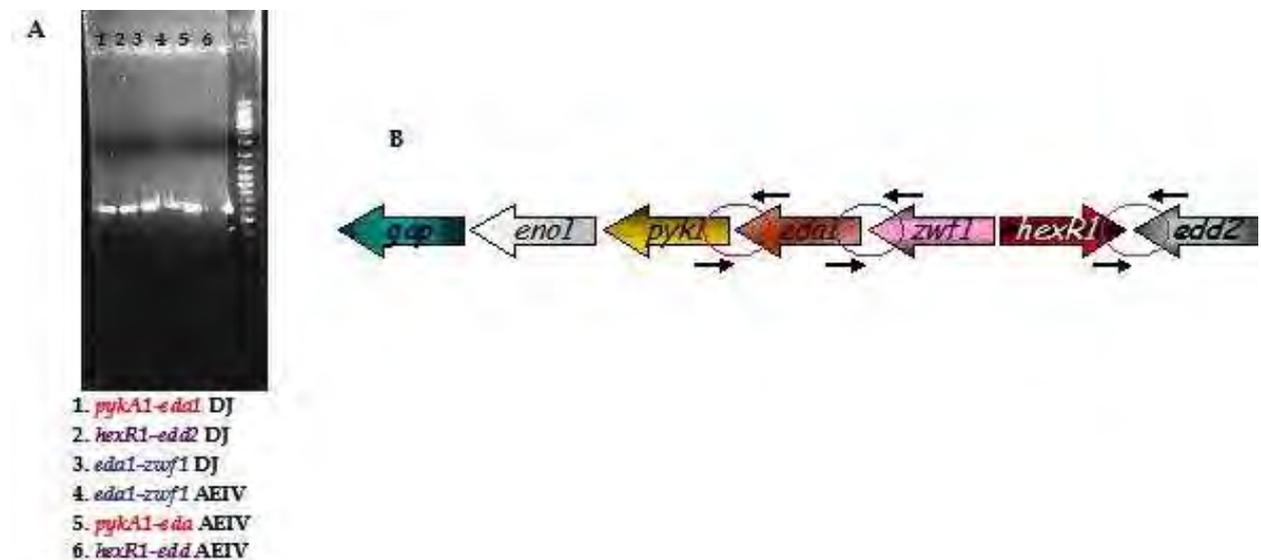


Figura 13: A) Corrimiento electroforético de las amplificaciones por PCR de las regiones intergénicas del locus *hexR1*. La secuencia de los oligonucleótidos usados se detalla en Materiales y Métodos. B) Esquema del diseño de oligonucleótidos y organización del locus *hexR1*.

Por otro lado, la amplificación de la región intergénica que abarca los genes *zwf1-hexR1* se realizó de manera separada, ya que este producto fue clonado (plásmido pCV03) y secuenciado para comparar la región reguladora de *zwf1* en ambas cepas.

A pesar de que no pudo amplificarse la región génica anteriormente mencionada, poco tiempo después se liberó la secuencia cruda de la cepa AEIV, por lo que se realizó un BLAST con la secuencia del locus *hexR1* y se comprobó que ésta misma se conserva en la cepa AEIV. Paralelamente se llevó a cabo un ensayo tipo *Southern* (Fig. 14), el cual confirmó que la alineación del locus *hexR1* es la misma tanto en la cepa AEIV como en la cepa cuyo genoma está publicado y que sí existe un gen *edd* río arriba del gen *hexR1*.

Adicionalmente, con el objeto de investigar si este grupo de genes se transcriben como una sola unidad, se realizó un análisis *in silico* de predicción de operones; los resultados obtenidos mostraron que el tamaño de las regiones intergénicas de *zwf1* a *eda1*, de *eda1* a *pykA1*, de *pykA1* a *eno1* y de *eno1* a *gap* son relativamente pequeñas y, como ya es evidente, estos genes están dispuestos linealmente a lo largo de una misma cadena de secuencia genómica; gracias a esto y otros parámetros de confiabilidad obtenidos, se puede predecir que los genes *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* pertenecen a una misma unidad transcripcional. Esta suposición se confirmó de manera experimental mediante reacciones de PCR sobrepuestas usando como templado cDNA y los oligonucleótidos que se diseñaron originalmente para saber si el arreglo genético se conservaba en la cepa AEIV. Como se puede observar en la Figura 15 sí fue posible amplificar los productos de las regiones *zwf1-eda*, *eda1-pyk1* y *eno1-gap*, tanto de DNA cromosomal (usado como control positivo del experimento) como de cDNA, lo cual confirma que dichos genes forman un operón (García, 2010).

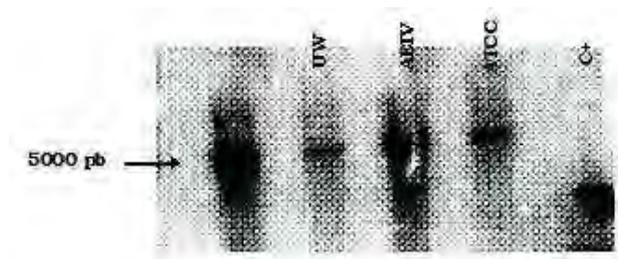


Figura 14: Autorradiografía de la hibridación tipo *Southern* usando DNA cromosomal de las cepas UW, AEIV y ATCC digerido con la enzima *SalI* y como sonda 700 pb correspondientes a la región intergénica *zwf1-hexR1*.

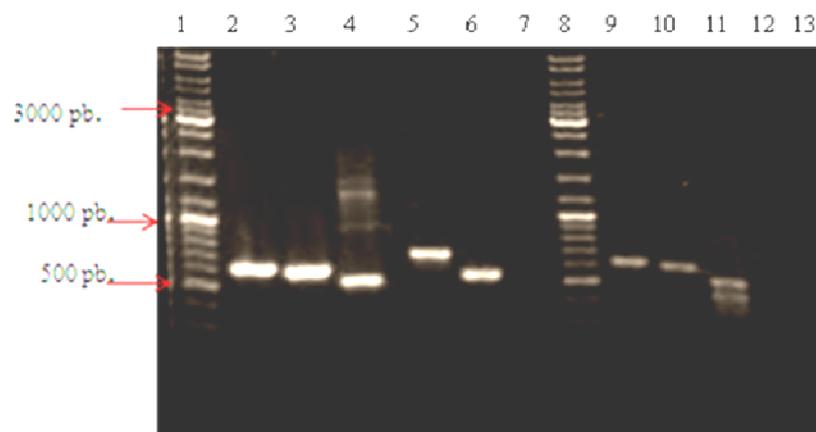


Figura 15: Electroforesis en gel de los productos de PCR sobrepuesto utilizando como templado DNA cromosomal (carriles del 2 al 7) y cDNA (carriles 9 al 13). Se muestran los productos de las siguientes regiones: *zwf1-eda1*, carril 2 y 9; *eda1-pykA1*, carril 3 y 10; *eno1-gap1*, carril 4 y 11; *zwf1-hexR1*, carril 5 y 12; carril 6 control positivo; carril 7, control negativo (García, 2010).

6.3 Complementación génica de la mutante *hexR1::mTn5* (GG88)

A partir de la secuencia nucleotídica, y con el propósito de comprobar que el fenotipo observado en la mutante GG88 se debe exclusivamente a la inactivación del gen *hexR1*, se hizo la complementación génica de la mutante *hexR1::mTn5*, lo cual también sería útil para cumplir con los objetivos planteados. La estrategia que se abordó originalmente fue la construcción de un plásmido suicida en *A. vinelandii*

que portase tanto la región promotora y la estructural del gen *hexR1*, este plásmido se introduciría por transformación y se cointegraría por recombinación sencilla en el locus *hexR1* de la cepa mutante GG88.

Se amplificó por PCR un segmento de 1600 pb (la región estructural de *hexR1* más 500 pb que constituyen su región reguladora; Fig. 16) y para ello, se utilizaron un par de cebadores diseñados a partir de la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, (*hexR1F* y *hexR1R*) y el producto de la reacción se clonó en el vector pMOSBlue de 2887 pb (Amersham Biosciences), el cual está incluido en un *kit* que facilita la clonación de fragmentos generados por reacciones de PCR (Fig. 17A).

```

1 ACCACCCGGGCGCTCCGGCCAGGCCGACCTCGGCCAGCCCGGCGCAGATCGGCTCGTAGAGCGCGGCCGGGTGGCGAAGTAGGGATCAGCCGCTCG
100 GCGGCCGACCCGGTCCGGCCAGCGCGGCGTAGTCCGGGCTGGAGGAAATCCATCGACAGGTAGTCCAGGGCGCCGAGAAAGCGCTGCAGCAGCCCC
199 TCGTCCAGCTCCGGCCCGGGAGCTGGCGGCGCAGGTGCTCGGCGATGGTCCGCCAGGTGGCGGCTCCTCCGCCGGCTCGCGGGCCAGGGCCAGCAGC
298 CGCGTATCCGGGCACGACAGGCCGGCCGGTCCAGTTGGTAAAGGGCGGGGAAACAGCTTGCAGAGGCCAGGTACCCAGGGCTCCGACAGGGCGAAG
397 GTGCAGGGCTCGACAGGAGTGGCGGTGATGATATTCGTTCTTTGTCAAGTATGGATTATGAAAGCATCATTGATCGATTATCACAACATATTGC
496 GTATAAAACTACATTTCTCCATAACCCAGGCATTTTCAGTGGCCCTCCGGAAGCGCCAGTTACGATAAGCCCTCCTCATGCATCATCCACAGGA
595 ACCAACAATGGATCGCACGCGCAATCTGCTGGACAGATCCAGAGCCGCTTAGAAGACCTGAACAGGGCCGAGCCGAGGTGCGCGAAGTCATCTTGCA
694 GACCCGACAGCCACCCGCTACAGCATCGCTCGCTCGCCAGGCCGCCAGGTGAGCGAGCCGACCGTCAATCGCTTTTCCCGCTCCTTCGGGGTC
793 AGCGGCTACCCGGAGCTGAACCTGCAACTGGCGCAGAGCTGGCCAGCGGCCGCCCTACGTGAGCCCGCCGTGGAGCCGAGCATGCCCCGAGGCC
892 TACACCCGCAAGATCTTCGGCAGCACCATCGCTCGCTGGACAGCGCCTGCCAGACGCTCGACCCCGAGGCCATCGACAGGGCGGTGACCTGCTGATC
991 CAGGCCCGCAATCCATTTCTTCGGCCCTCGGCCCTCGGCCCTCGGTGGCCAGGACGCCAGCAGCAGTTCCTCCGCTTCAACCTCGCCGTGTCGGCG
1090 CAGTGCAGCTGCTGATGCAGCGCATGCTCGCCCTCGGTGGCCACACCGGCCACCTTTTCGTGATCATTTCCACACCGGGCGACCCCGCAGCTGGTC
1189 GAGGTGGCAGCTGGCCCGGAGACGGCCCTCGGTGCTCGGCCGACCCGCCGGCTCGCCGCTGGCCAGGGCTGTACCTGAGCCTGAACATC
1288 CCGCTGCCGAGACACCGACATCTACATGCCGATGACTTCGGCGATCATCCAGCTCACCCTGCTCGACGTAAGTGGCCAGCCGATGACCTGCGCCGC
1387 GGCATCGACTTCCAGCCGATCTGCGCAGATCAGGAAAGCCTCACAGCAGCGCGCTATCCAGCGACGACGACACTCCTCAGCCCTTACTTCACCC
1486 CCTCCAGACTGGCGGTGAAGGCGCTCGGCCCTGCTCCGCCGTGCTGAATGCCAGCGCATGAAGGCGAACAGCTCGCGCCCGCAGCCGACCCCGCCG
1585 CCTGCGGACACCGCCGGCTCGCGGGCGGCCAGTTCCGGCGGCTCGACCAAGACTTCCAGAGTGGCGGTGCGAGCCGCTGACCGCAATCACATCGCCGT
1684 CGCGCAGCCTGGCCAGC

```

Figura 16: Secuencia amplificada del gen *hexR1* de *A. vinelandii*. Se muestra en rojo el codón de inicio del gen.

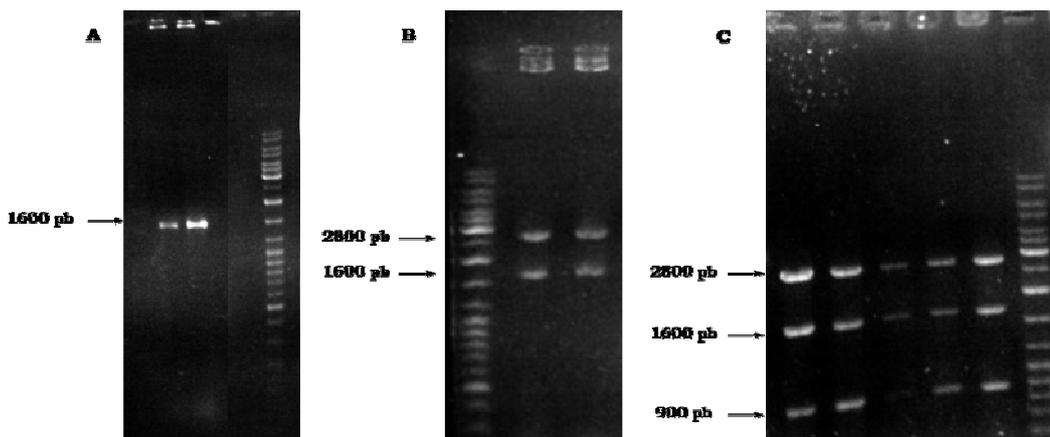


Figura 17: Corrimientos electroforéticos de: A) amplificación por PCR del gen *hexR1*; B) patrón de restricción del plásmido pCV01; C) patrón de restricción del plásmido pCV02

Una vez obtenido el plásmido pCV01 (el vector de clonación más el gen *hexR1*), se procedió a realizar una reacción de doble restricción con la enzima *Bam*HI y *Hind*III con la finalidad de liberar el inserto clonado (Fig. 17B). De las dos colonias probadas, ambas liberan los fragmentos correspondientes al inserto y al vector. Pese a esto era necesario ligar un cartucho de resistencia a algún antibiótico, pues la resistencia a ampicilina que contiene el pMOS no es de utilidad para la selección de cepas transformantes en *A. vinelandii*. Así que se ligó un cartucho de resistencia Gm de 900 pb cortado con *Bam*HI, a partir del vector pBSL142 (Alexeyev, 1995), el cual fue clonado en el único sitio *Bam*HI que el vector pCV01 contiene. La construcción, ahora denominada pCV02, se verificó mediante una reacción de doble restricción nuevamente con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para que los fragmentos correspondientes al vector, inserto *hexR1* y cartucho de resistencia se liberaran (Fig. 17C). Este plásmido no es capaz de replicarse en *A. vinelandii*, por lo que se utilizó para la complementación génica, a través de su cointegración al cromosoma de la mutante *hexR1::mTn5*. En los seis experimentos de transformación que se realizaron, el control positivo (cepa silvestre AEIV transformada con el plásmido pCV02) se recuperó en el medio de selección (BS con Gm); sin embargo, la cepa GG88 no se recuperó en el medio de selección. Después de obtener estos resultados negativos, una posible explicación es que, de alguna manera que se desconoce, el estado de competencia esté alterado en la cepa mutante GG88 o no sea posible inducirlo bajo las condiciones estándar de laboratorio (medio CM, el cual no contiene ni hierro ni molibdeno), lo cual impide su transformación.

Lo anterior dio pie a distintas alternativas: una de ellas fue transferir la construcción realizada al vector pBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995). Este vector, de amplio rango de hospedero, es capaz de replicarse en *A. vinelandii* e igualmente, es posible introducirlo mediante conjugación a la cepa mutante. Se realizó una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, tanto del pCV02 (para liberar el fragmento de 1600 pb que contiene al gen *hexR1*) como del pBR1MCS-2 y a las

clonas que se obtuvieron se les realizó PCR de colonia para verificar la construcción (Fig. 18). Este nuevo vector, al que se denominó pCV04 se usó en experimentos de conjugación triparental, obteniéndose la cepa CV23, complementada en *trans* con el gen *hexR1*.

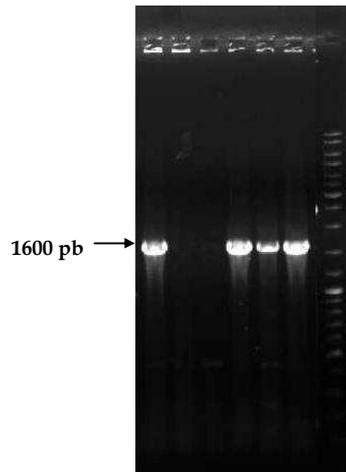


Figura 18: Corrimiento electroforético de la amplificación por PCR de colonia para verificar la construcción del plásmido pCV04

Se realizaron cuantificaciones de alginato usando sacarosa como fuente de carbono, de las cepas silvestre AEIV, mutante GG88 y estas mismas cepas con el vector pBRIMCS-2 vacío (como control), además de la cepa complementada CV23 (Fig. 19). Como se puede apreciar, la presencia del vector solo como control disminuye cerca de dos veces la producción de alginato en la cepa mutante, sin embargo y como era de esperarse, en la cepa CV23 (el vector más el gen *hexR1*) el decremento es de aproximadamente 10 veces, lo cual indica una clara complementación de la cepa GG88; por ello se dedujo que el fenotipo observado en la mutante GG88 se debe a la mutación en *hexR1* y no a algún tipo de efecto polar de la mutación. La razón del efecto negativo del vector pBRIMCS-2 sobre la producción de alginato se desconoce.

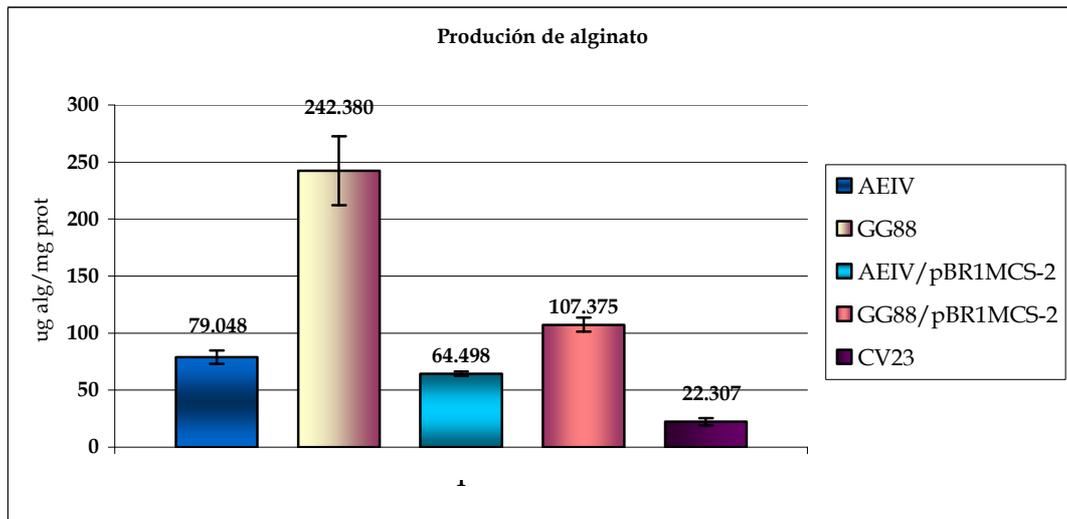


Figura 19: Cuantificación de alginato en las cepas silvestre (AEIV), mutante (GG88) y complementada (CV23). Las cepas AEIV/pBR1MCS-2 y GG88/pBR1MCS-2 contienen al vector vacío como control.

Cabe mencionar que la complementación en *trans* no fue una labor sencilla, pues un obstáculo metodológico que continuamente se presenta en nuestro grupo de trabajo es el encontrar un vector de clonación estable para *A. vinelandii*; no obstante, el vector pBR1MCS-2 muestra una relativa estabilidad y es fácilmente manipulable, razones que lo convirtieron en el vector de elección para la complementación.

6.4 Cuantificación del crecimiento

Como se comentó en los antecedentes, es muy común que cepas productoras de cantidades elevadas de alginato presenten un pobre crecimiento celular. Observaciones previas habían sugerido que en la cepa GG88 la producción de biomasa parecía no estar comprometida, no obstante, había que comprobarlo. Es por esto que se realizó una cinética de crecimiento a 48 horas para comparar el crecimiento de la cepa GG88 contra el fondo silvestre AEIV.

En la Figura 20 se muestran los valores de crecimiento obtenidos a partir de ensayos de cuantificación de proteína por el método de Lowry, comprobándose así las observaciones previamente hechas, pues el crecimiento no se ve afectado por la producción aumentada de alginato. Esto es un buen indicio, pues esta cepa podría ser una buena candidata sobreproductora de alginato que sea útil para experimentos a escala de fermentador.

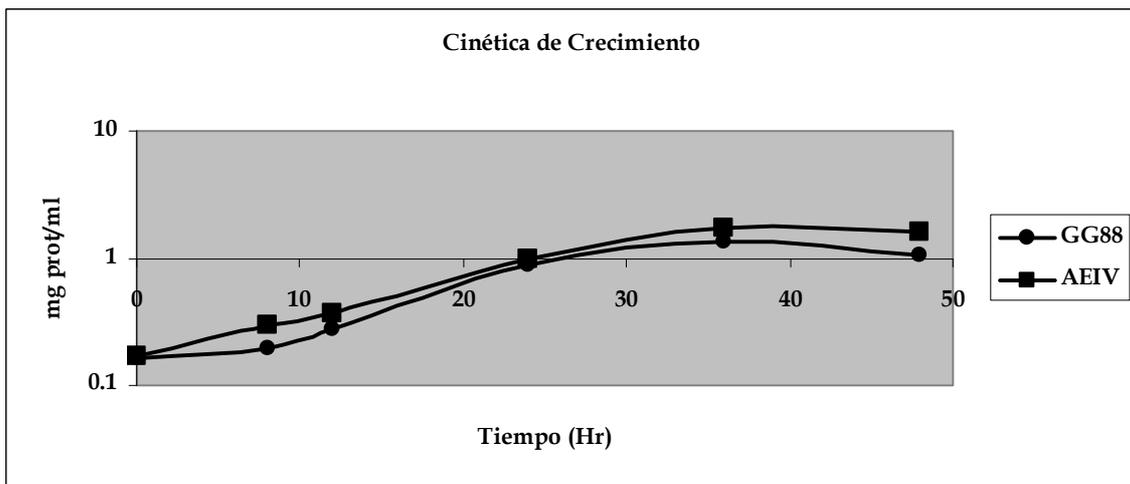


Figura 20: Cinética de crecimiento de la cepa silvestre AEIV y de su derivada GG88

6.5 Cuantificación de alginato en diferentes fuentes de carbono

En la Figura 21 es posible apreciar un incremento de la producción de alginato de la cepa GG88 cuando se le suministra glucosa como fuente de carbono, aproximadamente dos veces la producción de la cepa silvestre. Como se comentó en los antecedentes, es necesaria la participación de la vía ED en la síntesis de precursores de alginato cuando se crece a *A. vinelandii* en glucosa; es por eso que los datos arrojados por este estudio podrían sugerir que la vía ED efectivamente está siendo desreprimida y, por lo tanto, se tiene una mayor eficiencia en cuanto a

la producción de alginato, canalizando la fuente de carbono a la biosíntesis de este polímero.

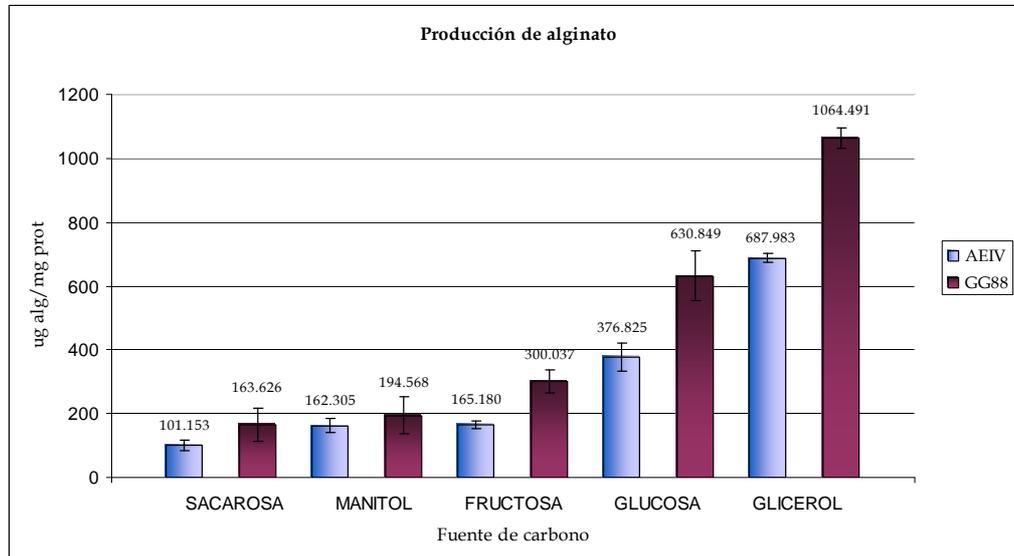


Figura 21: Producción de alginato en las cepas AEIV y GG88 en diferentes fuentes de carbono

Aunque la tendencia es la misma que en glucosa cuando se utiliza fructosa como fuente de carbono, no se observa un fenotipo tan marcado de aumento en la producción de alginato. Como previamente se mencionó en los antecedentes, la fructosa en *P. aeruginosa* no se metaboliza por completo vía ED, pues sólo un 60% de este azúcar se cataboliza por esta vía, mientras que el 40% restante pasa directamente a la síntesis de alginato. Asimismo no se observó un efecto significativo en manitol, una fuente de carbono que es convertida a fructosa para su posterior asimilación en especies de *Pseudomonas* (Temple *et al.*, 1990) y muy probablemente también en *Azotobacter*. Esto puede apoyar la hipótesis de que *hexR1* es un represor que actúa sobre los genes de la vía ED.

El dato sorprendente fue la producción de alginato en glicerol. A pesar de que la cepa AEIV (la cepa silvestre que es el fondo genético de la cepa GG88) es una cepa mucoide, su rendimiento en cuanto a síntesis de alginato es bajo comparados con la cepa ATCC 9046, la cual es una cepa altamente mucoide, que produce hasta

10 veces más alginato que la cepa AEIV (ver tabla 1). Los valores obtenidos de producción de alginato en la mutante GG88 en glicerol como fuente de carbono, se acercan a los producidos por la cepa silvestre ATCC9046. Sería interesante comparar el comportamiento de la mutación en *hexR1* en ambos fondos genéticos en cuanto a los valores de producción de alginato, no sólo en glicerol, sino en diferentes fuentes de carbono.

A pesar de hacer una búsqueda de antecedentes que pudieran indicar cómo la fuente de carbono influye en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, no existen reportes previos en la literatura que aborden este tema en particular. Se han explorado otros parámetros como la tensión de oxígeno, la concentración de fosfato y la diazotrofía (Horan *et al.*, 1981); no obstante, sólo se explora la opción de la sacarosa o la glucosa como fuente de carbono, sin que haya datos sobre otras fuentes alternas que conlleven a una mayor producción. Una alternativa puede ser el uso de RT-PCR en tiempo real, la cual podría darnos una pauta de lo que ocurre con los genes de la biosíntesis de alginato en condiciones silvestres, suministrando diferentes fuentes de carbono, lo que permita tratar de comprender el comportamiento de la cepa silvestre en cuanto a la producción de alginato en glicerol.

6.6 Expresión de los genes de la vía ED

Un aspecto importante en el entendimiento de la red de regulación que ejerce HexR1 sobre la vía ED consiste en identificar qué genes están siendo activados o reprimidos y el mecanismo por el cual HexR1 ejerce dicha regulación. Para ello, se realizó la cuantificación de RNA mensajero mediante RT-PCR en tiempo real de los genes *edd2* y *eda1*, a partir de RNA total extraído de las cepas AEIV y GG88 crecidas durante 24 horas en medio mínimo Burk adicionado con glucosa o succinato como fuente de carbono (Fig. 22 y 23).

Los resultados muestran que la expresión de ambos genes en el fondo genético de la cepa silvestre disminuye cuando la fuente de carbono es succinato, en comparación con su expresión en presencia de glucosa. Por otro lado, la expresión de los genes en la cepa mutante se mantiene en niveles similares, independientemente de la fuente de carbono.

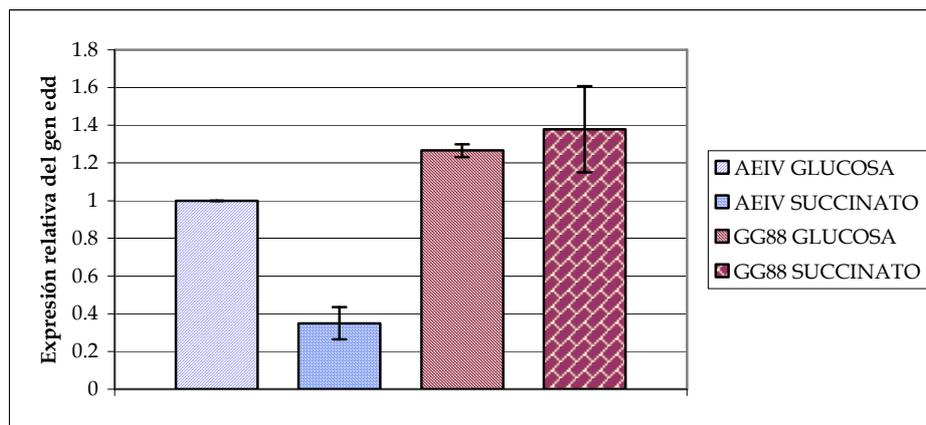


Figura 22: Expresión relativa del gen *edd* en las cepas AEIV y GG88 a 24 horas de crecimiento en medio mínimo Burk adicionado con glucosa o succinato como fuente de carbono

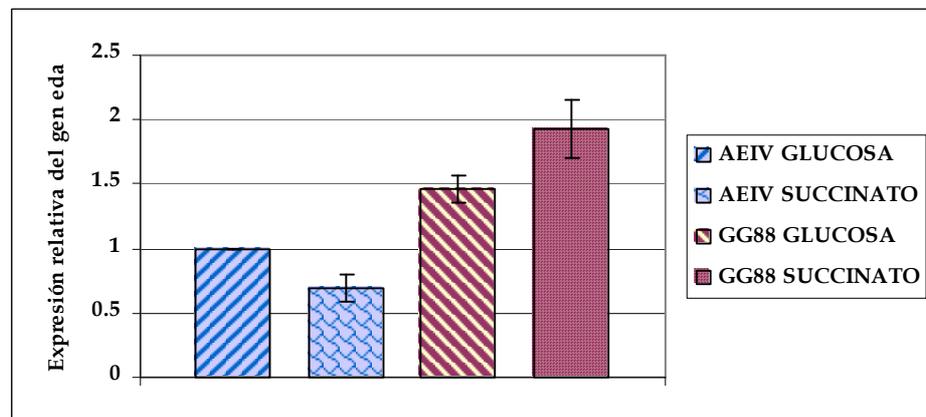


Figura 23: Expresión relativa del gen *eda* en las cepas AEIV y GG88 a 24 horas de crecimiento en medio mínimo Burk adicionado con glucosa o succinato como fuente de carbono

A pesar de que otro dato importante para elucidar la función de represión de HexR1 se obtendría a partir de conocer la expresión del gen *zwf1* bajo las mismas

condiciones de inducción-represión, la técnica de cuantificación de RNA mensajero mediante RT-PCR en tiempo real es inútil en este caso: anteriormente se mencionó que el genoma de *A. vinelandii* contiene cuatro parálogos del gen *zwf*, tres de los cuales presentan un porcentaje de identidad del 99% (uno de ellos es el gen *zwf1*), lo que impide la posibilidad de rastrear la expresión de *zwf1* a partir de oligonucleótidos específicos que sólo funcionen para ese gen. La única alternativa es la construcción de fusiones transcripcionales usando genes reporteros que permitan monitorear únicamente la actividad del gen *zwf1* tanto en la cepa silvestre como en la mutante GG88 en diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, sabemos que los genes *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* constituyen una sola unidad transcripcional; por lo tanto, a partir de los datos obtenidos se puede afirmar que en *A. vinelandii*, la vía ED se induce o reprime dependiendo de la fuente de carbono que se metabolice, y que HexR1 también funciona como un represor de la vía ED.

6.7 Cuantificación de la Actividad enzimática de Zwf

Para determinar el grado de activación de las enzimas que participan en la vía ED, se realizaron ensayos para medir la actividad enzimática de Zwf.

Los ensayos se realizaron en medio mínimo Burk usando glucosa y/o succinato como fuente de carbono. Las células fueron crecidas a 30°C durante 8, 24 y 30 horas, para después ser recuperadas y sonicadas. Una vez obtenido el extracto celular crudo, se procedió a medir la formación de NADPH a partir de NADP, registrando los cambios en la absorbancia a 340 nm en las mezclas de reacción, y la actividad fue expresada como unidades internacionales (UI) (nanomoles de NADPH formados en un minuto).

Los resultados del ensayo (Fig. 24) muestran que existe un aumento de casi dos veces en la actividad de Zwf en la cepa mutante GG88 en comparación con la cepa silvestre cuando se suministra glucosa como fuente de carbono, y este aumento se mantiene ya sea a las 8 o a las 24 horas de crecimiento. A pesar de que la glucosa es

una hexosa que se metaboliza directamente mediante la vía ED, los valores en la actividad de Zwf parecen indicar que la mutación en *hexR* impacta en una mayor actividad de la vía ED, o al menos, de esta enzima.

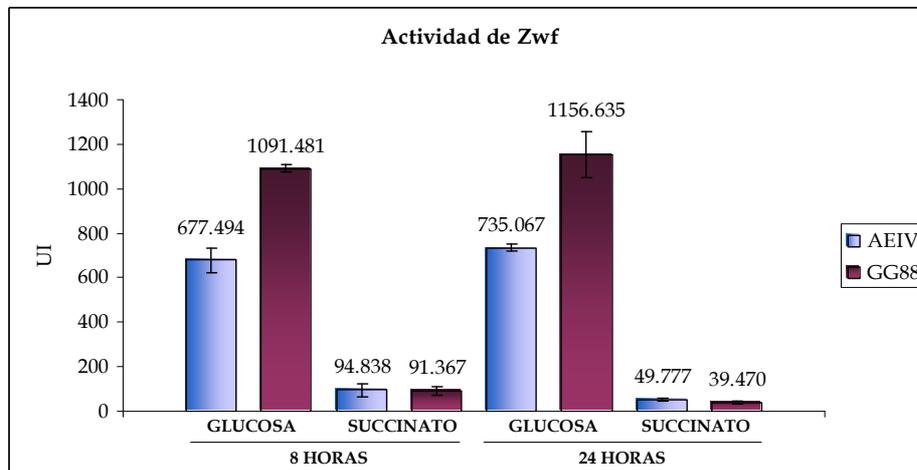


Figura 24: Actividad de la enzima Zwf en las cepas AEIV y GG88 a 8 y 24 horas de crecimiento en medio mínimo Burk adicionado con glucosa o succinato como fuente de carbono

Por otro lado, la actividad de Zwf decae cuando la fuente de carbono es succinato, lo cual es lógico en condiciones silvestres, puesto que la vía ED no necesita estar funcionando completamente para metabolizar ácidos tricarbónicos; sin embargo, y contrario a lo esperado, la actividad de Zwf también decae en la mutante GG88. Este fue un dato sorprendente, puesto que, de acuerdo con los ensayos de RT-PCR en tiempo real, la vía ED está aparentemente desreprimida cuando el gen *hexR1* se encuentra inactivado, lo que tendría que reflejarse en un aumento en la actividad de la primera enzima de la vía, comparado con la condición silvestre. La importancia de construir fusiones transcripcionales que permitan indagar cómo se encuentra la expresión del gen *zwf1* en el fondo silvestre y mutante *hexR1* se hace evidente ante estos resultados.

Resulta de especial importancia el estudio de la producción de alginato en *P. aeruginosa*, sobre todo en cepas de aislados clínicos provenientes de pacientes enfermos de fibrosis quística (FQ), ya que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista

y el alginato que produce es un factor de virulencia que contribuye al establecimiento de infecciones pulmonares crónicas en pacientes con dicha enfermedad. La producción de alginato es un proceso energéticamente costoso, en el cual los flujos de carbono tienen que ser dirigidos no sólo a producción de biomasa, sino también a la producción de precursores para la síntesis de dicho metabolito secundario, lo cual, de algún modo significa que *P. aeruginosa* aislada de pacientes con FQ requiere de la producción *in vivo* de alginato. A este respecto, hay un reporte en el que se estudia la relación entre la producción elevada de alginato en cepas provenientes de aislados clínicos y la actividad de Zwf, como un modo de establecer la conexión que existe entre el metabolismo de carbono primario y secundario. Interesantemente, ellos encuentran que, en comparación con el fondo silvestre PAO1 (una cepa no mucoide), la cepa FRD1 (una cepa aislada de FQ, altamente mucoide) presenta una actividad enzimática de Zwf casi 75% mayor, y esto es común en otras cepas altamente mucoides provenientes de otros aislados clínicos, donde la actividad de Zwf está altamente aumentada; por el contrario, una mutación en el gen *zwf* de estas cepas clínicas conlleva a una reducción de aproximadamente 90% en la producción de alginato: esto permitiría explicar que, en las cepas clínicas sobreproductoras de alginato, los altos niveles de actividad de Zwf provean de cantidades suficientes de precursores para la biosíntesis de alginato (Silo-Suh *et al.*, 2005). Como se recordará, las Figuras 20 y 21 muestran los resultados de los ensayos de expresión de *eda1* y *edd2* tanto en la cepa AEIV como en la mutante GG88; si se observan los resultados obtenidos en glucosa, se podrá apreciar que en la mutante GG88 existe un aumento de expresión en el gen *eda* si se compara con la cepa silvestre. Es posible que este aumento de expresión (y a su vez del operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap*) se refleje en la mayor actividad enzimática de Zwf y, por tanto, en una mayor producción de alginato; no obstante, sería de interés sobreexpresar el gen *zwf1* en el fondo genético de la cepa AEIV y ver si con ésta sobreexpresión aumenta la actividad de la enzima y cambie su fenotipo a uno sobreproductor de alginato.

A pesar de que la cuantificación de RNA mensajero por RT-PCR en tiempo real es una poderosa herramienta que nos permite conocer la expresión de un gen determinado bajo ciertas condiciones, esto no indica necesariamente que dicho mensajero esté siendo en realidad traducido y que constituya una proteína funcional, en este caso, una enzima. El metabolismo de carbono es una delicada red de funciones tan estrechamente relacionadas entre sí que resultaría muy simplista pensar que un solo regulador estuviera a cargo de la regulación de una vía metabólica primaria y que la regulación se esté llevando a cabo a un solo nivel (es decir, sólo a nivel transcripcional). En este sentido, los resultados de expresión de *eda1* no correlacionan con la actividad enzimática de Zwf en succinato como fuente de carbono. Se sabe que, tanto en *P. aeruginosa* como en *A. vinelandii*, existen fuentes de carbono preferenciales, como ácidos orgánicos o intermediarios del TCA (como el succinato), y que las hexosas o ácidos inorgánicos como el glicerol son fuentes de carbono no preferidas. Este control de catabolismo por carbono se encuentra regulado en *Pseudomonas* por una proteína denominada Crc, la cual es un regulador traduccional clave que jerarquiza la inducción de varias vías catabólicas para aminoácidos, azúcares, compuestos hidrocarbonados y aromáticos (Moreno *et al.*, 2009). Crc inhibe la traducción de sus mRNA blanco de regulación uniéndose al extremo 5', específicamente a una secuencia AACAAACA no apareada que puede estar localizada ya sea cercana al codón de inicio o al Shine-Dalgarno, siendo esta unión suficientemente estable para prevenir la formación del complejo de inicio de la traducción; por otra parte el gen *crcZ* codifica para un RNA pequeño que contiene 5 motivos AACAAACA: éste RNA tiene la capacidad de secuestrar a la proteína Crc con alta afinidad, titulándola y permitiendo la traducción de los mRNA antes reprimidos (Sonnleitner *et al.* 2009). Debido a la gran cercanía filogenética que existe entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* no sería sorprendente que exista un homólogo de Crc en nuestra bacteria de estudio. Análisis *in silico* del genoma de *A. vinelandii* revelan que existe un ortólogo de *crcZ* así como un ortólogo de *crc*, por lo que suponemos que existe un sistema de regulación

homólogo que puede estar involucrado en la regulación de los transcritos de los genes de la vía ED, en particular de *zwf1*, *eda1* y *edd2* a nivel post-transcripcional, lo cual podría explicar la aparente incongruencia entre los datos obtenidos mediante RT-PCR y los valores de actividad enzimática.

Si bien es cierto que existen cuatro parálogos del gen *zwf* y que existe un muy alto porcentaje de identidad entre ellos, aun no se ha comprobado que todos ellos realmente se expresen y codifiquen para productos funcionales, por lo cual no se puede saber si el aumento de actividad registrado en glucosa se deba a un efecto de sinergia entre los parálogos. En *P. putida*, por ejemplo, se observa un fenómeno similar de reiteración génica, ya que su genoma contiene tres parálogos de *zwf*, de los cuales sólo uno se expresa, el gen *zwf1*; del mismo modo, resulta interesante mencionar que, además de ser un gen de metabolismo central, *zwf1* también se expresa bajo condiciones de estrés oxidativo, y que mutantes en el gen *hexR* son más tolerantes a estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2008). Cabe recordar que *A. vinelandii* puede fijar nitrógeno en presencia de oxígeno y que necesita proteger a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno: es posible que, de alguna manera, el metabolismo de glucosa esté provocando un estrés oxidativo importante, que conlleve a una mayor actividad de Zwf y que le permita contender contra dicho estrés y seguir fijando nitrógeno en condiciones aeróbicas.

6.8 Cuantificación de la actividad enzimática Edd-Eda

En cuanto a la actividad enzimática de Edd-Eda, las condiciones usadas fueron las mismas que en el ensayo de medición de Zwf, usando las mismas fuentes de carbono y registrando la actividad a las 8 y 24 horas de crecimiento. Los resultados se muestran en la Figura 26.

Si bien en condiciones silvestres la actividad de Edd-Eda en presencia de succinato como fuente de carbono decae en comparación con los valores obtenidos en glucosa a las 8 horas de crecimiento, esta disminución no es evidente a las 24

horas. Además, tal como ocurre con Zwf, la actividad de estas enzimas en el fondo genético de la mutante GG88 no refleja los datos arrojados por RT-PCR en tiempo real, en donde, se recordará, se obtuvo un aumento significativo en la expresión de los genes *edd* y *eda*, tanto en glucosa como en succinato.

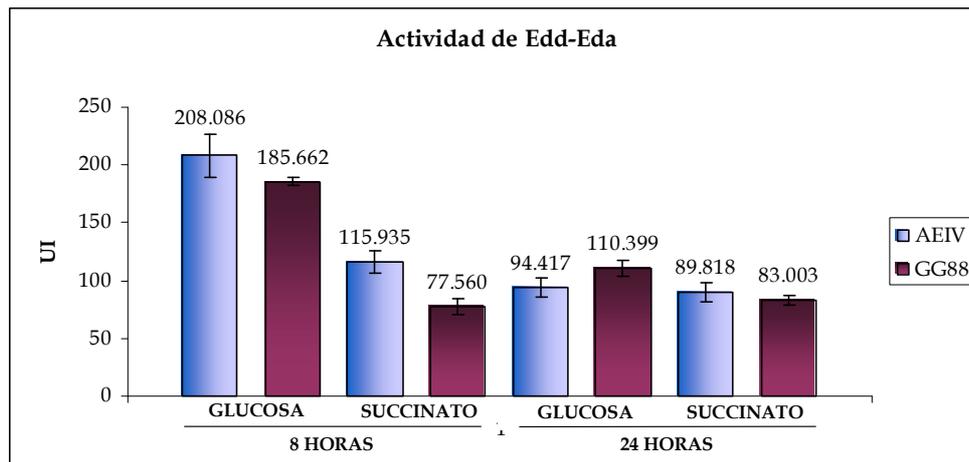


Figura 26: Actividad de las enzimas Edd-Eda en las cepas AEIV y GG88 a 8 y 24 horas de crecimiento en medio mínimo Burk adicionado con glucosa o succinato como fuente de carbono

Previamente se mencionó en los antecedentes que la enzima Eda no sólo participa en el metabolismo central de carbono como parte de la vía ED, sino que también participa en la degradación del KHG, lo cual tiene un papel en la regulación del TCA y en el ciclo del glioxilato (Murray y Conway, 2005). En *E. coli* el gen *eda* está sujeto a una rigurosa regulación, que involucra diversos reguladores, como GntR, KdgR y CsrA. Esta última proteína pertenece al sistema de regulación post-transcripcional CsrA/CsrB (cuyo sistema ortólogo en *A. vinelandii* es RsmA/RsmB), el cual es un regulador global que controla una gran variedad de genes, incluyendo algunos que codifican para enzimas de metabolismo central de carbono. Muy probablemente la regulación de Eda en *A. vinelandii* sea igual de compleja que en *E. coli*, pues considerando su intervención en diversos aspectos metabólicos, no sería sorprendente que estuviera bajo la regulación de más de una proteína reguladora.

En un análisis *in silico* preliminar hecho en nuestro grupo de trabajo (Hernández, 2010), el gen *eda1* posee los sitios putativos de unión a Crc, el regulador post-transcripcional que pertenece al sistema de regulación Crc/CrcZ y que anteriormente se ha mencionado. Estos sitios de unión a la proteína Crc sugieren fuertemente que este sistema está involucrado en la regulación de los transcritos de los genes de la vía ED a nivel post-transcripcional, lo cual, tal como en el caso de *Zwf*, puede explicar la aparente incongruencia entre los datos obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real y los valores de actividad enzimática. Resulta de gran interés comenzar el estudio de este sistema de regulación post-transcripcional, para conocer cómo se encuentra la regulación por represión catabólica en el metabolismo central de carbono de *A. vinelandii*.

6.9 Expresión de los genes de la biosíntesis de alginato

Un objetivo a cumplir dentro del presente trabajo era evaluar el efecto de HexR1 sobre el grado de transcripción de los genes *alg*, con el fin de explorar la posibilidad de que este regulador estuviera ejerciendo su control de manera directa sobre los genes de la biosíntesis de alginato. Es por esto que se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para conocer cómo se encuentra la expresión de los genes involucrados en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*, tanto en la cepa silvestre como en la mutante GG88.

Los resultados de la Figura 27 nos muestran que la expresión de los genes *algD* y *algC* aumenta más de dos veces en el fondo genético de la mutante GG88, comparada con la cepa silvestre AEIV, cuando se adiciona glucosa al medio de cultivo como fuente de carbono. Estos resultados concuerdan con datos obtenidos anteriormente en el grupo de trabajo, ya que Núñez (2008) realizó, previo al presente trabajo, una cinética de transcripción del gen *algD*, en donde, a partir de una fusión transcripcional *algD::lacZ*, pudo comprobar que la transcripción de la cepa GG88 aumenta alrededor de dos veces cuando se le compara con la AEIV

(datos no publicados) (Fig. 28). Podemos decir, además, que los datos obtenidos coinciden con los de producción de alginato en glucosa: en la Figura 21 se aprecia que los valores de producción de alginato de la mutante GG88 son de dos veces los producidos por la cepa AEIV.

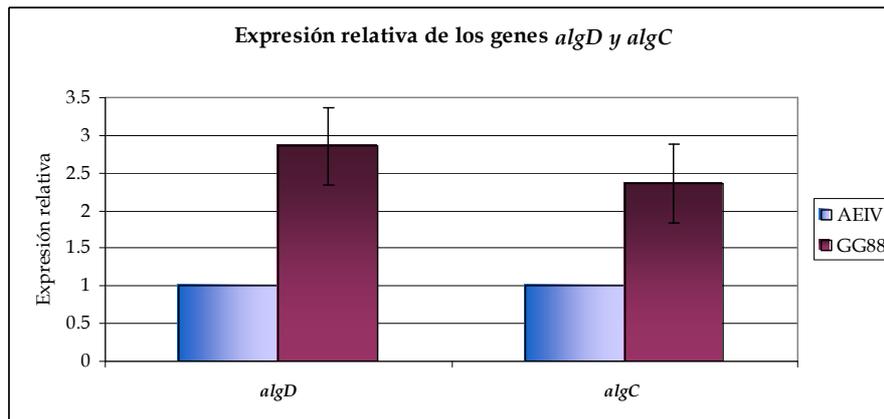


Figura 27: Expresión relativa de los genes *algD* y *algC* a 24 horas de crecimiento en medio mínimo Burk adicionado con glucosa como fuente de carbono

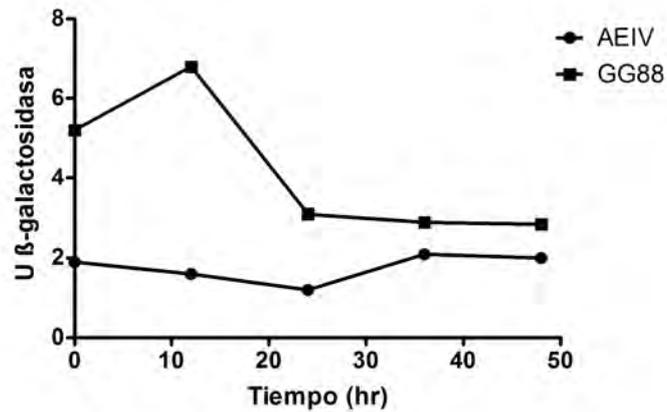


Figura 28: Cinética de la transcripción del gen *algD* en las cepas AEIV y GG88 (Núñez, datos no publicados)

Es pertinente aclarar que los ensayos de RT-PCR en tiempo real de los genes de alginato también se realizaron en otros genes que participan en la ruta biosintética, de manera particular *alg8*, *algG* y *algA*; sin embargo, los resultados mostraron mucha variabilidad, lo cual afectaba los parámetros estadísticos de confianza, aunque todos ellos mostraban una tendencia al aumento de expresión en la mutante GG88 comparada con la cepa silvestre AEIV. Si bien es cierto que hay más genes involucrados en la síntesis de alginato, los genes *algD* y *algC* son muy importantes en la ruta biosintética pues participan directamente en la generación del monómero del alginato, por lo cual son un buen indicador de lo que ocurre con dicha ruta en ambos fondos genéticos.

Hasta este punto, el aumento de expresión apreciado, unido al aumento de biosíntesis de alginato y a los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, indican que es poco factible que HexR1 de *A. vinelandii* sea un represor directo de los genes de alginato; un dato que proporcionaría mayor contundencia sería demostrar que los genes de biosíntesis de alginato no poseen sitios de unión a HexR1, por lo que no estarían bajo su regulación.

6.10 Búsqueda *in silico* de los blancos de regulación de HexR1

En el apartado de Antecedentes se ha comentado que HexR se une a la región promotora de *zwf*, *gap*, y *edd* en *P. putida*, y que a partir de ensayos tipo *footprinting* fue posible conocer la secuencia consenso de reconocimiento de HexR sobre sus genes blanco (Fig. 7), la cual es una secuencia invertida repetida común (Daddaoua *et al.*, 2009). Haciendo uso de esta referencia, se comenzó a explorar la posibilidad de usar las secuencias de los genes blanco de regulación de HexR en *P. putida* (*zwf*, *gap*, y *edd*) para realizar un análisis MEME, un tipo especial de alineamiento que nos permitiera localizar el motivo de unión de HexR para después producir una matriz de búsqueda de motivos similares dentro del genoma de *P. putida*. Una vez obtenida ésta matriz, se usó para compararla ahora con las secuencias promotoras

de los genes de *zwf1* (el cual sabemos experimentalmente que está sometido a la regulación de HexR1) y *pgl1* (que no pertenece al locus *hexR1* pero que se encuentra río abajo del gen *hexR2*) de *A. vinelandii* para hacer un nuevo MEME que pudiera refinar el alineamiento y crear una segunda matriz (Fig. 29).

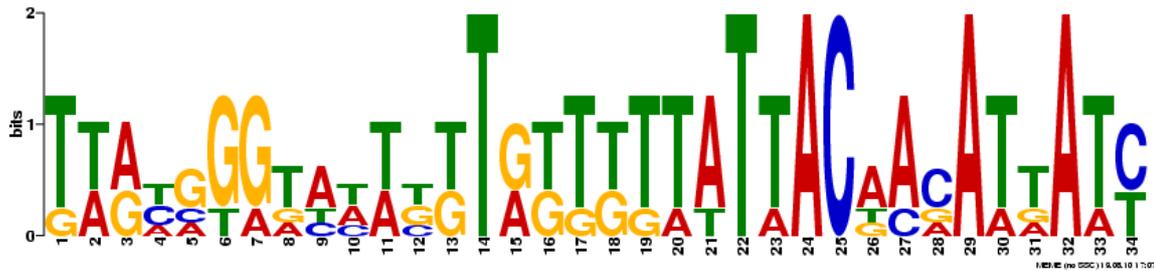


Figura 29: Segundo motivo de unión generado mediante MEME a partir de la primer matriz de *P. putida* y los genes de *A. vinelandii*.

La segunda matriz creada generó un motivo de unión mucho más confiable que el primero, así que se utilizó para hacer un nuevo análisis conocido como MAST: a partir de las secuencias intergénicas del genoma de *A. vinelandii* el análisis MAST funciona como una herramienta de búsqueda que permitió encontrar dicho motivo y recabar información acerca de los sitios de unión en otros posibles genes blanco de regulación en nuestro modelo de estudio. Se comprobó que las únicas secuencias intergénicas que presentan esta secuencia de unión son aquellas río arriba de genes de la vía ED, particularmente la región promotora de *zwf1* (la cual se usó para la construcción de la segunda matriz, lo que proporciona un indicador de confiabilidad en la matriz construida) y de manera interesante, también las regiones promotoras que comprenden los genes *zwf2* (Avin17630) y *pgl1* (Avin15710) (Fig. 30) ésta última, río abajo del gen *hexR2*. Si se observa la Figura 9, el cladograma muestra que las proteínas HexR1 y HexR2 de *A. vinelandii* están sumamente conservadas, puesto que el alineamiento realizado entre ellas arroja un 82% de identidad y, por lo tanto, no sería sorprendente que ambas reconocieran el mismo sitio de unión o uno altamente similar; es por ello que se desconoce si el

hallazgo del motivo de unión a HexR1 en la región promotora de *pgl1* sea resultado de una verdadera regulación de dicha proteína o si esto signifique que sea HexR2 quien se una a ésta secuencia promotora: una vez más se vuelve preciso conocer si *hexR2* se expresa y codifica para una proteína funcional, y si ésta también regula (y bajo qué condiciones) los genes de la vía ED. Por otro lado, la presencia de *zwf2* dentro de los posibles blancos de regulación de HexR1 también resulta llamativa por un par de aspectos: el primero de ellos es que, tal como lo muestra la Figura 30, el gen se encuentra contenido en un *locus* que incluye a *pfkB*, el cual es un gen de glucólisis que no pertenece a la vía ED; como se citó en la sección de Antecedentes, éste gen es 41% idéntico a la 6-fosfofructocinasa II de *E. coli*, mas no se ha comprobado que sea funcional, ni que este grupo de genes se transcriba como una sola unidad. El segundo aspecto es el hecho de que un parálogo de *zwf1* también esté siendo aparentemente regulado, lo que conlleva a plantearnos nuevamente la interrogante de cuál o cuáles de los parálogos de *zwf* están expresándose, bajo qué condiciones y si también responden a la regulación por HexR1.

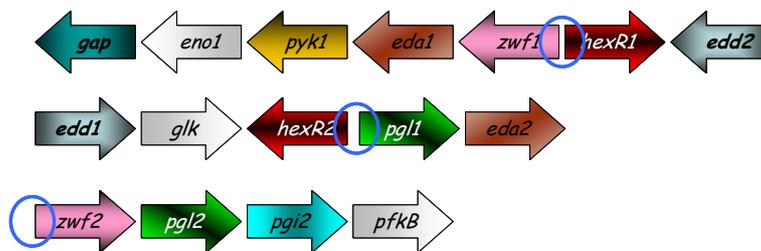


Figura 30: Genes que presentan motivos de unión a HexR1 a partir del análisis tipo MAST. Los círculos azules representan las regiones en las que fue ubicado el sitio de unión a HexR1.

6.11 Comentarios finales

El objetivo de este trabajo se centró en caracterizar al regulador HexR1, en la vía ED y en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. Gracias a los antecedentes

existentes en el género *Pseudomonas*, y al proyecto de secuenciación del genoma de *A. vinelandii*, se pudo abarcar el estudio de dicho regulador a partir de diversos enfoques: desde los análisis *in silico* que permitieron conocer tanto la organización transcripcional del locus *hexR1* como su posible estructura tridimensional, hasta dilucidar su participación como un regulador transcripcional de los genes de la vía ED y como esto se relaciona con la biosíntesis de alginato.

Los resultados obtenidos en el transcurso de este proyecto permiten afirmar que HexR1 es un regulador transcripcional de los genes *edd1* y del operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap1*. Sin duda, los análisis *in silico* son una herramienta de suma utilidad para complementar resultados obtenidos experimentalmente, y en este sentido, vale la pena resaltar dos hechos: el primero de ellos fue el análisis de la organización transcripcional del locus *hexR1*; los resultados obtenidos fueron muy importantes para poder concluir el papel que HexR1 juega en la regulación de la vía ED, pues pudo demostrarse que los genes *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap1* forman una sola unidad transcripcional.

Siguiendo con lo anterior, el segundo hecho a considerar es el estudio de los blancos de regulación de HexR1 a partir de herramientas bioinformáticas. La principal razón de realizar el análisis computacional fue para dejar de lado la posibilidad de que el aumento en la síntesis de alginato en la mutante GG88 se debiera a una regulación directa de HexR1 sobre los genes biosintéticos de alginato, lo cual se pensaba, era poco probable. Tal como se supuso en un principio, el análisis MAST no arrojó otros genes blanco de regulación que no fueran los anteriormente discutidos, lo cual nos da la pauta de que el aumento en la síntesis de alginato y en la transcripción de los genes *algD* y *algC* en la mutante GG88 se debe, de manera indirecta, al aumento en la actividad de la vía ED.

El catabolismo de carbono y la producción de alginato son procesos tan íntimamente relacionados que defectos en el catabolismo tienen efectos evidentes sobre la producción de alginato, ya sea positiva o negativamente. Como se recordará, anteriormente se discutió la importancia de la producción de alginato en

cepas patógenas oportunistas de *P. aeruginosa*, ya que aquellas cepas que fueron aisladas de pacientes con FQ tienen una desregulación en *zwf*, lo que conlleva a un aumento de actividad de dicha enzima y a un fenotipo de hipermucoidía. De alguna manera, éste fenómeno nos ayuda a explicar lo que ocurre en nuestro modelo de estudio, ya que correlaciona con los resultados obtenidos en este proyecto: la propuesta es que, en una mutante en *hexR1*, la vía ED está desregulada, lo que provoca el aumento en la actividad de la vía ED; éste aumento de actividad propicia la canalización del flujo de carbono hacia la poza de triosas-fosfato y síntesis de fructosa, e indirectamente, hacia biosíntesis de alginato, con el consecuente aumento del biopolímero, al menos en glucosa como fuente de carbono; lo anterior puede afirmarse al observar los niveles de actividad enzimática de Zwf y la expresión relativa de los genes *edd2* y *eda1*.

En fuentes de carbono gluconeogénicas, como en el caso del succinato, también puede apreciarse un claro aumento en la expresión de los genes de la vía ED en la mutante GG88, lo que confirma la hipótesis de que HexR1 es un regulador transcripcional negativo de ésta vía. Sin embargo, y sobre todo en ésta fuente de carbono, los datos de actividad enzimática no correlacionan con el aumento en la expresión, debido muy posiblemente, a la presencia de reguladores a nivel post-transcripcional, como es el caso del sistema Crc/CrcZ. Por otro lado, en presencia de glucosa, la actividad de la primera enzima de la vía ED, la Zwf, sí es claramente desregulada, sugiriendo un papel clave de ésta reacción bioquímica en la síntesis de alginato.

7. CONCLUSIONES

1. El fenotipo de producción elevada de alginato en la mutante GG88 se debe a la mutación en *hexR1* y no a efectos de polaridad de la mutación
2. HexR1 es un represor del operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* y del gen *edd2*.
3. El incremento de dos veces en la transcripción del operón *zwf1-eda1-pykA1-eno1-gap* en la mutante GG88 correlaciona con un aumento en la actividad de Zwf mas no en la actividad de las enzimas Edd-Eda lo cual sugiere la existencia de una regulación post-transcripcional, probablemente mediada por la proteína Crc.
4. Los genes de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* no presentan sitios putativos de unión a HexR1, por lo que, muy posiblemente, no son blancos de regulación directa de dicha proteína.
5. El aumento en la producción de alginato en una mutante en *hexR1* se debe a un incremento en la transcripción de los genes *algD* y *algC* lo que a su vez, muy probablemente, sea debido a una desrepresión de la vía ED provocada por el aumento en la actividad Zwf y una mayor acumulación del precursor fructosa 6-fosfato.

8. PERSPECTIVAS

1. Sobreexpresar el gen *zwf1* en el fondo genético de la cepa AEIV para investigar si una mayor expresión de *zwf1* resulta en una mayor producción de alginato.
2. Investigar si la proteína HexR2 es funcional mediante la construcción de una mutante *hexR2*, y la doble mutante *hexR1, hexR2* evaluando su efecto en la síntesis de alginato y en las actividades de la vía ED.
3. Conocer el sitio de inicio de la transcripción tanto de *hexR1* como de *zwf1*.
4. Realizar ensayos de retardo para confirmar la interacción de la proteína HexR1 con sus blancos de regulación.
5. Investigar cuales parálogos de Zwf son funcionales y bajo qué condiciones.
6. Iniciar el estudio del sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., Croughan, T.P. 1995. New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1053-1055.

Allenza, P., Lessie, T. G. 1982. *Pseudomonas cepacia* mutants blocked in the Entner-Doudoroff pathway. *J. Bacteriol.* **150**:1340-1347.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**:403-410

Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**:195-201.

Bailey, T., Elkan, C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California.

Bailey, T., Gribskov, M. 1998. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics.* **14**:48-54.

Barry, T., Geary, S., Hannify, S., MacGearailt, C., Shalloo, M., Heery, D., Gannon, F., Powell, R. 1992. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4940.

Beale, J. M., Jr., Foster, J. L. 1996. Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry.* **35**: 4492-4501.

Bergey, D.H., Garrity, G.M., Boone, D.R., Castenholz, R.W., Brenner, D.J. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York. Ed. Springer. Pp 384-402.

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., J. Guzmán, S. Moreno and G. Espín. 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **182**:2624-2628.

Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Núñez and G. Espín. 2001. The global regulators GacA and σ^s form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **183**:6787-6793.

Clementi, F. 1997. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. Crit. Rev. Biotech. **17**: 327-361.

Conway, T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol. Rev. **9**: 1-27.

Daddaoua, A., Krell, T., Ramos, J.L. 2009. Regulation of Glucose Metabolism in *Pseudomonas*. J. Biol. Chem. **284**: 21360-21368.

del Castillo, T., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J., Fuhrer, T., Sauer, U., Duque, E. 2007. Convergent Peripheral Pathways Catalyze Initial Glucose Catabolism in *Pseudomonas putida*: Genomic and Flux Analysis. J. Bacteriol. **189**: 5142-5152.

del Castillo, T., E. Duque, J. L. Ramos. 2008. A Set of Activators and Repressors Control Peripheral Glucose Pathways in *Pseudomonas putida* To Yield a Common Central Intermediate. J. Bacteriol. **190**: 2331-2339.

Espín, G. 2003. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Microbios en línea. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Figurski, D.H., Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid pRK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 1648-1652.

Finn, R. D., J. Tate, J. Mistry, P. C. Coghill, S. J. Sammut, H. R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer, and A. Bateman. 2008. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. **36**:D281-D288.

Gacesa P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis recent progress and future prospects. Microbiol. **144**: 1133-1143.

Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.* 6, 7.

Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. S., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. 2004. Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**: 199-206.

García, V. 2010. Estudio de la organización transcripcional del locus *hexR1* de la vía Entner-Doudoroff en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Guzmán, P. 2001. Caracterización molecular de mutantes de *Azotobacter vinelandii* sobreproductoras de alginato. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Hager, P. W., Calfee, M. W., Phibbs, P. V. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* *devB/SOL* homolog, *pgl*, is a member of the hex regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase. *J. Bacteriol.* **182**: 3934-3941.

Hernández, A. 2010. Función de la cinasa histidínica CbrA en la fisiología de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Horan, N.J., Jarman, T.R., Dawes, E.A. 1981. Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 185-191.

Jaeger, T., Mayer, C. 2008. The transcriptional factors MurA and catabolite activator protein regulate N-acetylmuramic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:6598-6608.

Kim, J., Jeon, C. O., Park, W. 2008. Dual regulation of *zwf-1* by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. *Microbiology.* **154**: 3905-3916.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., Peterson, K.M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. **166**: 175-176.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**:2947-2948.

Larsen, B., Haug, A. 1971. Biosynthesis of alginate. I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydr Res* **17**:287-296.

Lessie, T.G., Vander Wyk, J.C. 1972. Multiple Forms of *Pseudomonas multivorans* Glucose-6-Phosphate and 6-Phosphogluconate Dehydrogenases: Differences in Size, Pyridine Nucleotide Specificity, and Susceptibility to Inhibition by Adenosine 5'-Triphosphate. *J. Bacteriol.* **110**: 1107-1117.

Linker, A., Jones, R.S. 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism. *Nature*. **204**: 187-188.

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

Manzo, J., Cocotl, M., Sanchez, E., Velazquez, C., Montes, L.A., Goiz, Y., Carreño, R., Fuentes, L.E., Nuñez, C., Segura, D., Espin, G., Castañeda, M. 2009. The GacS/A-RsmA/B signal transduction pathway, involved in alginate production, controls the *algD* gene expression in *Azotobacter vinelandii*. En preparación.

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

McHugh, D.J. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. *FAO Circular de Pesca*. No. 968. Roma, FAO. 2002. 30p.

- Mejía-Ruíz, H. J., Guzmán, S., Moreno, G., Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1997. The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*- independent promoter. *Gene*. **199**:271-277.
- Moreno, S., Nájera, R., Guzmán, J., Soberón-Chávez, G., Espín, G.** 1998. Role of alternative sigma factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**: 2766-2769.
- Moreno R, Martínez-Gomariz M, Yuste L, Gil C, Rojo F.** 2009. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics*. Jun; 9(11):2910-28
- Mortenson, L. E., Hamilton, P. Wilson, P. W.** 1955. Dissimilation of 6-phosphogluconate by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Acta.* **16**: 238-244.
- Murray, E.L., Conway, T.** 2005. Multiple Regulators Control Expression of the Entner-Doudoroff aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **187**: 991-1000.
- Narbad, A., Hewlins, M. J., Gacesa, P., Russell, N. J.** 1990. The use of ¹³C-n.m.r. spectroscopy to monitor alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J.* **267**: 579-584
- Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G., Soberón-Chávez, G.** 2000. Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J. Bacteriol.* **182**: 2624-2628.
- Page, W.J., Sadoff, H.L.** 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**: 145-151.
- Pindar, D. F., C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**:617-622.
- Portais J.C., A.M. Delort.** 2002. Carbohydrate cycling in micro-organism: what can C-NMR tell us? *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:375-402.
- Remminghorst, U., Rehm, B. H.** 2006. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.* **28**: 1701-1712.

Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386

Sabra W., A. P. Zeng, W. D. Deckwer. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:315-25.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.

Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, O'Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin SL, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wallin E, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R, Wood D. 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol.* **191**: 4534-4545.

Silo-Suh, L., Suh, SJ., Phibbs, PV., Ohman, DE. 2005. Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the Cystic Fibrosis Lung Environment Can Include Dereglulation of *zwf*, Encoding Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *J Bacteriol.* **187**: 7561-7568.

Sonnleitner, E., Abdou, L., Haas, D. 2009. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci.* **106**: 21866-21871.

Temple, L., Cuskey, S. M., Perkins, R. E., Bass, R. C., Morales, N. M., Christie, G. E., Olsen, R. H., Phibbs, P. V. 1990. Analysis of Cloned Structural and Regulatory Genes for Carbohydrate Utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol.* **172**: 6396-6402.

Vázquez, A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado, G. Espín. 1999. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algX* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* **232**:217-222.