



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

**Estudio de la posible función del sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii***

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

Q.F.B. Elva Yadira Quiroz Rocha

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López  
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

DIEMBRE DE 2012



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.

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>5</b>
2.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	5
2.2 Alginato	5
2.2.1 Composición y aplicaciones.	5
2.3 Biosíntesis.	6
2.4 Genética de la biosíntesis.	8
2.5 Regulación de la biosíntesis.	9
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
3.1 Sistema de dos componentes CbrA/CbrB.	10
3.2 El sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ-CrcY en <i>Pseudomonas</i> .	12
3.3 En <i>A. vinelandii</i> la síntesis de alginato se eleva en una mutante <i>cbrA::Tn5</i> .	15
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos Particulares	19
<b>6. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>20</b>
6.1 Material biológico	20
6.2 Medios y condiciones de cultivo.	22
6.3 Manipulación de ácidos nucleicos.	23
6.4 Extracción de DNA cromosomal.	25
6.5 Extracción de RNA total.	25
6.6 Cuantificación de la expresión relativa mediante qRT-PCR.	26
6.7 Ensayo de extensión del iniciador.	26
6.8 Construcción del plásmido pJETcrc:Km.	27
6.9 Construcción del plásmido pEY04 ( <i>crcZ::Gm</i> ).	27
6.10 Construcción del plasmido pEY02 (pCN154- <i>pcrcZ</i> ).	28
6.11 Construcción del plasmido pEY05 (pTOPO <i>scrX-pcrcZ-gusA-Tc</i> ).	28
6.12 Construcción de los plásmidos pJGEY1 y pJGEY2 (pMOSBLUE <i>cbrA::Sp</i> con inserción Polar y No polar).	29
6.13 Construcción de los plásmidos pSRK-Gus, pSRK- <i>crcZ</i> , pSRK- <i>crc</i> .	29

6.14 Cuantificación de Proteína y Alginato.	30
6.15 Cuantificación de la actividad de la enzima $\beta$ -Glucuronidasa.	31
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
7.1 El gen <i>crcZ</i> en <i>A. vinelandii</i> . Estudio de su regulación transcripcional.	32
7.1.1 Análisis del gen <i>crcZ</i> y de su región reguladora en <i>A. vinelandii</i> .	32
7.1.2 Ensayo de extensión del iniciador del gen <i>crcZ</i> .	34
7.2 Efecto del Sistema CbrA/CbrB sobre la transcripción del sRNA <i>crcZ</i> .	35
7.2.1 Construcción de mutantes <i>cbrA::Sp</i> polar y no polar.	36
7.2.2 Reconstrucción de la mutante <i>cbrA::Tn5</i> con el plásmido pGG15.	39
7.3 Construcción de una fusión transcripcional <i>pcrcZ-gusA</i> en el cromosoma de la cepa silvestre AEIV y en su derivada <i>cbrA::Sp</i> P.	41
7.4 Estudio del efecto de la Kinasa Histidínica CbrA sobre la transcripción del sRNA <i>CrcZ</i> .	42
7.5 El genoma de <i>A. vinelandii</i> posee un parálogo de <i>CrcZ</i> denominado <i>CrcX</i> .	43
7.6 Construcción de mutantes por inserción en los genes <i>crc</i> y <i>crcZ</i> para evaluar su efecto sobre la producción de alginato.	44
7.6.1 Construcción de la mutante en <i>crcZ</i> .	44
7.6.2 Construcción de la mutante en <i>crc</i> .	46
7.7 Sobreexpresión de los genes <i>crc</i> o <i>crcZ</i> y su efecto sobre la producción de alginato.	46
7.7.1 Expresión controlada en <i>trans</i> de <i>gusA</i> en el vector pSRK ( $Km^r$ ) en el fondo de la cepa AEIV.	47
7.7.2 Expresión de <i>CrcZ</i> en el vector pSRK ( $Km^r$ ) en el fondo de la mutante <i>cbrA::Sp</i> polar.	48
7.7.3 Sobreexpresión de <i>Crc</i> en el vector pSRK ( $Km^r$ ) en el fondo de la AEIV.	49
7.7.4 Expresión de <i>Crc</i> en el vector pBBRIMCS-2 ( $Km^r$ ) en el fondo de la AEIV.	51
7.8 Análisis del arreglo transcripcional y de la expresión del gen <i>cbrB</i> .	53
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>60</b>

## 1. RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una protobacteria gram negativa, de la subdivisión  $\gamma$ , la cual es capaz de producir metabolitos secundarios de uso industrial, como el polisacárido extracelular alginato, y el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). El Alginato es utilizado como viscosificante y gelificante a nivel industrial. En un banco de mutantes generadas al azar con un Tn5 se identificó una, llamada GG15, que mostró un incremento de 11 veces en la producción de alginato en comparación con la cepa silvestre. En esta mutante el Tn5 interrumpió el gen *cbrA*, el cual codifica una cinasa histidínica, paróloga de CbrA del sistema de dos componentes CbrA/CbrB en *Pseudomonas aeruginosa*. Recientemente se encontró que en *Pseudomonas spp* el sistema CbrA/CbrB es necesario para la transcripción del RNA pequeño (sRNA) CrcZ, el cual secuestra a la proteína de unión a mRNA Crc antagonizando su actividad. Este sistema de regulación post-transcripcional está involucrado en la asimilación jerárquica de fuentes de carbono. Basados en estos antecedentes el objetivo de este estudio fue investigar si en el mecanismo molecular del control negativo que CbrA ejerce sobre la producción de alginato está involucrado el sistema post-trascripcional Crc/CrcZ. La hipótesis propuesta fue que en ausencia de CbrA se abate la expresión de sRNA CrcZ lo que provoca un aumento en la actividad de la proteína Crc, la cual a su vez regula positivamente la síntesis de alginato. Mediante ensayos de extensión del iniciador y fusiones transcripcionales del promotor de *crcZ* con el gen reportero *gusA* pudimos establecer que la cinasa histidínica CbrA es necesaria para la expresión de CrcZ en *A. vinelandii*. Una de las primeras estrategias que abordamos para evaluar el efecto de Crc y de CrcZ sobre la síntesis de alginato fué tratar de construir mutantes en estos genes. Sin embargo no fue posible obtener estas mutantes lo que sugiere un papel esencial de estos dos genes en la fisiología de *A. vinelandii*. Como segunda estrategia sobre-expresamos estos genes en *trans* utilizando el plásmido pSRK-Km el cual se induce por IPTG y evaluamos su efecto en la síntesis de alginato. La sobre expresión de *crc* en la cepa silvestre no aumentó de manera significativa los niveles de alginato. Por otro lado la sobre-expresión de CrcZ en el fondo de la mutante *cbrA* no redujo la síntesis de alginato a niveles silvestres. Estos resultados indican que el sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ no participa en el control negativo que la cinasa histidínica CbrA ejerce sobre la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

## **2. INTRODUCCION**

### **2.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.**

*Azotobacter vinelandii* es una protobacteria gram negativa, de la subdivisión  $\gamma$  que pertenece a la familia *Azotobacteriaceae*; son pleomórficas (su morfología varía desde bacilos hasta cocos) de 2 a 5  $\mu$  de diámetro; habitan en suelos, se reproducen por fisión binaria y su locomoción es por flagelos. Son microorganismos quimiorganotróficos que metabolizan sales inorgánicas, alcoholes y azúcares para su crecimiento (Espin, 2003). Esta bacteria no posee plásmidos endógenos, pero puede recibir DNA exógeno mediante transformación o conjugación. *Azotobacter* fija nitrógeno en condiciones aerobias esto a pesar de la extrema sensibilidad de la nitrogenasa y posee mecanismos que protegen este complejo de la inactivación por oxígeno. Posee la habilidad de sufrir un proceso de diferenciación formando quistes metabólicamente inactivos, los cuales son resistentes a condiciones adversas (Espin, 2003; Sadoff, 1975). *A. vinelandii* produce metabolitos secundarios de uso industrial, como el polisacárido extracelular alginato, y el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) (Galindo et al., 2007).

*A. vinelandii* posee un genoma circular de 5.3 Mb, y la secuencia de la cepa AvOP ya se encuentra disponible ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Setubal et al., 2009). Tiene 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 de 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). 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, 2001; Setubal et al., 2009).

## **2.2 Alginato**

### **2.2.1 Composición y aplicaciones.**

Los alginatos son una familia de heteropolímeros lineales compuestos por monómeros de ácido manurónico (M) y su epímero el ácido gulurónico (G) los cuales están unidos por enlaces  $\beta(1-4)$ . La distribución y contenido de los monómeros puede ser muy variada. En presencia de  $Ca^{++}$  u otros iones divalentes,

los alginatos forman geles termo-resistentes. La variabilidad en la composición de los monómeros del alginato le confiere también variabilidad en la capacidad de gelificación: un alginato con alto contenido de ácido gulurónico genera geles rígidos, mientras que uno de bajo contenido produce geles suaves y elásticos (Espin, 2003; Rhem, 2008).

Una de las características por las que *A. vinelandii* ha sido objeto de estudios es su capacidad para producir el polisacárido extracelular alginato. Este polisacárido es utilizado como agente gelificante y viscosificante en industrias como la farmacéutica y la alimenticia. Recientemente se ha estudiado el uso de alginato como agente para realizar micro encapsulación de células para diferentes terapias, debido a que este material presenta grandes ventajas, como el de ser biocompatible, es decir, que no estimula la respuesta inmune; Además el alginato forma una membrana semipermeable que permite el paso de nutrientes y la salida de desechos, permitiendo que las células inmovilizadas continúen viables (Hernández et al., 2010). En la actualidad los alginatos utilizados en la industria, son extraídos de algas marinas cafés de los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*. La composición de los alginatos algales está sujeta a las variaciones del medio ambiente y a la edad de los tejidos de donde son extraídos, por lo cual la calidad de estos alginatos es también muy variable. Es por esta razón que la producción de alginatos de origen bacteriano de una composición definida y uniforme es una alternativa interesante. Los alginatos producidos por microorganismos, a diferencia de aquellos que son producidos por algas, están acetilados; además de que los alginatos bacterianos usualmente tienen un mayor peso molecular (variando de 48 a 160 kDa) (Cimini, 2012; Galindo et al., 2007; Rhem, 2008).

### **2.3 Biosíntesis.**

La ruta biosintética del alginato es similar en *Pseudomonas aeruginosa* y *A. vinelandii* y se ha descrito a detalle (Galindo et al., 2007) (Figura 1). En estas bacterias los azúcares de 6 carbonos son degradados por la vía Entner-Doudoroff cuyos productos finales son el piruvato y el gliceraldehído-3P. El piruvato es posteriormente catabolizado en acetil-CoA y el gliceraldehído-3P es convertido en fructosa-6P por el proceso de gluconeogénesis (Conway, 1992).

En *A. vinelandii*, el alginato se sintetiza a partir de fructosa-6-P, la cual es convertida por la fosfo-manosa-isomerasa (PMI), a manosa-6-P; esta a su vez se convierte en manosa-1-P por la fosfo-mano-mutasa (PMM) (Figura 1). El siguiente paso consiste en la activación de la manosa-1-P por la GDP-manosa-pirofosforilasa (GPMP) dando como resultado la formación de GDP-manosa, la cual es oxidada a ácido GDP-manurónico por la GDP-manosa-deshidrogenasa (GMD). El ácido GDP-manurónico es el sustrato que se polimeriza a nivel de la membrana interna para formar ácido polimanurónico. En el periplasma algunos de los residuos manurónicos del ácido polimanurónico son acetilados por una acetilasa (Galindo et al., 2007).

El polímero exportado en *A. vinelandii*, en contraste con *Pseudomonas*, es modificado por una familia de siete epimerasas extracelulares homólogas (AlgE 1 - 7); los residuos del ácido gulurónico en el alginato son importantes para la formación de la capa de alginato que circunda a los quistes. Se propone que las proteínas AlgG, AlgK, AlgX y AlgL forman un andamiaje que guía al polímero a través de periplasma para secretarlo fuera de la membrana (Remminghorst y Rehm, 2006). En *Pseudomonas*, el papel principal de AlgL es degradar los alginatos que no logran ser exportados (Bakkevig et al., 2005).

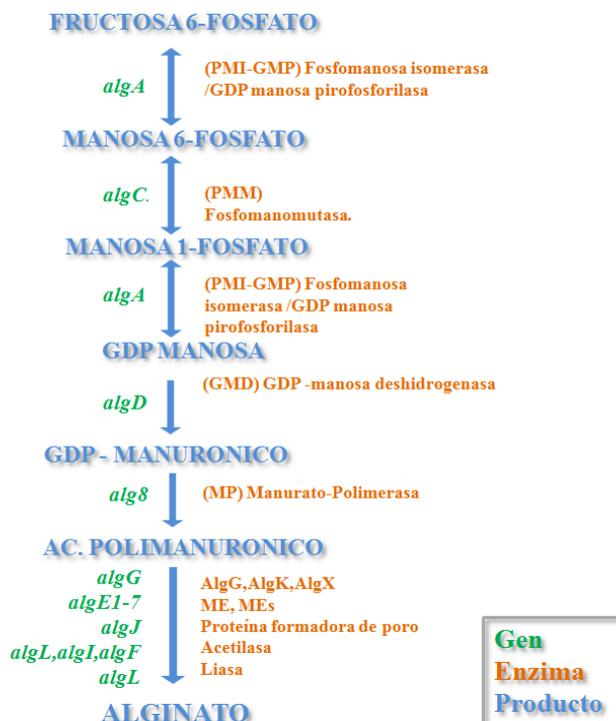


Figura 1. Pasos de la ruta de biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. (modificado de Galindo et al., 2007).

## 2.4 Genética de la biosíntesis.

Los genes estructurales para la síntesis de alginato han sido identificados en *A. vinelandii*. Excepto *algC* que codifica para la (PMM), todos los genes estructurales se encuentran agrupados en el cromosoma y se transcriben a partir de varios promotores. El gen *algD*, que codifica la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD), encabeza el grupo de genes biosintéticos *alg* (Figura 2). Los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* que se localizan inmediatamente abajo de *algD* están organizados en una unidad transcripcional (Galindo et al., 2007; Setubal et al., 2009) y sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato: el producto de *alg8* es una glicosil transferasa membranal que se ha propuesto con actividad de polimerasa; *alg44* codifica otra proteína de membrana interna, la cual forma parte del complejo de polimerización o que tiene que ver con el transporte del polímero al periplasma, recientemente se ha propuesto que actúa en conjunto con *alg8* en la copolimerización, y que ambas proteínas se requieren *in vivo* para la reacción de polimerización que conduce a la producción de alginato (Galindo et al., 2007; Oglesby et al., 2008); *algJ* codifica para una proteína de membrana externa con actividad de canal iónico que es esencial para la secreción del alginato y el producto de *algK* es una proteína periplásmica que pudiera participar en la incorporación de AlgJ en la membrana externa (Galindo et al., 2007). Inmediatamente después de este operón se encuentra el operón *algGXLVIFA*. *algG* codifica para una epimerasa y *algL* para una alginato liasa o alginasa. Los productos de *algV*, *algI* y *algF* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos en el periplasma y el producto de *algA* es la enzima bifuncional que cataliza el primer y tercer pasos de la vía (Galindo et al., 2007; Vázquez et al., 1999). Existe otro grupo de genes que codifican una familia de epimerasas extracelulares (AlgE 1-7 y AlgY) responsables del contenido de residuos manurónicos y gulurónicos en el polímero final (Gimmestad, 2006; Remminghorst y Rehm, 2006).

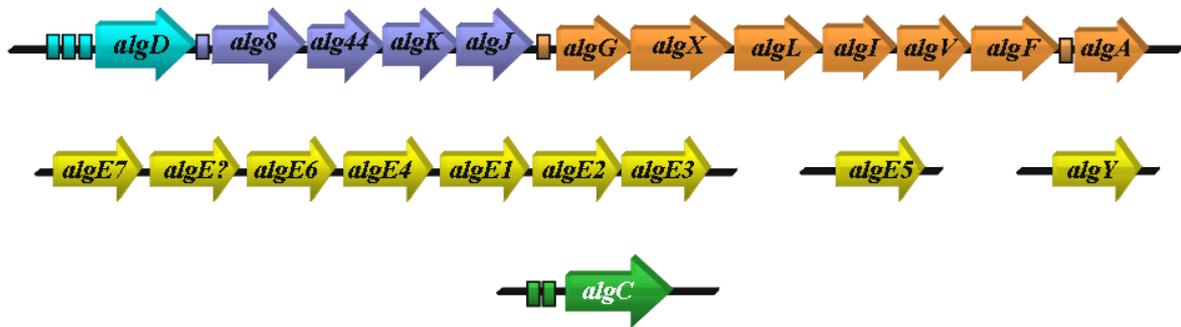


Figura 2. Representación de los genes estructurales involucrados en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*. Los genes de *P. aeruginosa* están organizados físicamente de una manera muy similar. Las regiones promotoras para el inicio de transcripción de los genes se indican en rectángulos (modificado de Remminghorst and Rehm, 2006).

## 2.5 Regulación de la biosíntesis.

El gen *algD* codifica la GDP-manosa deshidrogenasa, una enzima clave de la ruta de la biosíntesis del alginato. La transcripción de este gen inicia a partir de tres promotores los cuales son el blanco de varios reguladores globales, como el factor sigma de estrés AlgU, RpoS y el sistema de dos componentes que regula metabolismo secundario GacS-GacA (Castañeda et al., 2000; Núñez et al., 2000)(Figura 3). GacS/GacA regula la transcripción de *algD* a través de dos vías: la primera por regular positivamente la transcripción del gen *rpoS* (Castañeda et al., 2001) y la segunda está mediada por el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmB. RsmA es una proteína que se une directamente al mRNA de *algD* evitando su traducción. GacA activa la transcripción de un RNA regulador pequeño llamado RsmZ, el cual titula a RsmA (Manzo et al., 2011).

Por otra parte, AlgU es esencial para la producción de alginato, pues reconoce el promotor del gen *algC* para inicio de su transcripción y para obtener niveles altos en la transcripción del gen *algD*. AlgU es un ortólogo del factor sigma de estrés ( $\sigma^E$ ) en *Escherichia coli* (Potvin et al., 2007). AlgU está codificado en el operón *algUmucABCD* y al igual que en *E. coli*, los genes localizados río abajo de *algU*, *mucABCD*, codifican para reguladores negativos de la actividad de AlgU (Martínez-Salazar et al., 1996). De esta manera los niveles de producción de alginato se abaten en una mutante *algU*, mientras que en una mutante de *mucABCD*, se incrementan, al elevarse la transcripción de *algD*, debido a la elevación de la actividad del factor sigma AlgU (Moreno et al., 1998; Nuñez et al., 2000).

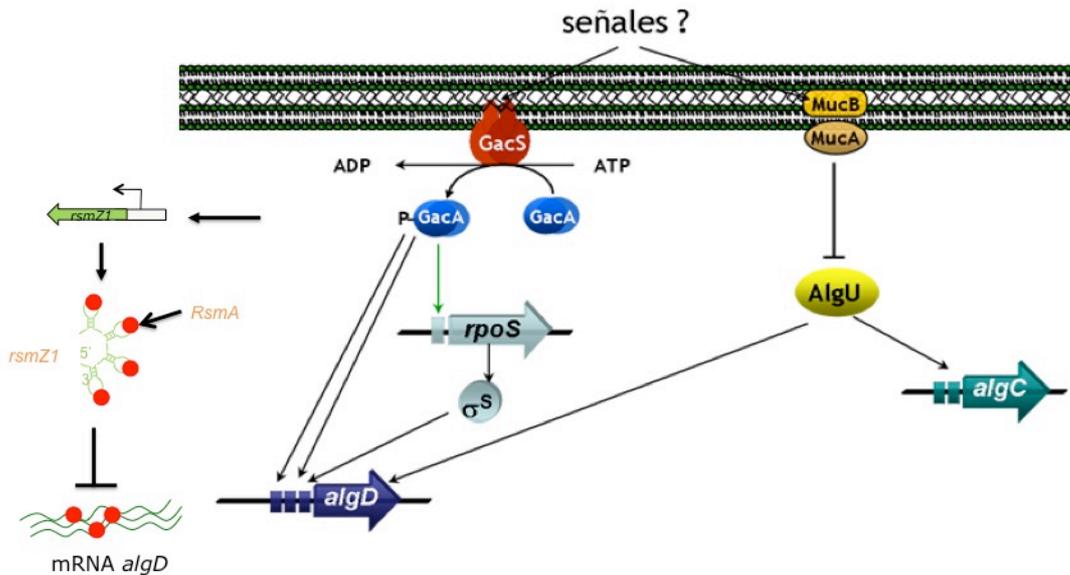


Figura 3. Modelo de regulación de la producción de alginato en *A. vinelandii*. (modificado de Galindo et al., 2007).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Sistema de dos componentes CbrA/CbrB.

Los sistemas de dos componentes (Two-component system o TCS por sus siglas en inglés) juegan un rol importante en la adaptación de células bacterianas a factores como la disponibilidad de nutrientes, estrés, señales ambientales, osmolaridad, entre otros (Gao y Stock, 2009). Por ejemplo, gracias a estos sistemas, cuando ciertos nutrientes se hacen limitantes, las bacterias pueden adecuar su fisiología para utilizar concentraciones menores de nutrientes, o alternativamente, emplear nutrientes energéticamente menos favorables. Los sistemas de dos componentes involucrados en dicha adaptación nutricional incluyen los pares NtrB-NtrC (asimilación de nitrógeno) y PhoR-PhoB (asimilación de fosfato) (Calva y Oropeza, 2006; Gao y Stock, 2009).

Los sistemas de dos componentes consisten de una proteína sensora cinasa histidínica (también llamada transmisor), comúnmente localizada en membrana interna, y de una proteína regulador de respuesta, que generalmente es un activador transcripcional (Bijlsma y Groisman, 2003; Calva y Oropeza, 2006). La cinasa histidínica cataliza su autofosforilación dependiente de ATP en un residuo conservado de Histidina (His). En estas proteínas su extremo N-terminal es un dominio periplásmico que detecta la señal adecuada (también llamado dominio de

entrada), y cuyo extremo C-terminal es un dominio citoplasmático que constituye el núcleo de la cinasa (Krell et al., 2010; Laub y Goulian, 2007; West y Stock, 2001). Subsecuentemente el grupo fosfato se transfiere al dominio aceptor del regulador de respuesta; la mayoría de estos consiste en dos dominios: uno de regulación en el extremo N-terminal y otro efector en el extremo C-terminal. El dominio regulador contiene residuos conservados, como el de Aspartato (Asp), sitio de fosforilación. Cuando el regulador de respuesta se fosforila generalmente induce la expresión de genes necesarios para la adaptación a los cambios en el medio ambiente (Calva y Oropeza, 2006; Krell et al., 2010; Gao y Stock, 2009; West y Stock, 2001).

El sistema de dos componentes CbrA/CbrB (llamado así por su participación en la vía catabólica) fue descrito por primera vez en *P. aeruginosa*; CbrB es un factor transcripcional (TF por sus siglas en inglés) de la familia NtrC el cual reconoce promotores  $\sigma^{54}$ . Mediante experimentos de complementación y de “extensión del iniciador”, se concluyó que aun cuando *cbrB* se localiza río abajo de *cbrA* en el genoma de *P. aeruginosa*, *cbrA* y *cbrB* son transcritos de manera independiente por promotores separados. Una mutante en este sistema de dos componentes resulta en una incapacidad de usar varios aminoácidos (como arginina, histidina y prolina), poliaminas, agmatina, hexosas y tricarboxilatos como únicas fuentes de carbono (Li y Lu, 2007; Nishijyo et al., 2001). En el catabolismo de arginina se observó que CbrB activa la transcripción de ArgR, un activador transcripcional para la utilización de arginina (Li y Lu, 2007). Por otro lado, recientemente se encontró que el sistema de dos componentes CbrA/CbrB es necesario para la transcripción del RNA pequeño CrcZ, cuyo gen está localizado inmediatamente río abajo del gen *cbrB*. CrcZ titula a Crc, una proteína que ejerce la represión catabólica de fuentes de carbono no preferidas en varias especies de *Pseudomonas* (Sonnleitner et al., 2009).

Recientemente se demostró que CbrA/CbrB juegan un rol muy importante en virulencia y procesos relacionados con ésta, incluyendo el swarming, formación de biofilm, citotoxicidad y resistencia a antibióticos. En *P. aeruginosa* una mutante en *cbrA* exhibe un aumento de la citotoxicidad en las células del epitelio pulmonar, además de que se ha demostrado un aumento en la resistencia hacia una variedad de antibióticos clínicamente importantes incluidos la polimixina B, ciprofloxacino y trombamicina (Yeung et al., 2010).

Análisis fenotípicos y de cuantificación de mRNA realizados a mutantes en *cbrB* y *crcZ* sugieren que CbrA modula el swarming, formación de biofilm, y la citotoxicidad mediante la vía de *cbrB* y que el sRNA CrcZ localizado río abajo de este sistema de dos componentes forma parte de dicha cascada de regulación. En contraste, el fenotipo de resistencia a antibióticos mostrado en la mutante en *cbrA* está ausente en las mutantes en *cbrB* y *crcZ* por lo que se propone que CbrA modula la resistencia a antibióticos mediante un fenómeno de “cross-talk” con algún otro regulador de respuesta (Figura 4) (Yeung et al., 2010).

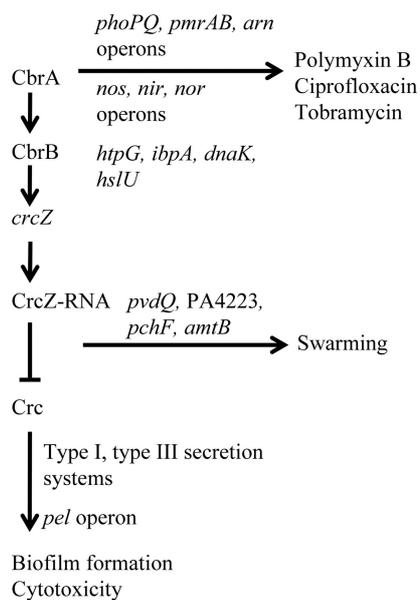


Figura 4. Modelo de regulación en el que *cbrA/cbrB/crcZ* modulan el swarming, formación de biofilm, citotoxicidad y resistencia a antibióticos (Yeung et al., 2010).

### 3.2 El sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ-CrcY en *Pseudomonas*.

En las bacterias como *Pseudomonas*, la proteína de unión al RNA mensajero (mRNA) Crc es clave en la represión de una serie de genes para el catabolismo de diversas fuentes de carbono, como aminoácidos, azúcares, o compuestos aromáticos (Moreno et al., 2009; Rojo, 2010; Sonnleitner et al., 2009). En presencia de aminoácidos, los cuales son sus fuentes preferidas de carbono, Crc inhibe la traducción del mRNA de *alkS* y de *benR*, los cuales codifican activadores transcripcionales de los genes para asimilar los alcanos y compuestos aromáticos (fuentes de carbono no preferidas), respectivamente (Sonnleitner et al., 2009). Crc se une al extremo 5' de estos mRNA, específicamente en una secuencia corta y rica en adeninas llamado motivo CA, situada cerca del codón de inicio, la cual presenta

la secuencia consenso AA(C/U)AA(C/U)AA (Figura 5). Esta interacción es lo suficientemente estable como para evitar la formación del complejo de iniciación de la traducción, compitiendo con la subunidad ribosomal 30 S por el mRNA, o permitiendo que ésta se una al mRNA, pero atrapándolo en un complejo no productivo. El mecanismo preciso puede depender de la ubicación exacta de la secuencia de unión a Crc en relación con el lugar en el que se encuentre el codón de inicio AUG (Moreno et al., 2009; Rojo, 2010; Sonnleitner et al., 2009).

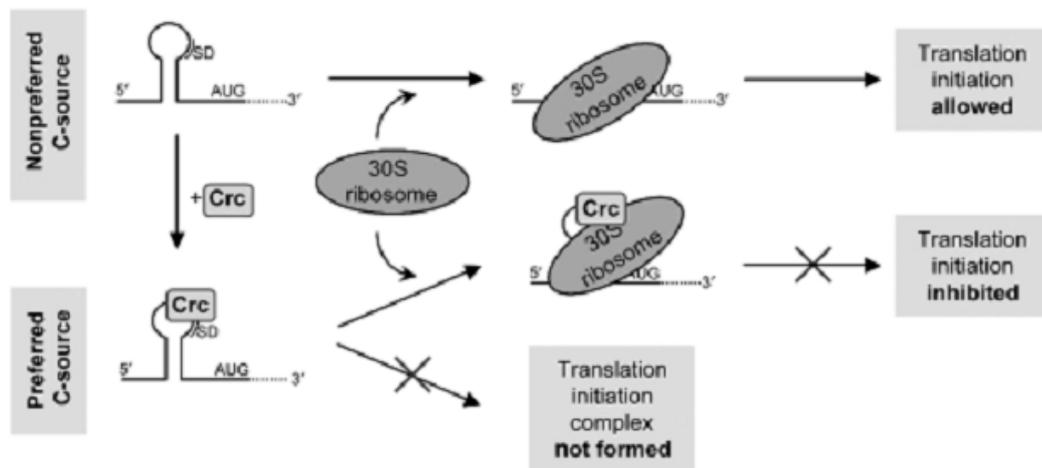


Figura 5. Mecanismo de acción de la proteína Crc . Crc se une al mRNA de fuentes de carbono no preferidas, en una secuencia cercana al codón de inicio impidiendo la traducción del mRNA de genes para la utilización de la fuente de carbono no preferida. SD: SECUENCIA SHINE-DALGARNO (Rojo, 2010).

Por otra parte el pequeño RNA CrcZ contiene 5 motivos CA, que tienen una gran afinidad por la proteína Crc, y es capaz de removerla de su unión al mRNA, por lo cual libera la represión catabólica que Crc ejerce sobre la traducción de ciertos genes (Figura 6). Por esta razón una sobreexpresión de CrcZ impide la represión del catabolismo *in vivo*, mientras que una mutación impide el uso de diversas fuentes de carbono (Sonnleitner et al., 2009).

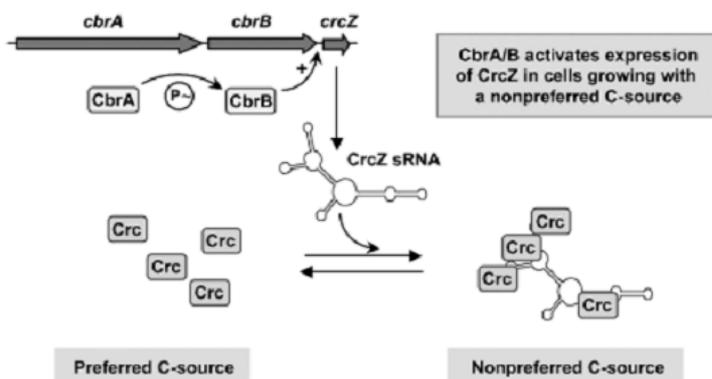


Figura 6. Mecanismo de acción del sRNA CrcZ, el cual contiene 5 motivos de unión para Crc, en condiciones que generan baja o nula represión catabólica. La expresión de *crcZ* depende del sistema de dos componentes CbrA/CbrB (Rojo, 2010).

Como se indicó anteriormente, Sonnleitner y cols. (2009) encontraron que CbrB activa la transcripción del gen *crcZ*. De esta manera CbrA/CbrB gradualmente ajustan los niveles de CrcZ en respuesta a la disposición de diferentes fuentes de carbono. Por lo cual, la proporción de Crc/CrcZ permite a la bacteria establecer un equilibrio de la represión catabólica de fuentes de carbono a nivel post-transcripcional (Moreno et al., 2009; Sonnleitner et al., 2009).

Recientemente se ha identificado una secuencia palindrómica (CTGTTACC N<sub>12</sub> CGTAACAG) conservada en la región río arriba del promotor de *crcZ*, conocida como UAS (upstream activating sequence), que se encuentra aproximadamente 150 nucleótidos corriente arriba del inicio de la transcripción, este es el sitio de unión del regulador de respuesta CbrB, esencial para la activación del promotor tipo  $\sigma^{54}$  de CrcZ. La unión específica de CbrB a esta secuencia palindrómica fue comprobada mediante ensayos tipo EMSA y fusiones transcripcionales (Abdou et al., 2011). La secuencia que reconoce CbrB es similar a la que reconocen activadores transcripcionales de la familia NtrC, en bacterias entéricas como *E. coli* (TG C A CC N<sub>5</sub> GGT G CA) y *Pseudomonas putida* (CG C ACC N<sub>5</sub> GGT G CA).

Por otro lado la proteína IHF (integration host factor) se encuentra conservada tanto estructural como funcionalmente entre las bacterias entéricas y *P. aeruginosa*. Esta proteína tiene un consenso de unión a DNA AATCAAN<sub>4</sub>TTG, y dicha secuencia de unión fue recientemente encontrada en la región promotora de *crcZ* del nucleótido -60 al -48 por lo que investigaron si la unión de IHF a este promotor tenía algún efecto. Descubrieron que en una mutante en IHF la expresión de CrcZ se encontró significativamente disminuida en comparación con la cepa silvestre, por lo que se demostró que la proteína IHF también es necesaria para la expresión de CrcZ (Abdou et al., 2011).

En otras especies de *Pseudomonas*, como *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syringae*, pero no en *P. aeruginosa*, existe un parólogo de CrcZ al que se le ha llamado CrcY, el cual también posee sitios de unión a Crc y es capaz de unir a esta proteína (Moreno et al., 2011). Sin embargo CrcY no es activado por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB. Los niveles de estos sRNA no codificantes son bajos durante la represión catabólica por alguna fuente de carbono y altos cuando se desreprime dicho sistema, además de que la mutación en alguno de los sRNA no influye en el sistema de represión catabólica, pero la inactivación de ambos sRNA resultó

en una represión catabólica constitutiva, comprometiendo el crecimiento de la bacteria en diversas fuentes de carbono. Debido a esto se propone que ambos sRNA actúan en conjunto modulando la expresión de Crc dependiendo de las condiciones metabólicas (Moreno et al., 2011).

### 3.3 En *A. vinelandii* la síntesis de alginato se eleva en una mutante *cbrA::Tn5*.

En un banco de mutantes de *A. vinelandii* generado por mutagénesis al azar se identificó una, llamada GG15, en la que el mTn5 interrumpió el gen ortólogo a *cbrA* de *P. aeruginosa* (Serrano, 2010). Río abajo de *cbrA* se localiza tanto el gen *cbrB* como el gen *crcZ* por lo que el arreglo génico del locus *cbrA-cbrB-crcZ* se conserva entre *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*. Por otro lado un análisis de la secuencia del genoma de *A. vinelandii* permitió identificar a un gen ortólogo a *crc* de *Pseudomonas* sp.

La caracterización fenotípica de la mutante GG15 mostró un incremento importante en la producción de alginato con respecto a la cepa silvestre (AEIV) en medio mínimo Burk suplementado con glucosa. Además la complementación genética de la mutante GG15 con una copia del gen *cbrA* redujo la producción de alginato a niveles silvestres (Serrano, 2010)(Figura 7). Por otro lado, la expresión de varios genes estructurales *alg* (entre ellos los genes *algC*, *alg8* y *algA*) se elevó al menos 4 veces (Figura 8). Estos datos indican claramente que la cinasa histidínica CbrA ejerce un control negativo sobre la síntesis de alginato en *A. vinelandii*, al controlar al menos la expresión de *alg8* y *algC*.

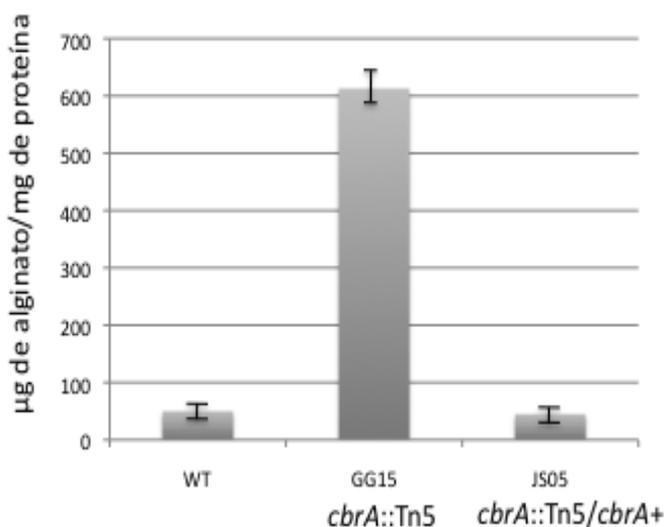


Figura 7. Cuantificación de alginato en cepas de *A. vinelandii*. AEIV (WT): cepa silvestre; GG15: mutante *cbrA::Tn5*; JS05: mutante *cbrA::Tn5* complementada con la copia silvestre (Serrano, 2010).

Dentro de los Sistemas de Dos Componentes, una mutante en la cinasa histidínica posee un fenotipo de cross-talk; Es decir, que en ausencia de su par sensor, un regulador de respuesta puede ser fosforilado, aunque con baja eficiencia, por otras cinasas histidínicas o en otros casos por pequeñas moléculas donadoras de fosfato (como el acetil fosfato) (Laub y Goulian, 2007). Es por esto que para conocer el efecto del sistema de dos componentes sobre la fisiología de la célula es necesario construir una mutante en el regulador de respuesta correspondiente. Debido a esto, se construyó una mutante de *A. vinelandii* en el regulador de respuesta CbrB (Bonilla, 2010).

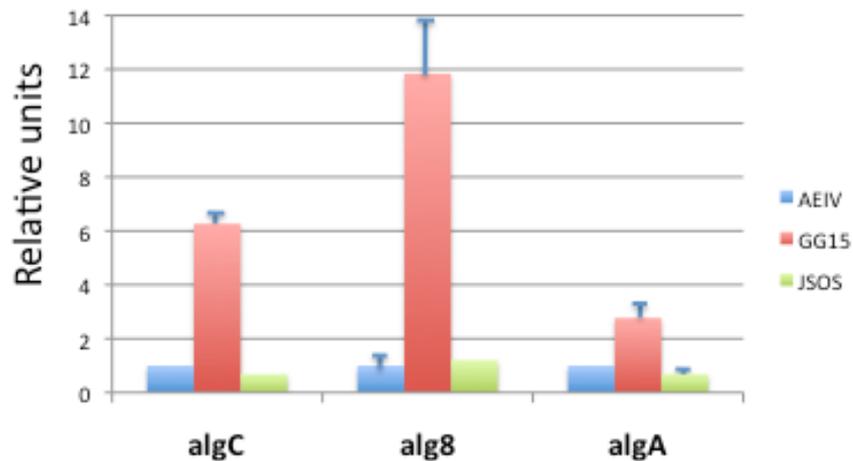


Figura 8. Cuantificación de la expresión relativa, mediante qRT-PCR, de varios genes estructurales para la síntesis de alginato en fase de crecimiento exponencial en medio Burk-glucosa. La cuantificación se realizó utilizando RNA total de la cepa silvestre AEIV, la cepa mutante *cbrA::Tn5* GG15 y la cepa complementada GG15/*cbrA+* llamada JS05.

La mutante *cbrB* mostró un crecimiento pobre en medio sólido y fue incapaz de crecer en medio líquido lo que dificultó su caracterización fenotípica. Sin embargo se pudo apreciar que la asimilación de acetato se afectó en ausencia de este regulador de respuesta y una caracterización parcial en medio sólido indicó que la producción de alginato también se incrementó en ausencia de CbrB (Bonilla, 2010). No fue posible realizar un ensayo más detallado del efecto de CbrB sobre la asimilación de fuentes de carbono debido a que la mutante *cbrB::Sp* no pudo crecer en medio líquido, ni aún en presencia de  $\text{NH}_4$ , lo cual contrasta con la mutante GG15, *cbrA::Tn5*, la que si es capaz de crecer en medio líquido y en ausencia de  $\text{NH}_4$ . Este

hecho revela un papel esencial del sistema de dos componentes CbrA/CbrB en el crecimiento de *A. vinelandii*.

En el presente trabajo estamos interesados en investigar el mecanismo molecular del control negativo que ejerce CbrA/CbrB sobre la síntesis de alginato. Dicho efecto podría ser indirecto ya que, hasta la fecha, no se ha descrito actividad represora para Reguladores de Respuesta de la familia NtrC como lo es CbrB. Con base en los antecedentes planteados, es posible que en la cascada de señalización entre el Sistema CbrA/CbrB y la represión de los genes *alg* esté involucrado el sistema de regulación Post-transcripcional Crc/CrcZ. En este trabajo nos hemos propuesto evaluar esta posibilidad.

#### **4. HIPÓTESIS**

El sistema de dos componentes CbrA/CbrB controla negativamente la producción de alginato a través del sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ. En ausencia de CbrA existe un aumento en la actividad de la proteína Crc, la cual regula positivamente la síntesis de alginato. Es probable que dicha regulación sea indirecta, ya que no se ha descrito que la proteína Crc ejerza un control positivo sobre la traducción de sus genes blanco, y además porque ninguno de los mRNA que intervienen en la síntesis de alginato poseen el consenso de unión para la proteína Crc.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Investigar si el efecto negativo de CbrA/CbrB sobre la síntesis de alginato en *A. vinelandii* está mediado por el sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ.

### **5.2 Objetivos Particulares**

- Investigar si en *A. vinelandii*, al igual que en especies de *Pseudomonas*, la transcripción del RNA regulador CrcZ depende del sistema de dos componentes CbrA/CbrB.
- Investigar si la sobre expresión de CrcZ en el fondo de la mutante *cbrA::Tn5* restablece los niveles reducidos de alginato.
- Investigar si la sobre expresión de *crc* en el fondo de la cepa silvestre incrementa la síntesis de alginato.
- Evaluar el efecto de una mutación en la proteína Crc y en el sRNA regulador CrcZ sobre la síntesis de alginato.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Material biológico

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Cepa	Característica	Referencia o Fuente
<i>A. vinelandii</i> AEIV	Fondo silvestre; Nal <sup>r</sup>	Larsen y Haug, 1971
GG15	Mutante AEIV, con el gen <i>cbrA</i> interrumpido con el mini-Tn5; Sp <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	EndA1 hsdR17 supE44 thi-1 $\lambda$ - recA1 gyrA96 relA $\Delta$ lacU169 $\phi$ 80 ( $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15)	Hannah, 1983
<i>E. coli</i> BW21038	<i>uidA</i> <sup>-</sup> ; Sin actividad de $\beta$ -glucuronidasa -	Metcalf et al., 1996
<i>cbrA</i> ::Sp polar	Mutante AEIV con el gen <i>cbrA</i> interrumpido con el casete de Sp en el codón 501 en sentido contrario a la transcripción.	Este trabajo
<i>cbrA</i> ::Sp No polar	Mutante AEIV con el gen <i>cbrA</i> interrumpido con el casete de Sp en el codón 501 en el mismo sentido de la transcripción.	Este trabajo
GG15- R	GG15 Reconstruida, mutante AEIV, con el gen <i>cbrA</i> interrumpido con el mini-Tn5; Sp <sup>r</sup> , reconstruida con el plásmido pGG15	Este trabajo
AE-ZGus	AEIV con la fusión transcripcional <i>crcZ-gusA</i> cointegrada en el cromosoma, en el gen <i>scrX</i> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>cbrA</i> <sup>-</sup> Zgus	Mutante en <i>cbrA</i> ::Sp polar, con la fusión transcripcional <i>crcZ-gusA</i> cointegrada en el cromosoma, en el gen <i>scrX</i> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
AEIV/pSRK-Gus	AEIV con el plásmido pSRK-Gus	Este trabajo
AEIV/pSRK- <i>crc</i>	AEIV con el plásmido pSRK- <i>crc</i>	Este trabajo
AEIV/pSRK-Km	AEIV con el plásmido pSRK-Km vacío	Este trabajo
<i>cbrA</i> ::Sp polar/pSRK-Km	Mutante <i>cbrA</i> ::Sp polar con el plásmido pSRK-Km (vacío)	Este trabajo
<i>cbrA</i> ::Sp polar/pSRK- <i>crcZ</i>	Mutante <i>cbrA</i> ::Sp polar con el plásmido pSRK- <i>crcZ</i>	Este trabajo

Plásmidos		
pTOPO TA	Vector de clonación para productos de PCR; <i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pJET1.2	Vector de clonación para productos de PCR; <i>eco47IR</i> , Amp <sup>r</sup>	Fermentas
pBSL142	Vector con un <i>casete</i> de resistencia a Gm; Amp <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup> .	Alexeyev et al., 1995
pBSL98	Plásmido que porta el <i>casete</i> de resistencia a Km	Alexeyev et al., 1995
pJET <i>crc</i> ::Km	Derivado del pJET; porta un fragmento de 800 pb de la región estructural del gen <i>crc</i> interrumpida con el <i>casete</i> de Km.	Luis F.Muriel
pCN154	Plásmido derivado del pBluescript KS+, contiene una construcción <i>gusA</i> -Tc flanqueada por 500 pb del <i>locus</i> de una transposasa (Avin12230)	Hernández-Eligio et al., 2012
pEY01	Derivado del plásmido pTOPO que lleva clonado 3.5 Kb del gen <i>scrX</i> . Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pEY02	Derivado del pCN154, contiene la fusión del promotor de <i>crcZ</i> al gen reportero <i>gusA</i> , seguido de un <i>casete</i> de resistencia a Tc	Este trabajo
pBBR1MCS-2	Vector de clonación de amplio rango de hospedero, <i>lacZ</i> , Km <sup>r</sup>	Kovach et al., 1995
pEY06	Derivado del pBBR1MCS-2 porta un fragmento de. 1200 pb que corresponde al gen <i>crc</i> y su región reguladora.	Este trabajo
pCN48	Derivado del vector pMOSBlue que tiene clonado un fragmento estructural del gen <i>cbrA</i> de 2.8 Kb.	Serrano, 2010
pJGEY1	Derivado del pCN48 porta la construcción <i>cbrA</i> ::Sp, con el <i>casete</i> de resistencia insertado en la dirección polar. Amp <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
pJGEY2	Derivado del pCN48 porta la construcción <i>cbrA</i> ::Sp, con el <i>casete</i> de resistencia insertado en una dirección no polar. Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
pEY03	Derivado del vector pTOPO porta la región del gen <i>crcZ</i> de. 1.8 Kb. Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo

pEY04	Derivado del pEY03. Porta la mutación <i>crcZ::Gm. Gm<sup>r</sup></i>	Este trabajo
pGG15	Derivado del pBluescript KS+, porta un fragmento <i>PstI</i> de 8 Kb del cromosoma de la cepa GG15, el cual contiene la inserción <i>cbrA::Tn5</i> .	C. Nuñez
pEY05	Derivado del pEY01 lleva clonado el arreglo <i>pcrcZ-gusA-Tc</i> , flanqueado por la región promotora del gen <i>scrX</i> , Tc <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pSRK-Km	Vector de clonación, amplio rango de hospedero, derivado de los pBBR1MCS, posee un promotor inducible con IPTG. Km <sup>r</sup>	Khan et al., 2008
pSRK-Gus	Derivado del pSRK-Km, posee el gen reportero <i>gusA</i> bajo el promotor inducible.	Este trabajo
pSRK- <i>crcZ</i>	Derivado del pSRK-Km, posee el gen <i>crcZ</i> en el mismo sentido del promotor inducible.	Este trabajo
pSRK- <i>crc</i>	Derivado del pSRK-Km, posee el gen <i>crc</i> en el mismo sentido del promotor inducible	Este trabajo

## 6.2 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): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; sacarosa, 200; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7.3; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 18.3; MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 160; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2. El pH se ajustó a un valor de 7.2. Se agrega agar bacteriológico (15 g/L) para solidificar el medio. En medio líquido *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 Sacarosa, a 30°C durante 48 horas. Para los cultivos de los cuales se extraería RNA, se crecieron las cepas AEIV y GG15 en medio Burk Sacarosa durante 24 hr a 30°C y 200 rpm a partir de un preinóculo de 24 hr.

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*).

### 6.3 Manipulación de ácidos nucleicos.

La extracción de material plasmídico se realizó con el *kit* de purificación GeneJET™ Plasmid Miniprep, mientras que la purificación de productos de PCR se llevó a cabo con el *kit* PureLink PCR Purification de Invitrogen®. Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Qiagen®) o las enzimas de alta fidelidad Expand Long Range (Roche®) y Phusion (BioLabs®). Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se enlistan en la Tabla 2 y fueron diseñados en base a la secuencia del genoma de la cepa de *A. vinelandii* DJ previamente reportada (Setubal et al., 2009).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

Oligonucleotido	Secuencia	Amplicón
PCR		
crcFw	CGAGGTCGGGTATCATACA	Gen <i>crc</i> para la construcción <i>crc::Km</i> (Luis F. Muriel)
crcRv	CTGCGTCTGGTGAAGTGA	
UcrcZ-F2	CAGTTCCGTGAGGACCTG	Gen <i>crcZ</i> mas 500 pb rio arriba y 500 pb rio abajo
DcrcZ-R	GTGCCGTAGACGTTGTCG	
UcrcZ – R	GGTCGATTGTGTGACATGG	PCR inverso de pEY03
DcrcZ-F	CCCTTTCTGCGTTCGAGGGTC	
CP-crc-F	GAGCTCGTCGAAGGCAATGCC GCTAC	Amplificación del gen <i>crc</i> con su promotor (CP) o sin su promotor (SP), usando el
SP-crc-F	GAGCTCGCTATATGCTCCGAG GTCGG	

crc-R	GAGCTCGCATCCTGATGATGC TCTGC	mismo primer reverso
scrX-F	CGATGACGATCGCTGGCAAC	Amplificación de la región promotora del gen <i>scrX</i>
scrX-R	GCGTTCTCAGATGGCTGGTC	
scrX Inv F	AGGCCTCTATGTAGGTCCTC	PCR inverso pEY01 para eliminar la región promotora de <i>scrX</i>
scrX Inv R	AGGCCTTAGGGCAACCGTGCCAGAC	
F 1	GCACCTACCAACTGTCGTCC	Amplificación de una región de 2.8 Kb del gen <i>cbrA</i>
R 1	GCTGATGATCAGGTCGAAGC	
PJGgus –F	GACCAGTACGTTTCGGTTCTG	Amplificación completa del arreglo <i>pcrcZ- gusA-Tc</i>
PJGgus – R	CCCTTGAAAGACTCCAGGAAG	
gusAF1	TATAGCCCATTTGAAGCCG	Amplificación de un fragmento de 700 pb del gen <i>gusA</i>
gusAF2	GGGTGAAGGTTATCTCTATG	Amplificación de un fragmento de 500 pb del gen <i>gusA</i>
gusAR1	CTCTGCCGTTTCCAATCG	
cbrA/B-F	CCT CAA TCT CTG CGA TCC	RT-PCR de la región intergénica <i>cbrA/B</i>
cbrA_Comp_R	GAGCTCCTGATGATCAGGTCGAAGC	
edaZwfRIF	CGTAGCCGAGCATGAGTTC	RT-PCR de la región intergénica <i>eddA/Zwf</i>
edaZwfRIR	GCAGGAGCTGGTATGGAGAT	
crcZHind-F	AAGCTTCAGCGTCTCGGCATTC	Amplificación de <i>crcZ</i> sin promotor
crcZSac-R	GAGCTCGTGCACTGCTTGACGGAG	
cbrB-RT-F	AGACCTGGAGGACGATGATTT	Usados en reacciones de q RT-PCR de <i>cbrB</i>
cbrB-RT-R	CAGGACGAAGTGCTGGAAGTA	
CrcZ-R-Prim2	GCG TCG TTG TTC TTG TTA G	Primer extension <i>crcZ</i>
crcZFXb	GATTAGATTAGATGCTC	Usados para

crcZRR1	CTGATAATGCCCTGTAC	amplificar la región reguladora de <i>crcZ</i>
---------	-------------------	--

#### 6.4 Extracción de DNA cromosomal.

Se creció *A. vinelandii* en 100 mL de medio BS adicionado con 20 mL de PY durante 48 hrs a 30° y 200 rpm. Pasado este tiempo se centrifugó y se separaron las células, posteriormente estas se lavaron con buffer TE 50/20, después del lavado se resuspendieron las células en 450 µL de buffer TE 50/20, y se le agregaron 50 µL de lisozima (10mg/mL) e incubó 30 min a 37°, una vez transcurrido el tiempo se le agregaron 50 µL de proteasa (10mg/mL) e incubó 30 minutos a 37° C. Posteriormente se le adicionaron 50 µL de SDS 10%, se incubó 15 minutos a 37°, luego se agregaron 100 µL de NaCl 5M, se mezcló y se incubó durante 10 minutos a 65° C, después se adicionaron 80 µL de una solución de CTAB 10% NaCl 0.7 M e incubó de 15 a 20 minutos a una temperatura de 65°C. Pasada la incubación se mezcló el tubo y se le agregó 1 volumen de una solución de Cloroformo-Isoamílico 1:24, se mezcló y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió a otro tubo la fase acuosa, a la cual se le agregó un volumen de Fenol saturado y un volumen de Cloroformo-Isoamílico 1:24, se mezcló y nuevamente se centrifugó 5 minutos, una vez más se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se extrajo con un volumen de Cloroformo-Isoamílico 1:24, nuevamente se centrifugó y se separó la fase acuosa en otro tubo al que se le agregaron 600 µL de isopropanol, en este punto mezclamos bien el contenido y fue posible observar las hebras de DNA; para precipitarlas las centrifugamos y posteriormente decantamos el isopropanol, finalmente lavamos con etanol al 70%, permitimos que se seque completamente los restos de alcohol y resuspendimos el pellet de DNA en una solución de RNase (20µg/mL).

#### 6.5 Extracción de RNA total.

Se siguió un protocolo descrito por Barry y col. (1992) y que se describe a continuación. Se centrifugó una cantidad adecuada de células; (como estas eran productoras de alginato lavamos el cultivo con solución salina al 0.85% o con EDTA al 0.02 M, para que fuera mas fácil desprender el alginato). Después resuspendimos el pellet en 50 uL de agua tratada con DEPC al 0.1% y se le adicionó 5 µL de agua

con DEPC al 0.5%, enseguida se le agregaron 200 uL de acetona helada, se mezcló manualmente y se centrifugó, para después desechar cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 30 uL de DEPC 0.1%, se agregaron 3uL de Lisozima (10 mg/mL, preparada con DEPC 0.5%) y se incubó a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se le agregaron 2uL de proteasa (100 ug/mL), se incubó en hielo 10 minutos y se agregaron 3.5 uL de DEPC 0.5%, 200 uL de Fenol (precalentado a 70°C), 150 uL de cloroformo, se mezcló manualmente y se adicionó 150 uL de DEPC 0.1%, posteriormente se centrifugó. Se removió la fase acuosa y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto. Este se dejó precipitando 1 hr o toda la noche a -20°C. Finalmente se centrifugó y resuspendió en 50 uL de DEPC 0.1%. Fue almacenado a -20°C

### **6.6 Cuantificación de la expresión relativa mediante qRT-PCR.**

Para los ensayos de cuantificación relativa mediante qRT-PCR 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. 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* (Avin15810) 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 dos extracciones separadas de RNA de cada cepa en cada una de las condiciones.

### **6.7 Ensayo de extensión del iniciador.**

El ensayo de extensión del iniciador se realizó usando 20µg de RNA total purificado a partir de células de las cepas GG15 y AEIV cultivadas durante 24 hr en medio BS. La reacción de extensión se realizó marcando el oligonucleótido con gamma ATP<sup>32</sup> utilizando la enzima polinucleótido cinasa de Roche y 20 pmol del oligonucleótido, para posteriormente incubar durante 1 hr a 37°C. Para obtener el cDNA se utilizó la

enzima AMV (Roche) con una temperatura de extensión de 42°C, este se precipitó usando acetato de amonio 10M más 100µL de etanol absoluto, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, se lavó con etanol al 70% al menos en tres ocasiones y finalmente el pellet resultante fue resuspendido en 8µL de agua, y al que además se le agregaron 4µL de colorante. Para realizar la reacción de secuencia se utilizó el kit Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit de USB, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.8 Construcción del plásmido pJETcrc:Km.**

La construcción de la mutación *crc::Km* la realizó Luis Felipe Muriel (estudiante de la Dra. Guadalupe Espín) y se realizó de la siguiente manera: el gen *crc* fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos: *crcFw* y *crcRv* (Tabla 1) 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 pJET (Fermentas), obteniendo el plásmido pJET*crc*. Con el fin de tener un marcador de resistencia útil en *A. vinelandii*, se ligó un *casete* de resistencia a Kanamicina (Km), mediante la restricción de la región estructural de *crc* con la enzima *TthI* la cual tiene un sitio único en la región estructural de *crc*, dejando secuencias para recombinación de 300 y 500 pb a los extremos.

### **6.9 Construcción del plásmido pEY04 (*crcZ::Gm*).**

Para realizar esta construcción, primero se amplificó por PCR el *locus crcZ*, es decir 700 pb río arriba y 700 pb río abajo del gen *crcZ* empleando como templado DNA cromosomal de la cepa AEIV y los oligonucleótidos *UcrcZ-F2* y *DcrcZ-R*. El producto de la reacción fue purificado y posteriormente clonado en el kit de clonación pTOPO TA (Invitrogen), obteniendo el plásmido pTOPO*crcZ*.

Debido a que *crcZ* codifica un sRNA que no será traducido y la simple inserción de un *casete* de resistencia no aseguraría que dicho RNA dejara de ser funcional, se decidió hacer una eliminación completa del gen *crcZ*. Para este fin se diseñaron oligonucleótidos adecuados para realizar una PCR inversa (oligonucleótidos *UcrcZ-R* y *DcrcZ-F*), y solo amplificar las regiones flanqueantes de este gen, y de esta manera permitir una recombinación. Después de obtener este producto de PCR se le ligó un *casete* de resistencia a Gm, reemplazando totalmente el gen *crcZ*.

Ya obtenida esta construcción, se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron las clonas Gentamicina resistentes, de las que se purificó plásmido para corroborar que contenían el arreglo *crcZ*::Gm.

#### **6.10 Construcción del plasmido pEY02 (pCN154-*pcrcZ*).**

El plásmido pCN154 porta el gen reportero *gusA*, seguido por un *casete* de resistencia a Tc; ambos genes están flanqueados por las regiones 5' y 3', respectivamente de un gen que codifica una transposasa (Avin12230) (Hernández-Eligio et al., 2012). El propósito del plásmido pCN154 es construir fusiones transcripcionales con el gen reportero *gusA* e integrarlas en la región cromosomal de la transposasa Avin12230. Con el fin de construir dichas fusiones transcripcionales, del promotor de *crcZ* con el gen reportero *gusA*, se construyó el plásmido pEY02. Se amplificó mediante PCR la región reguladora del gen *crcZ*, de aproximadamente 500 pb, usando oligonucleótidos *crcZFXb* y *crcZR1*, los cuales poseen respectivamente los sitios de restricción *Xba*I y *Eco*R1 en los extremos; una vez purificado el producto de la región reguladora de *crcZ* y el plasmido pCN154, ambos se digirieron con las enzimas de restricción antes mencionadas y se realizó la reacción de ligación. Posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* con este DNA y se seleccionaron transformante resistentes a Tc y Ap. La correcta construcción del plásmido pEY02 se verificó con una doble restricción *Xba*I/*Eco*R1 con la cual se libera la banda de 500 pb correspondiente a la región reguladora de *crcZ* (Datos no mostrados).

#### **6.11 Construcción del plasmido pEY05 (pTOPO*scrX*-*pcrcZ*-*gusA*-Tc).**

En el curso de nuestra Tesis nos dimos cuenta que la región de la transposasa Avin12230, que se escogió para dirigir la integración de las fusiones transcripcionales en el genoma de *A. vinelandii*, no está conservada en la cepa AEIV que utilizamos en el laboratorio. Por esta razón la fusión transcripcional del promotor de *crcZ* con el gen reportero *gusA*, en la cepa AEIV, la dirigimos al *locus scrX* el cual si está conservado en nuestra cepa. Para este fin se amplificó por PCR un fragmento de 3.5 Kb de la región promotora y estructural del gen *scrX* utilizando los oligonucleótidos *scrX-F* y *scrX-R*. Este producto se clonó en el vector pTOPO

generando el vector pEY01. Este plásmido se utilizó de DNA molde para realizar una reacción de PCR inverso con el fin de eliminar un segmento de 1.7 Kb, la cual corresponde a la región promotora de este gen y parte de su región estructural. Posteriormente se subclonó el fragmento de 5 kb que porta el promotor de *crcZ* en fusión transcripcional con el gen reportero *gusA*, además del *casete* de resistencia Tc. Este fragmento se amplificó por PCR con la enzima de alta fidelidad Phusion (BioLabs®), utilizando como DNA molde el plásmido pEY02 y utilizando los oligonucleótidos pJGgus-F y pJGgus-R. Estos dos productos de PCR se mezclaron en una reacción de ligación con la enzima T4 Ligase (Fermentas), para posteriormente transformar células competentes de *E.coli*. Las transformantes se seleccionaron en medios con antibióticos (Km y Tc). Para demostrar la correcta construcción de este vector se realizó una amplificación por PCR de la región reguladora de *crcZ* y un fragmento del gen *gusA* (Sección de resultados, Figura 19B), al plásmido generado se le llamo pEY05.

#### **6.12 Construcción de los plásmidos pJGEY1 y pJGEY2 (pMOSBLUE*cbrA*::*Sp* con inserción Polar y No polar).**

Para realizar estas construcciones se utilizó el plásmido pCN48, el cual fue digerido con la enzima de restricción *StuI*, que tiene un único sitio de restricción en el codón 501 del marco de lectura que codifica para la proteína CbrA. Una vez linearizado el plásmido se le ligó un *casete* de resistencia a espectinomicina y se transformó en una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se obtuvieron varias clonas a las cuales se les realizó un perfil de restricción con las enzimas *SphI* y *EcoRI* para establecer la polaridad en la que se encontraba el *casete* de resistencia.

#### **6.13 Construcción de los plásmidos pSRK-Gus, pSRK-*crcZ*, pSRK-*crc*.**

El plásmido pSRK-Km, es un vector que contiene un promotor inducible del tipo *lacZ*, y además porta el gen del represor *lacI* por lo que puede controlarse su inducción a diferentes concentraciones de IPTG (Khan et al., 2008). Por estas razones decidimos probar este plásmido para nuestras sobre-expresiones, tanto de la proteína como del sRNA. Para tal fin se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran la región estructural de ambos genes (700 pares de bases para el sRNA *CrcZ*; 800

pares de bases para la proteína Crc) y que llevan sitios de restricción adecuados para la clonación en dicho vector. Por otro lado se amplificó el gen reportero *gusA* (1.8 Kb), para de igual manera clonarlo bajo el promotor inducible. Cabe mencionar que para amplificar *crcZ* se diseñó un par de oligonucleótidos, con los sitios de restricción adecuados para clonar el RNA orientado en sentido con el promotor inducible (el delantero con sitio *SacI* y el reverso con sitio *HindIII*).

#### **6.14 Cuantificación de Proteína y Alginato.**

Para cuantificar la producción de alginato se usaron placas de agar Burk sacarosa; 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 2 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 procedió a cuantificar ácidos urónicos mediante el método de carbazol reportado por Knutson y Jeans (1968), y el cual se describe a continuación. Se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 350  $\mu$ l, ésta se colocó cuidadosamente en un tubo de ensaye con 3 ml de una solución boratos-ácido sulfúrico (solución 25 ml boratos-975 ml ácido sulfúrico), se adicionaron 100  $\mu$ l de carbazol (carbazol al 0.1% diluido en etanol) 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  $\mu$ g/ml.

La cuantificación de proteína se realizó en base al método reportado por Lowry et al., (1951). La pastilla obtenida del cultivo de *A. vinelandii* se lavó con MgSO<sub>4</sub> 10mM y se resuspendió en 1 ml de esta solución. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 200  $\mu$ l, a la cual se le añadió 1 ml de solución reactiva. Se dejó reposar 10 minutos para posteriormente agregar 100  $\mu$ 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

µg/ml. Las soluciones utilizadas fueron: a) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N; b) Tartrato de sodio y potasio 2%; c) CuSO<sub>4</sub> 1%. La solución reactiva se preparó con 1 ml de solución C, más 1 ml de solución B, más 98 ml de solución A.

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.

### **6.15 Cuantificación de la actividad de la enzima β-Glucuronidasa.**

Se prepararon las siguientes soluciones: Lisozima 10mg/mL, PNPG (P-nitrofenil-β-glucoronido) 4.0 mg/mL, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.2 M, Tritón 100x solución al 10% V/V de tritón en agua destilada, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 0.25 M, DTT 0.25 M.

El buffer Z, se prepara preferentemente antes de iniciar la reacción mezclando: 3.0 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M, 2.0 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M, 0.2 mL de EDTA 0.25 M y 1 mL de DTT 0.25 M, llevando el volumen a 50 mL.

Para proceder a la cuantificación se resuspendió el paquete celular de la muestra en 1mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, del cual se tomaron 20 µL (volumen de reacción) este volumen puede variar dependiendo del grado de expresión que tenga la β-Glucuronidasa, a estos se le agregaron 710 µL del buffer Z. Al mismo tiempo se preparó un blanco que contenía solo 730 µL de buffer Z y se procesó junto con las demás muestras. Se les agregó 10 µL de solución de Lisozima y se incubaron los tubos a 37° durante 5 minutos, pasado el tiempo se les añadió 10 µL de la solución de Tritón al 10%, posteriormente se les agregó 100 µL de la solución de PNPG y es muy importante que se cronometren exactamente 15 minutos de reacción (tRx) mientras se transfirieron los tubos a un baño de agua a 28°C. Se agregó 150 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para detener la reacción. Finalmente se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco.

Para calcular la actividad de β-Glucuronidasa usamos la siguiente fórmula:

$$U \beta\text{-Gluc} = \frac{D.O. (405 \text{ nm}) \times 1000}{(0.018)(t \text{ Rx en minutos})(Vol \text{ Rxn } \mu\text{L})(\mu\text{g Proteina/mL})}$$

1 U = nmoles de PNPG producidos/minuto/µg proteína

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 El gen *crcZ* en *A. vinelandii*. Estudio de su regulación transcripcional.

#### 7.1.1 Análisis del gen *crcZ* y de su región reguladora en *A. vinelandii*.

Como se indicó anteriormente, en *A. vinelandii* el sistema de dos componentes CbrA/B ejerce un control negativo sobre la síntesis de alginato. De aquí surge la pregunta de su mecanismo molecular de regulación. La hipótesis del presente trabajo es que en dicha regulación pudiera estar involucrado el sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ.

Una búsqueda en el genoma de *A. vinelandii* nos permitió identificar a un ortólogo de CrcZ de *P. aeruginosa*, justo río abajo de *cbrB*. La secuencia de este gen muestra varios sitios putativos de unión a la proteína Crc (Figura 10). Este gen, llamado *crcZ*, al igual que en *P. aeruginosa* posee las secuencias consenso de un promotor tipo  $\sigma^{54}$  putativo. Además se identificó, mediante el programa softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) un posible promotor  $\sigma^{70}$  que casi se sobrepone al promotor  $\sigma^{54}$  (Figura 9). El análisis de su región reguladora nos permitió identificar, además los sitios putativos de unión tanto a CbrB como de la proteína IHF. Recientemente Abdou y cols. (2011) establecieron un consenso de unión para CbrB, la cual consiste en una región palindrómica conservada en varias especies de *Pseudomonas*. Esto lo lograron mediante ensayos *in vitro* de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), e *in vivo*, mediante diversas fusiones transcripcionales de la región promotora de *crcZ*. Además también descubrieron la importancia de la proteína IHF para la expresión de CrcZ.

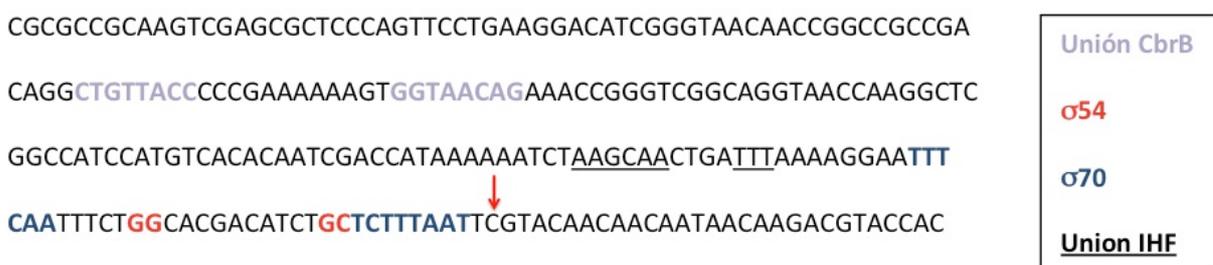


Figura 9. Secuencia nucleotídica de la región reguladora del gen *crcZ*. Las secuencias consenso de unión a Crc se encuentran indicadas. El sitio probable de inicio de la transcripción se indica con una flecha. Las predicciones de las cajas -12 y -24 del promotor  $\sigma^{54}$  están marcadas en rojo, mientras que

las cajas -10 y -35 del promotor  $\sigma^{70}$  estar marcadas en azul, las secuencias putativas de unión a CbrB están marcadas en lila por ultimo la secuencia de unión de IHF se encuentra subrayada.

### sRNA CrcZ

```

CGTACAAC1AACAATAACAAGACGTACCACCCAC2AATAAGAACGACGACACGACTCC
AGCCT3AACAAGAACAACGACGCGGAGACGGAGCCAACCGATTTTTTGGAGTAGGC
GCATGCCCCCGGGCGAAGCCCGCAGCCAGACCGAG4AACAACAAAACTGCCACGA
AGCAGCACCCGAAGTGGTAGGTCCGCAGGACCCTAGGCAATATCTGCAACCAAAGA
AATCCGTTTGCTATTGGCTCCCCATTGGGGGCCATCCCGGAGCCAAGGAGCCAACCG
GGACGGGCGCACAAC5AAGAACAACAAGCCCGGAGCAG6AACAAGAACAACGCACG

```

Figura 10. Secuencia de la región estructural del sRNA CrcZ, se encuentran marcados del 1 al 6 los posibles sitios de unión a la proteína Crc.

De manera similar, es decir, mediante análisis *in silico* de la región estructural de *crcZ*, pudimos establecer 6 sitios, los cuales son muy parecidos a la secuencia consenso de unión a la proteína Crc (AA(C/U)AA(C/U)AA) (Rojo 2010) (Figura 10).

Una vez que identificamos los sitios consenso para Crc en el sRNA CrcZ, nos preguntamos si realmente estos serían accesibles para la unión con la proteína Crc por esta razón utilizamos el programa llamado MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>), el cual es utilizado para predecir estructuras secundarias que podrían formarse en un RNA. La estructura de nuestro sRNA que de acuerdo al software presenta una mayor estabilidad se presenta en la Figura 11. Como se puede observar 5 de los 6 sitios putativos de unión a Crc se encuentran en una estructura de “asa”, lo que los hace más accesibles a la unión con la proteína; aunque el sitio 2 no aparece dentro de una estructura de “asa”, pero podría estar accesible a la unión de Crc pues tampoco se encuentra en una estructura de tallo. Por otro lado, cabe mencionar que el uso de este software no asegura que en alguna determinada condición este sRNA se estructure de una forma diferente; sin embargo, nos proporciona una idea de la estructuración que tendría CrcZ y los sitios putativos de unión que tiene para Crc.

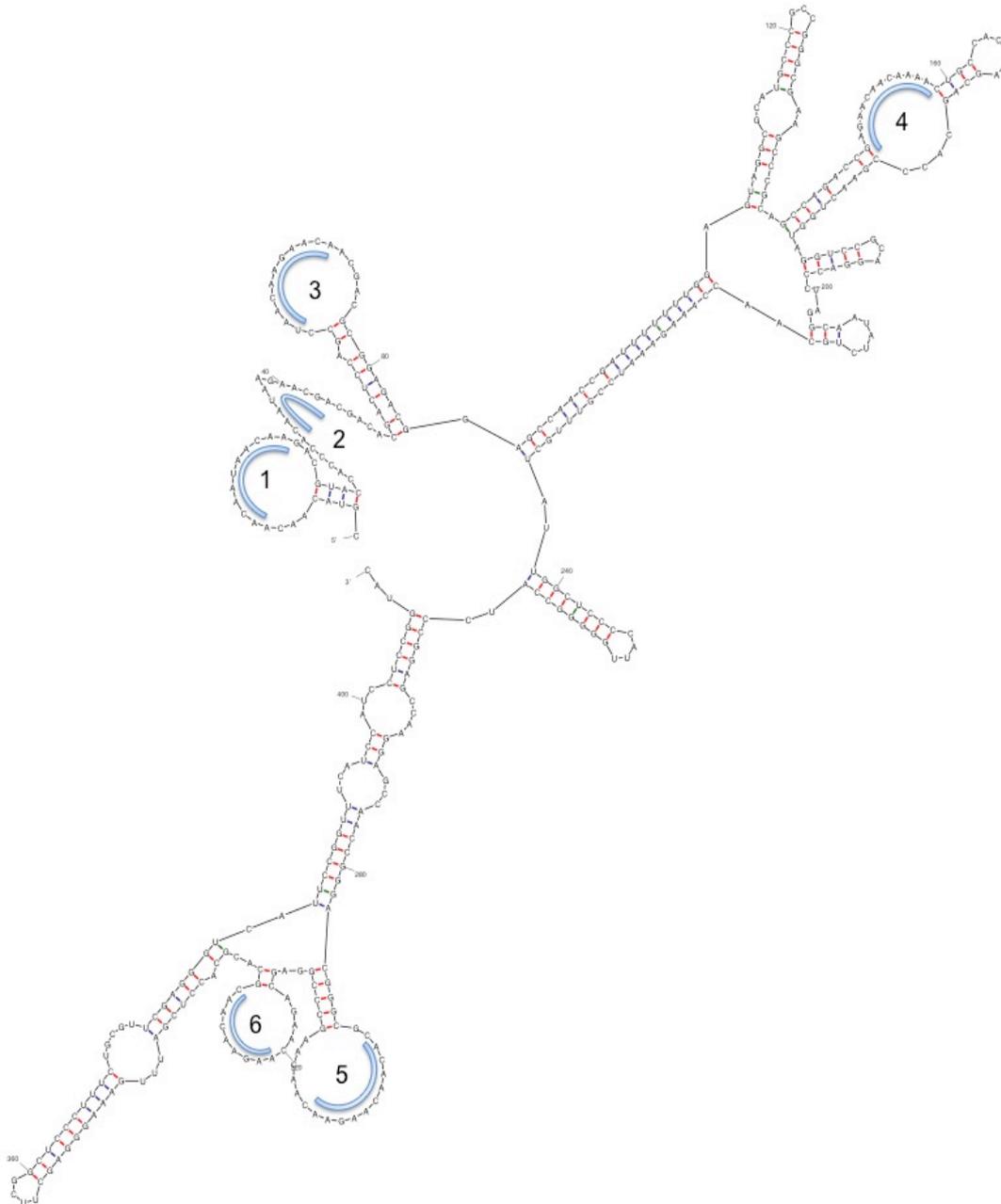


Figura 11. Estructura de CrcZ propuesta mediante el uso del programa MFOLD. Resaltados con líneas azules y numerados del 1 al 6 (en el mismo orden que la figura 15), se muestran los posibles sitios de unión a Crc.

### 7.1.2 Ensayo de extensión del iniciador del gen *crcZ*.

Con el fin de investigar el inicio de la transcripción de *crcZ* decidimos realizar un ensayo de extensión del iniciador utilizando RNA extraído de la cepa silvestre AEIV y de la mutante GG15 (Figura 12).

**A**

GCCGACAGGCTGTTACCCCGAAAAAAGTGGTAACAGAAACCGGGTTCGGCAG

GTAACCAAGGCTCGGCCATCCATGTACACAATCGACCATAAAAAATGCAACTGA

Inicio Predicho  
↓

TTTAAAAGGAA**TTTCA**ATTTCTGGCACGACATCT**GCTCTTTAAT**TCGTACAACAAC

oligonucleótido  
←

AATAACAAGACGTACCACCCACAATAAGAACGACGACACGACTCCAGCCTAACA

CrcZ-R-Prim2

AGAACAACGACGCGGAGACG

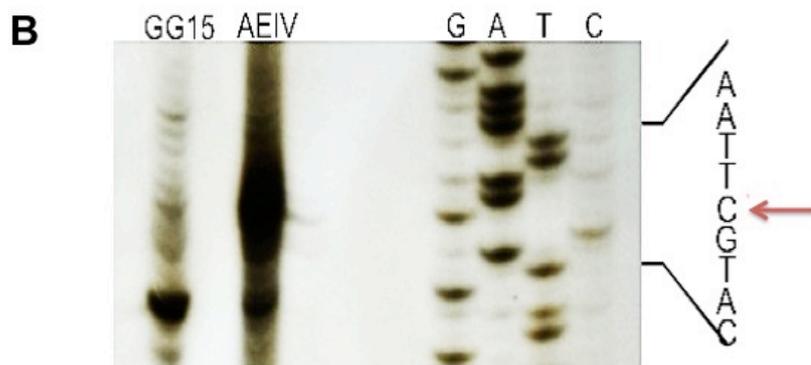


Figura 12. Ensayo de extensión del iniciador del gen *crcZ* en las cepas GG15 y AEIV. A) Secuencia nucleotídica de la región reguladora de *crcZ*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. La secuencia consenso para los posibles promotores  $\sigma^{54}$  (en rojo) y  $\sigma^{70}$  (en azul) se encuentran indicados, al igual que la posible secuencia de unión al activador transcripcional CbrB (verde). La secuencia complementaria de donde se diseñó el oligonucleótido usado en el ensayo esta subrayada. B) Autorradiografía del ensayo de extensión del iniciador del gen *crcZ* para identificar el sitio de inicio de la transcripción en las cepas AEIV y GG15.

En la cepa silvestre AEIV *crcZ* se transcribe a partir del promotor  $\sigma^{54}$  previamente identificado y existe otro inicio de transcripción a 4 nt de éste y que muy probablemente corresponda al promotor  $\sigma^{70}$ . Como era de esperarse en la cepa GG15 desaparece el inicio de transcripción dependiente de  $\sigma^{54}$  mas no el de  $\sigma^{70}$  (Figura 12B).

## 7.2 Efecto del Sistema CbrA/CbrB sobre la transcripción del sRNA *crcZ*.

Uno de los objetivos de este proyecto es investigar si el TCS CbrA/B controla la expresión de *crcZ* y si dicha expresión esta afectada en la mutante *cbrA::Tn5*. Para

lograr este objetivo construimos fusiones transcripcionales de *crcZ* con el gen reportero *gusA* en el cromosoma y evaluamos la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en el fondo de la cepa silvestre y en la mutante *cbrA*<sup>-</sup>. Sin embargo el mTn5 de la cepa *cbrA*::Tn5 porta el gen *gusA* por lo que surgió, en primer lugar, la necesidad de construir una mutante en el gen *cbrA* por inserción de un *casete* de resistencia a espectinomicina (Sp). La construcción de esta mutante se describe en la siguiente sección.

### 7.2.1 Construcción de mutantes *cbrA*::Sp polar y no polar.

Para lograr la construcción de mutantes *cbrA*::Sp, se procedió a interrumpir el gen *cbrA* con el *casete* de Sp en un sitio único *StuI* situado en el codón 501 del marco de lectura que codifica para la proteína CbrA, a partir del plásmido pCN48, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Por medio de un patrón de restricción con las enzimas *SphI* y *EcoRI* (Figura 13 B) se definió la orientación del *casete* de Sp como inserción polar (en sentido opuesto a la transcripción de *cbrA*) o no polar (en el mismo sentido de la transcripción del gen *cbrA*). Los plásmidos resultantes se denominaron pJGEY1 y pJGEY2 respectivamente, los cuales se encuentran representados en la Figura 13 A.

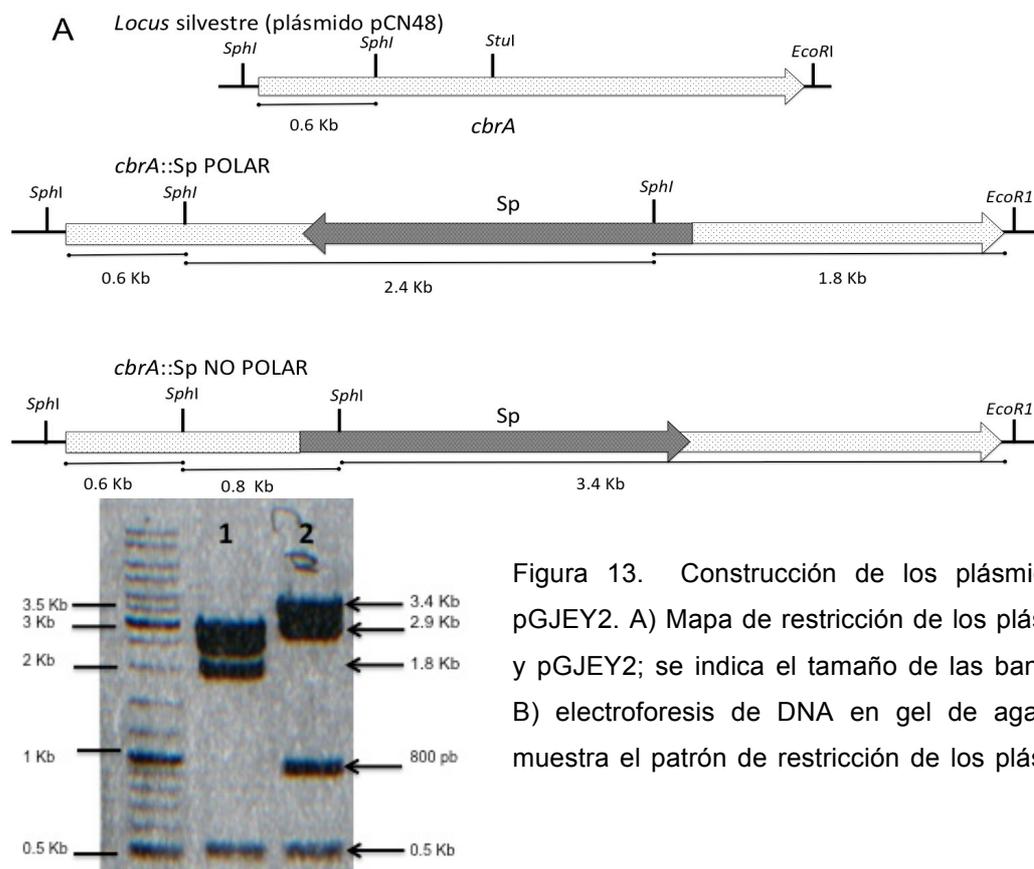


Figura 13. Construcción de los plásmidos pGJEY1 y pGJEY2. A) Mapa de restricción de los plásmidos pGJEY1 y pGJEY2; se indica el tamaño de las bandas esperadas. B) electroforesis de DNA en gel de agarosa donde se muestra el patrón de restricción de los plásmidos pGJEY1

(carril 1) con inserción polar y pGJEY2 (carril 2) con inserción no polar. digeridos con las enzimas *SphI* y *EcoRI*.

Una vez obtenidos los plásmidos éstos se linearizaron con la enzima *EcoRI* después de lo cual se transformaron células competentes de la cepa AEIV, seleccionando transformantes  $Sp^r$ .

En una primera ronda de transformación se obtuvieron candidatas *cbrA::Sp*, pero, contrario a lo esperado, su fenotipo no era de sobre-producción de alginato. Al amplificar por PCR el alelo *cbrA*, utilizando los oligonucleótidos *cbrA-F* y *cbrA-R*, pudimos constatar que dichas candidatas aún tenían copias silvestres del gen *cbrA* (se debe recordar que *A. vinelandii* es poliploide) (datos no mostrados). A raíz de esto se trató de segregar el alelo mutante resembrando estas cepas en cultivos con concentraciones crecientes de espectinomicina ( $Sp_{200}$  y  $Sp_{300}$ ); después de 6 resiembras sucesivas en estas concentraciones del antibiótico pudimos observar que las candidatas mostraban el fenotipo mucoide característico de la mutante *cbrA::Tn5* (GG15). Sin embargo, al extraer nuevamente DNA cromosomal seguía presentando bandas silvestres aunque en menor cantidad (Figura 14 ).

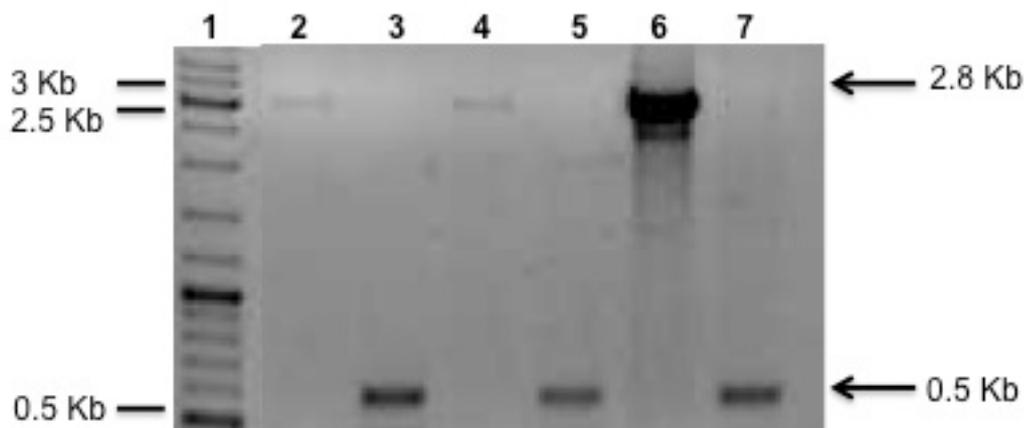


Figura 14. Electroforesis de DNA en gel de agarosa de los productos de PCR del alelo *cbrA* (fragmento de 2.8 kb) a partir de DNA cromosomal de las candidatas *cbrA::Sp* polar (carril 2) y no polar (carril 4), y de la cepa silvestre AEIV (carril 6). Como control positivo de la reacción de PCR se amplificó un fragmento del gen *rpoS* (0.5 kb) a partir de DNA cromosomal de la cepa *cbrA::Sp* polar (carril 3) y no polar (carril 5), y en la cepa silvestre AEIV (carril 7). Carril 1, Marcador de Peso Molecular de DNA (Fermentas).

Por otro lado, decidimos realizar una hibridación tipo *Southern* para tratar de estimar la cantidad de alelos silvestres contenidas en esas candidatas en relación con el alelo mutado. Para lograr este objetivo digerimos DNA cromosomal de las

candidatas *cbrA::Sp* polar y no polar con la enzima de restricción *SphI*, la cual nos permitiría distinguir un patrón de bandeo de los alelos mutantes de los silvestres.

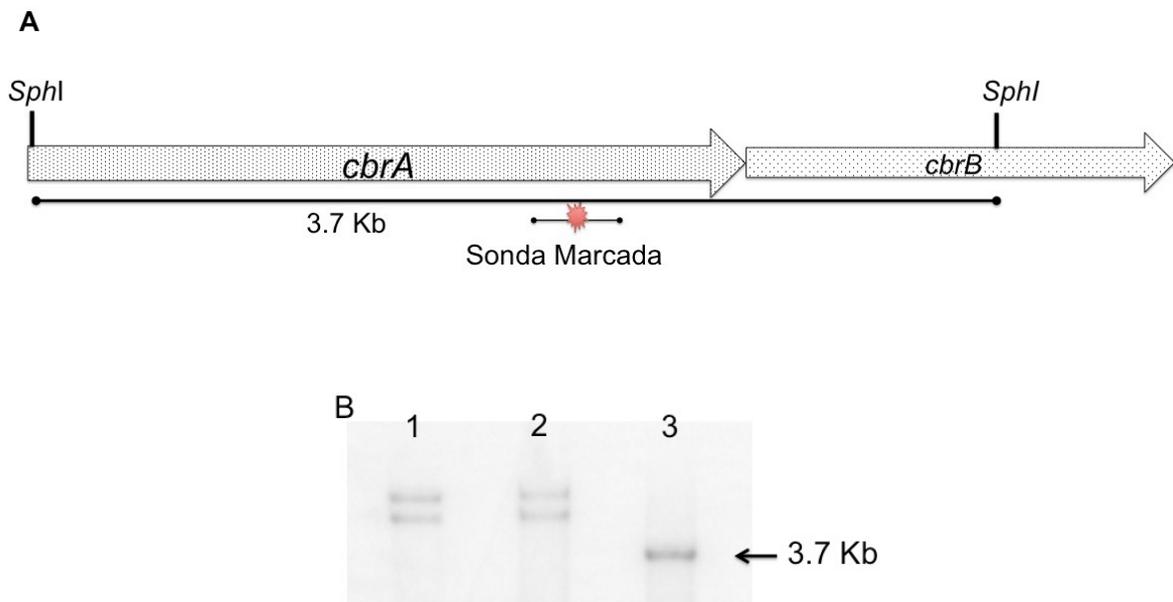


Figura 15. **A.** Mapa de restricción del locus *cbrA* de *A. vinelandii*. **B.** Autorradiografía de la hibridación tipo Southern del DNA cromosomal la cepa silvestre (carril 3) y de las mutantes *cbrA::Sp* polar (carril 2) y no polar (carril 1) digeridos con la enzima *SphI* y utilizando como probador un fragmento del gen *cbrA*.

En este ensayo de hibridación tipo Southern utilizamos como sonda un fragmento interno del gen *cbrA*. Como se puede ver en la Figura 15 no pudimos detectar bandas silvestres del gen *cbrA* en las candidatas *cbrA::Sp* polar ni en la no polar (Figura 15). Sin embargo, aun no sabemos el porqué obtuvimos bandas de mayor tamaño en ambas mutantes. Cabe mencionar que este experimento fue repetido dos ocasiones obteniendo el mismo patrón de bandeo. Por otro lado este resultado contrasta con lo obtenido mediante la amplificación por PCR del alelo silvestre *cbrA* e indica que la hibridación tipo Southern es un método menos sensible para la detección de fragmentos cromosomales en *A. vinelandii*. Asimismo es importante aclarar que esta reacción de PCR fue repetida en tres ocasiones diferentes, usando concentraciones iguales de DNA templado (200 ng) para las tres cepas (*cbrA* polar, *cbrA* no polar y silvestre), además de un control negativo (reacción sin DNA), el cual nos ayudó a descartar los falsos positivos que pudieran ocurrir.

En vista de que inicialmente no podíamos obtener el fenotipo de sobre-producción de alginato en las candidatas *cbrA::Sp*, simultáneamente decidimos re-construir la mutación *cbrA::Tn5*, a partir de un plásmido que porta la mutación *cbrA::Tn5*, y

verificar el efecto negativo de la cinasa histidínica CbrA sobre la producción de alginato. Esta construcción se describe en la siguiente sección.

### 7.2.2 Reconstrucción de la mutante *cbrA*::Tn5 con el plásmido pGG15.

Para reconstruir la mutante *cbrA*::Tn5 y proporcionar mas evidencias del efecto de CbrA sobre la síntesis de alginato, se transformó el plásmido pGG15 previamente linearizado con la enzima *Xho*I, a la cepa AEIV para después seleccionar transformantes Sp<sup>r</sup> en placas de medio BS. Cabe mencionar que el plásmido pGG15, lleva clonado un fragmento *Pst*I cromosomal de la mutante GG15 en donde se localiza el mTn5, flanqueado por 1 Kb de *cbrA* río arriba y 2 Kb río abajo. Las candidatas obtenidas de esta transformación las llamamos GG15-R y presentaron el mismo fenotipo hiper-mucoide que la GG15, lo cual nos indicó que efectivamente la mutación en *cbrA* es la responsable de la sobreproducción de alginato en esta cepa. Para comprobar que estas candidatas no presentaran alelos silvestres, se realizó una amplificación por PCR del gen *cbrA* a partir de DNA cromosomal, (Figura 16) sin que se detectaran alelos silvestres.

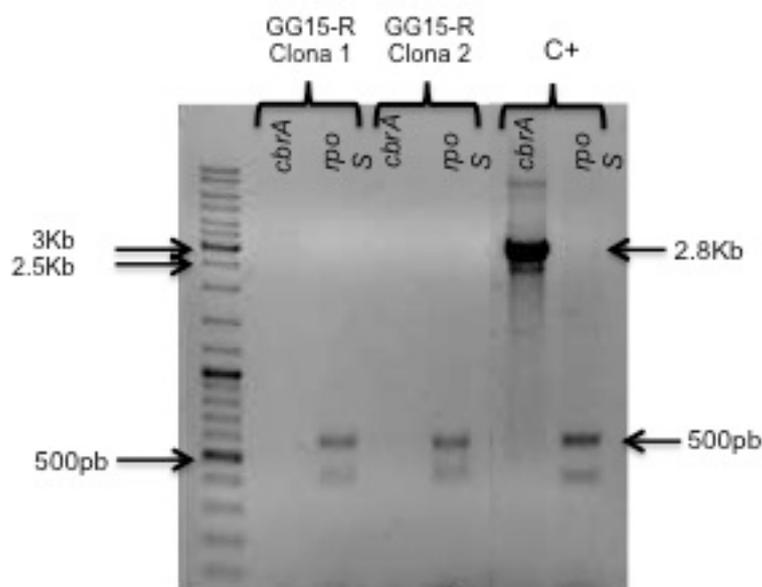


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen *cbrA* (2.8 kb) a partir de DNA cromosomal de la cepa GG15-R clona 1, GG15R clona 2 y de la cepa silvestre AEIV (C+). Como control de la reacción de PCR se amplificó un fragmento del gen *rpoS* (0.5 kb).

Una vez obtenidas estas mutantes (*cbrA*::SpP, *cbrA*::SpNP y GG15R) se procedió a la cuantificación de alginato para verificar el efecto de las mutaciones sobre la síntesis de este polímero. La cuantificación se realizó por triplicado a partir de

cultivos desarrollados en placas de medio Burk-Sacarosa crecidas durante 48 hr; los resultados se muestran en la Figura 17.

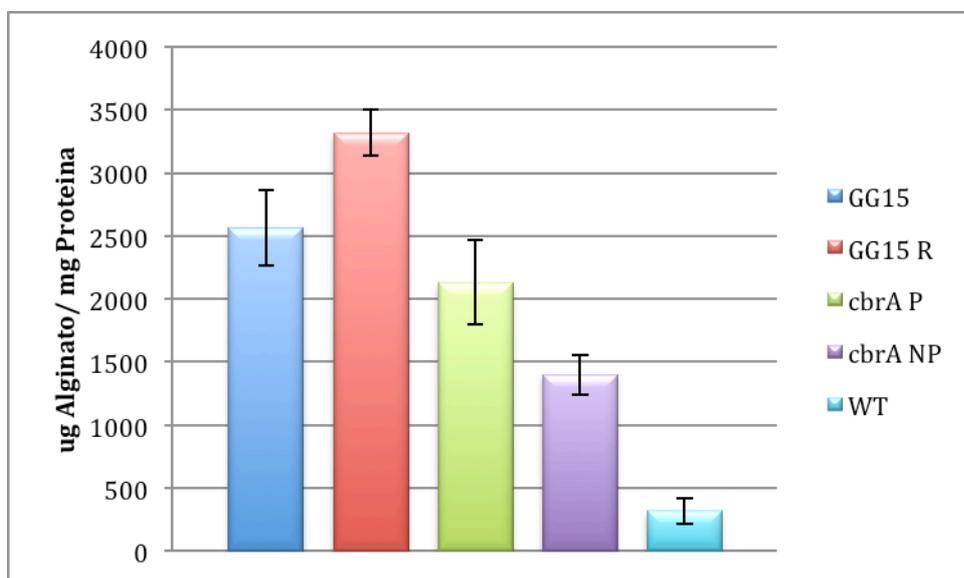


Figura 17. Cuantificación de alginato en placas de BS a las 48 hr de cultivo en distintas cepas de *A. vinelandii*: mutante GG15, mutante GG15 reconstruida (GG15-R), mutante *cbrA*::Sp con inserción polar (*cbrA* P), mutante *cbrA*::Sp con inserción no polar (*cbrA* NP) y la cepa silvestre AEIV (WT).

Como se muestra en la Figura 17 todas las mutantes exhiben un aumento muy claro en la producción específica de alginato con respecto a la cepa silvestre AEIV. Sin embargo el máximo aumento fue para las mutantes GG15 y GG15R las cuales exhiben niveles de producción de alginato muy similares, mientras que en las mutantes *cbrA*::Sp polar (*cbrA*P) y *cbrA*::Sp no polar (*cbrA*NP) dicho aumento fue menor. Estas diferencias pueden ser debidas al hecho de que las mutantes GG15 y GG15R no poseen copias silvestres del gen *cbrA* mientras que las mutantes *cbrA*::Sp polar y *cbrA*::Sp no polar todavía poseen copias silvestres de este gen, tal y como se indica en párrafos anteriores. Estos resultados nos indican que, efectivamente, en ausencia de la cinasa histidínica CbrA hay un aumento en la producción de alginato. Por otro lado, los resultados también sugieren que una inserción polar en el gen *cbrA* posee un efecto más marcado sobre la síntesis de alginato lo que indica que el efecto polar sobre genes río abajo de *cbrA* también contribuye al fenotipo de sobre-producción de alginato (este efecto polar sobre el gen *cbrB*, localizado río abajo de *cbrA* se investigó y los resultados se indican en la sección 6.8).

### 7.3 Construcción de una fusión transcripcional *pcrcZ-gusA* en el cromosoma de la cepa silvestre AEIV y en su derivada *cbrA::Sp P*.

Se decidió construir la fusión transcripcional en el cromosoma de *A. vinelandii* en el *locus* del gen *scrX*. El gen *scrX* (Avin51780) se encuentra río abajo del operón *ScrRBYP* para la asimilación de sacarosa. Previamente se reportó que la proteína ScrX no es necesaria para el crecimiento vegetativo, ni aun con sacarosa como fuente de carbono pues la mutante *scrX* no muestra ningún fenotipo aparente (Jonhson et al., 2006). Este gen, junto con la región aledaña se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *scrX-F* y *scrX-R* y se clonó generando el vector pEY01. Cabe mencionar que esta misma región se pudo amplificar a partir de DNA cromosomal de las cepas AEIV, ATCC906, UW136 y ATCC12518, lo que indica que esta región está conservada en *A. vinelandii* (datos no mostrados). Tal y como se describe en Materiales y Métodos se construyó el plásmido pEY05, reemplazando la región reguladora y parte de la región estructural de *scrX* con un fragmento de DNA que porta la fusión *pcrcZ-gusA* Tc<sup>r</sup> (Figura 18A). Para verificar la correcta construcción de este vector se realizó una amplificación por PCR del promotor de *crcZ* y parte del gen *gusA* contenidos en el plásmido, utilizando los oligonucleótidos U*cr*cZ-F2 y *gus*AR1 a partir de ADN plasmídico de tres clonas. A una de ellas se le llamó pEY05 y se seleccionó para trabajos posteriores(Figura 18B).

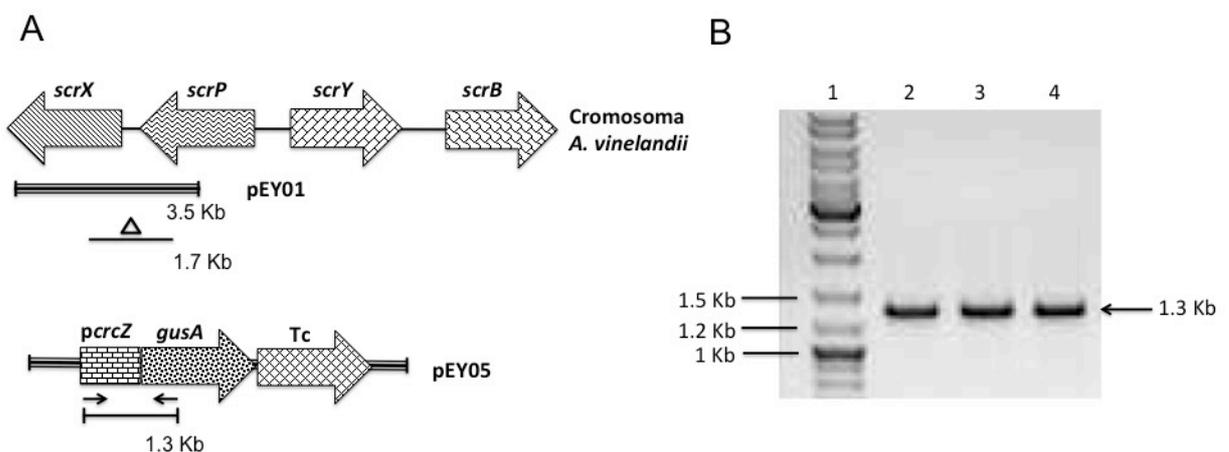


Figura 18. A. Representación esquemática del *locus* *scrX* y la construcción de la fusión transcripcional *pcrcZ-gusA*. B. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del arreglo *pcrcZ-gusA* (1.3 kb) de tres clonas con el plásmido pEY05 (carriles 2 - 4). Marcador de peso molecular (carril 1)

Posteriormente el plásmido pEY05 se linearizó con la enzima de restricción *XhoI* para transformar células competentes de *A. vinelandii*, tanto de la cepa silvestre AEIV como de la cepa mutante *cbrA::Sp* polar y se seleccionaron transformantes  $Tc^r$ , a las que se les llamó AE-Zgus y *cbrA*-Zgus, respectivamente. Para comprobar que la fusión transcripcional se encontraba cointegrada al cromosoma se amplificó por PCR un fragmento de 700 pb el gen *gusA* a partir de DNA cromosomal de estas cepas usando los oligonucleótidos *gusAF1* y *gusAR1* (Figura 19).

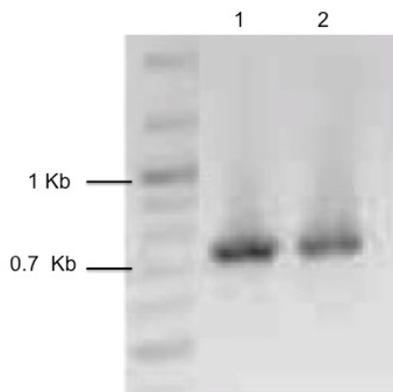


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del gen *gusA* (0.75 kb) a partir de DNA cromosomal de las cepas AE-ZGus (carril 1) y *cbrA*-ZGus (carril 2).

#### 7.4 Estudio del efecto de la Cinasa Histidínica CbrA sobre la transcripción del sRNA CrcZ.

Para poder comparar la expresión del promotor de *crcZ* tanto en la cepa mutante *cbrA::Tn5* como en la cepa silvestre, decidimos realizar una cinética de la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa a lo largo de la curva de crecimiento. Ambas cepas se crecieron por triplicado en medio mínimo Burk por 48 hr, los resultados de la cinética de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa y por ende de CrcZ se muestra en la Figura 20.

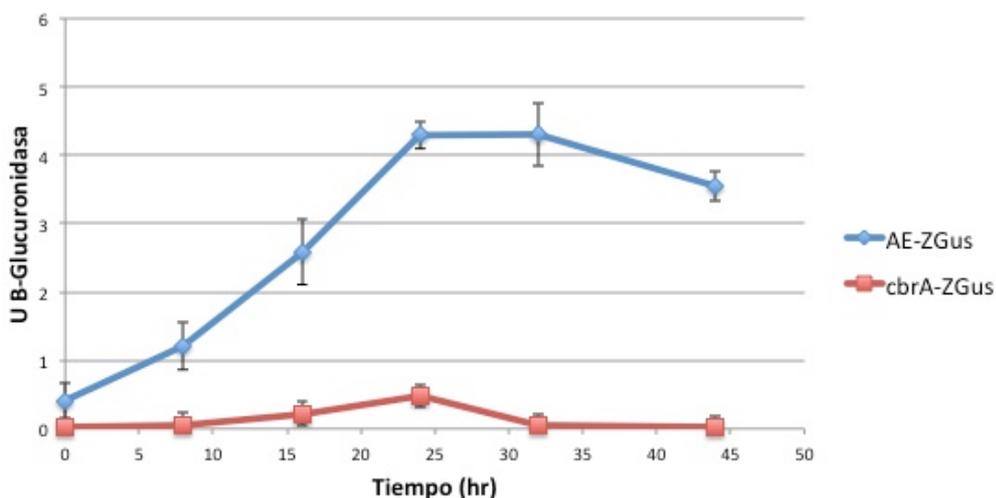


Figura 20. Cuantificación de la actividad del promotor de *crcZ* en la cepa silvestre AE-ZGus y en la cepa mutante *cbrA*-ZGus.

Como observamos en la gráfica de la Figura 20 la actividad del promotor de *crcZ* en la cepa silvestre AEIV muestra un incremento lineal durante las primeras 16 hrs de cultivo (fase exponencial), alcanzando un máximo a las 24 hr. Mientras tanto, en la mutante *cbrA-ZGus* dicha expresión se encuentra casi totalmente abatida a todo lo largo de la curva de crecimiento. Estos resultados concuerdan con el ensayo de Extensión del iniciador en donde la expresión de *crcZ*, a partir del promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  desaparece en la mutante *cbrA*. Así mismo estos datos indican de manera clara que la transcripción de *crcZ* se encuentra bajo la regulación del sistema de dos componentes CbrA/CbrB. En este contexto podemos proponer que CbrA se requiere para fosforilar al regulador de respuesta CbrB, el cual activa la transcripción del gen *crcZ* a partir del promotor  $\sigma^{54}$ .

### **7.5 El genoma de *A. vinelandii* posee un parálogo de CrcZ denominado CrcX.**

El análisis de la secuencia del genoma de *A. vinelandii* reveló la existencia de un gen parálogo a *crcZ* al que hemos denominado *crcX*. *crcX* se localiza río abajo de un gen que codifica una proteína hipotética (Avin04790). CrcX comparte un 67% de identidad con CrcZ de *A. vinelandii* y un 73% de identidad con CrcZ de *P. aeruginosa* (Figura 21). De igual manera, recientemente se identificó en *P. putida* un segundo sRNA parálogo a *crcZ* (*crcY*) también con la capacidad de contrarrestar la actividad de la proteína Crc. Sin embargo, la expresión de este segundo sRNA no es directamente dependiente del sistema de dos componentes CbrA/CbrB y su región reguladora carece de sitios de unión a la proteína CbrB (Moreno et al., 2011). De igual manera, en *A. vinelandii* el análisis *in silico* de la región reguladora de *crcX* no muestra sitios putativos de unión a CbrB, ni tampoco un promotor del tipo  $\sigma^{54}$ , lo que sugiere que la expresión de este sRNA no es dependiente del sistema de dos componentes CbrA/CbrB.

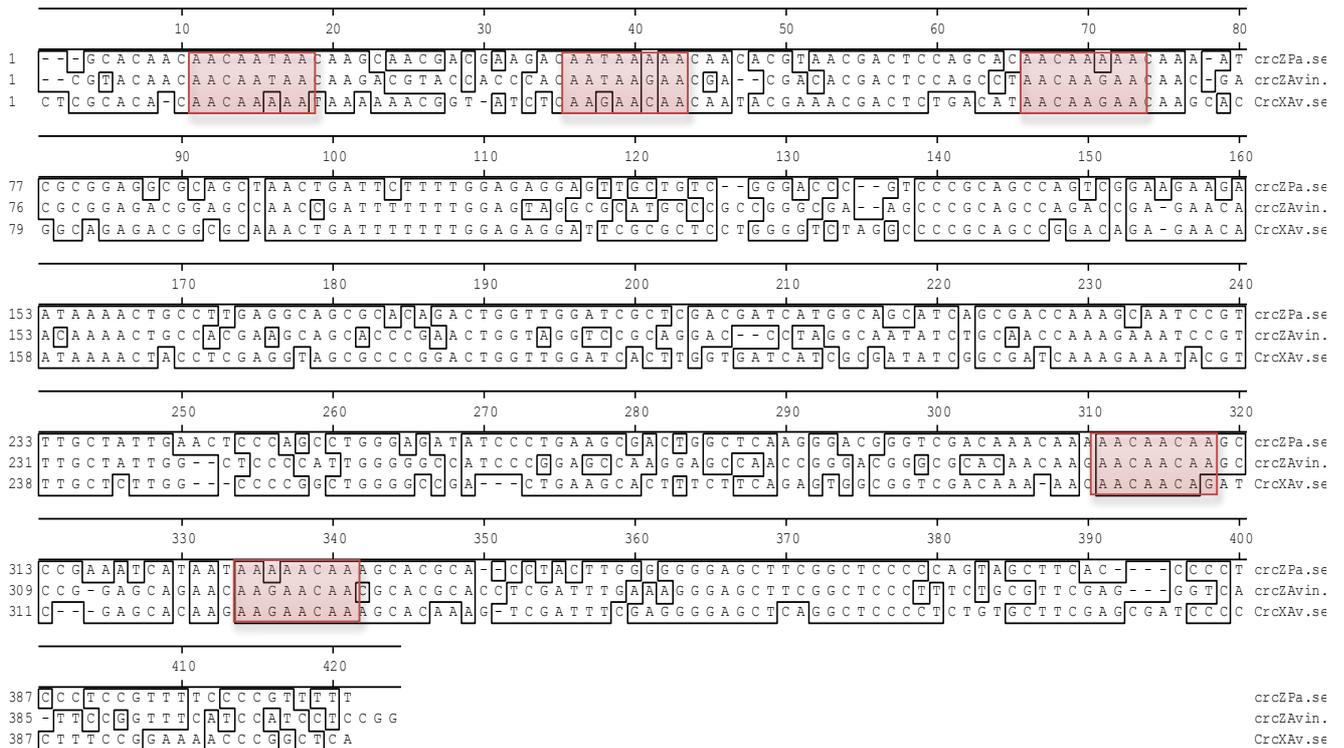


Figura 21. alineamiento de la región correspondiente a *crcZ* en *P. aeruginosa* (*crcZPa*), y *crcZ* y *crcX* en *A. vinelandii*.

## 7.6 Construcción de mutantes por inserción en los genes *crc* y *crcZ* para evaluar su efecto sobre la producción de alginato.

Una vez que establecimos que el TCS CbrA/B regula la expresión del gen *crcZ* nos propusimos investigar si el sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ en *A. vinelandii* controla la síntesis de alginato. Para este fin decidimos tratar de construir mutantes *crc<sup>-</sup>* y *crcZ<sup>-</sup>* de *A. vinelandii* derivadas de la cepa silvestre AEIV y evaluar el efecto de estas mutaciones sobre la síntesis de alginato.

### 7.6.1 Construcción de la mutante en *crcZ*.

Para construir una mutante en *crcZ* se amplificó por PCR un fragmento de 1800 pb el cual contenía al gen *crcZ*, 700 pb río arriba y 700 pb río abajo de este. Una vez clonado en el vector pTOPO TA se confirmó la ligación de este fragmento mediante PCR, generando el plásmido pTOPO*crcZ*. Este plásmido se utilizó como DNA molde para eliminar el gen *crcZ* (400 nucleótidos) mediante PCR inverso, utilizando los oligonucleótidos U*crcZ*-R y D*crcZ*-F, y clonar en su lugar un *casete* de Gm escindido con la enzima *SmaI* a partir del plásmido pBSL98 (Alexeyev et al., 1995). Al

plásmido resultante,  $Gm^r$ , se le denominó pEY04 y la construcción *crcZ*::Gm se confirmó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos U*crcZ*F2 y D*crcZ*R, amplificando una banda de 2.4 kb, que era el tamaño final del inserto en dicho plásmido (Figura 22).

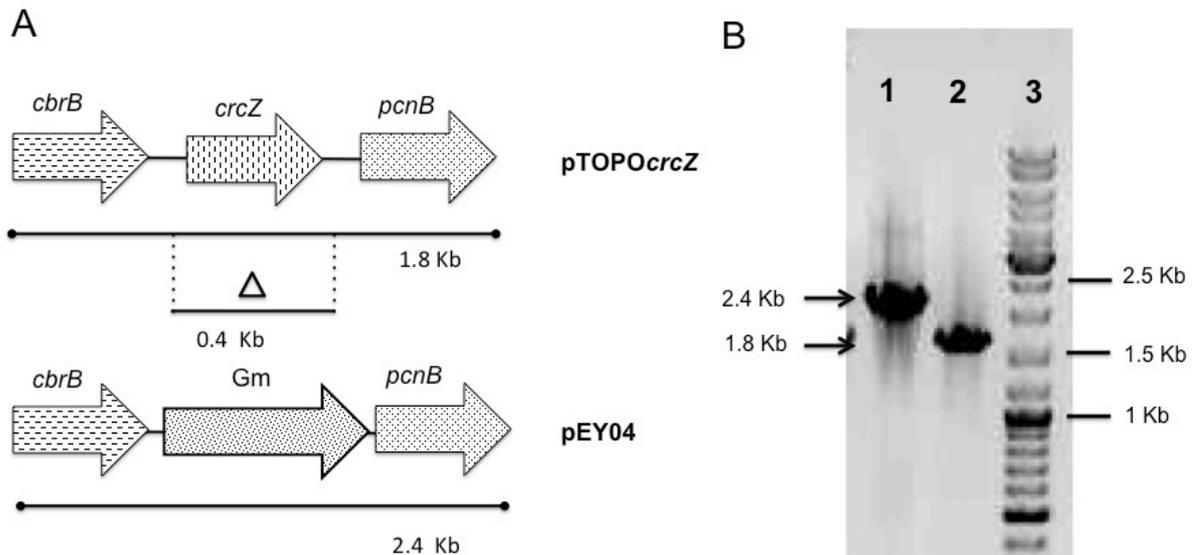


Figura 22. Construcción del plásmido pEY04 ( $\Delta$ *crcZ*::Gm) **A**. Representación esquemática del locus *crcZ* en los plásmidos pTOPO*crcZ* y pEY04. **B**. Electroforesis en gel de los productos de PCR para amplificar la construcción  $\Delta$ *crcZ*::Gm de 2.4 kb del plásmido pEY04(Carril 1) y el fragmento *crcZ* silvestre de 1.8 kb a partir del plasmido pTOPO*crcZ* (Carril 2). Marcador de peso molecular, Carril 3.

Con el plásmido pEY04 ( $\Delta$ *crcZ*::Gm), previamente linearizado con la enzima *Xho*I, se transformaron células competentes de la cepa AEIV; sin embargo, no se lograron obtener transformantes  $Gm^r$ , lo cual sugiere un papel esencial de *CrcZ* en el crecimiento vegetativo de *A. vinelandii*. Este experimento se realizó en mínimo tres ocasiones utilizando distintas fuentes de carbono, como sacarosa, glucosa, acetato además de amonio, sin que se haya logrado obtener transformantes. A pesar de que los resultados sugieren fuertemente que *crcZ* es esencial en el metabolismo de *A. vinelandii*, es necesario comprobarlo experimentalmente, lo cual podría hacerse expresando el sRNA bajo un promotor inducible e independiente, a la vez que se eliminen las copias silvestres del cromosoma. De esta manera si la cepa crece solo en condiciones de inducción se comprobaría la esencialidad de este sRNA.

### **7.6.2 Construcción de la mutante en *crc*.**

Como se indicó en Materiales y Métodos, en el laboratorio ya se contaba con un plásmido que porta la construcción *crc::Km*. Este plásmido se linearizó con la enzima *XbaI* y se procedió a transformar células competentes de la cepa AEIV en un mínimo de tres ocasiones. Durante estos intentos se utilizaron diversos medios de selección (Burk Sacarosa , Burk Glucosa, BS NH<sub>4</sub>, BS acetato, BS y BG con 32mM de MgCl<sub>2</sub>, PY Sacarosa) y en ninguna de ellas se obtuvieron transformantes. Este resultado sugiere fuertemente que, al igual que *crcZ*, el gen *crc* es esencial para el crecimiento vegetativo de *A. vinelandii*. Cabe mencionar que otras proteínas como Crc, las cuales bloquean la traducción de mensajeros, también han resultado ser esenciales para el metabolismo celular; tal es el caso de la proteína CsrA en *E. coli*, de la cual no se han logrado obtener mutantes nulas. Sin embargo, se ha abundado en el estudio de la cascada de regulación bajo el control de esta proteína gracias a una mutación “parcial” en ella (Romeo, 1998). Es por las razones antes mencionadas por las cuales proponemos la esencialidad de Crc en el metabolismo de *A. vinelandii*, ya que al ser un regulador global sobre la asimilación de fuentes de carbono, es muy probable que su inactivación cause una gran inestabilidad metabólica a la cual la bacteria no puede sobreponerse. Sin embargo, aun hace falta comprobar experimentalmente esta propuesta, evaluando, por ejemplo, el fenotipo de una mutante parcial en Crc, ya sea haciendo mutaciones puntuales en el sitio de unión al mRNA, o mediante una inserción hacia el extremo amino ó carboxilo terminal.

### **7.7 Sobreexpresión de los genes *crc* o *crcZ* y su efecto sobre la producción de alginato.**

Debido a que no fue posible construir mutantes en los genes *crc* y *crcZ* de *A. vinelandii* abordamos la estrategia de sobre-expresar estos genes con el propósito de evaluar su efecto sobre la síntesis de alginato. Se utilizó el vector llamado pSRK-Km (Khan et al., 2008) que posee un promotor *lacZ* inducible en presencia de IPTG. Sin embargo cabe aclarar que este vector no había sido probado anteriormente en *A. vinelandii* por lo que antes que nada procedimos a evaluar su funcionamiento.

### 7.7.1 Expresión controlada en *trans* de *gusA* en el vector pSRK (Km<sup>r</sup>) en el fondo de la cepa AEIV.

Como ya habíamos mencionado anteriormente decidimos probar este vector con promotor inducible en *A. vinelandii*, el cual a diferencia de otros vectores de este tipo, contiene el gen que codifica para el represor LacI, lo cual es muy importante en nuestro caso debido a que el genoma de *Azotobacter* carece este represor. Enseguida clonamos el gen reportero *gusA* como un fragmento *PvuII-SacI*, obtenido del plásmido pCN154 en los sitios *SmaI* y *SacI* del vector pSKR-Km bajo el promotor inducible con IPTG. Al plásmido resultante se le llamó pSRK-Gus y lo conjugamos a la cepa silvestre AEIV. La cepa transconjugante AEIV/pSRK-Gus se cultivó en placas de medio BS en presencia de cantidades crecientes de IPTG para evaluar si, efectivamente, el promotor inducible era funcional en *A. vinelandii*. Como se puede apreciar en la Figura 23, la cepa AEIV/pSRK-Gus solo muestra actividad de β-glucuronidasa en presencia de IPTG lo que indica que el promotor en el plásmido pSRK-Km se encuentra apagado en ausencia del inductor.

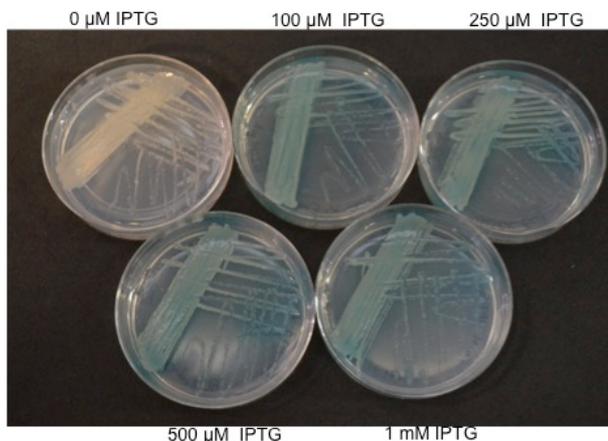


Figura 23. Cepa AEIV/pSRK-Gus en medio mínimo Burk Sacarosa con diferentes concentraciones de IPTG.

Sin embargo, era necesario saber el nivel de inducción que se presentaba el gen *gusA* a diferentes concentraciones de IPTG. Para ello realizamos una cinética de actividad de β-glucuronidasa a lo largo de un cultivo en medio líquido y a diferentes concentraciones de inductor (0, 100, 250 y 500 μM) (Figura 24).

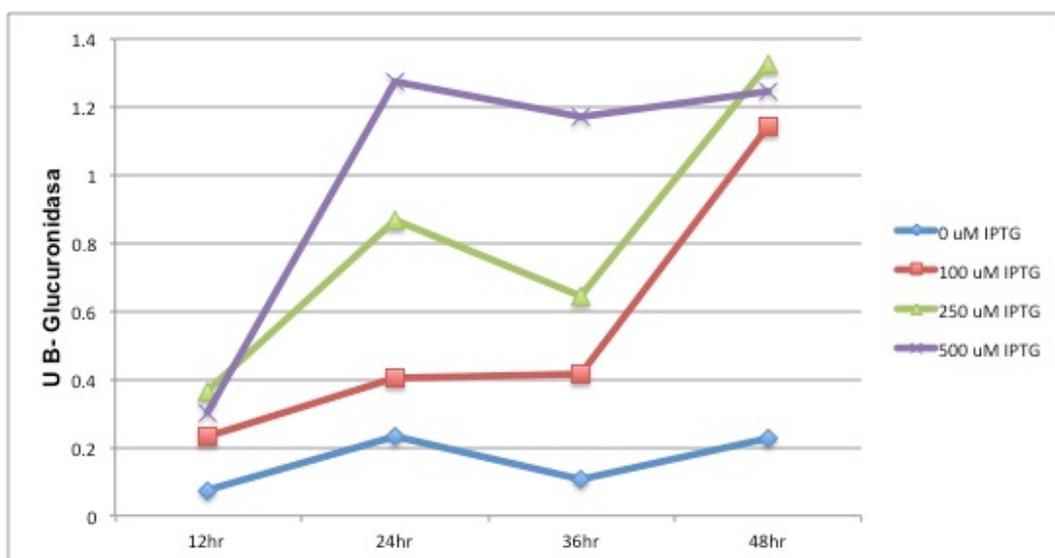


Figura 24. Cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -Glucuronidasa en la cepa AEIV/pSRK-Gus.

Los resultados de la Figura 24 indican que a concentraciones crecientes de IPTG la inducción del gen reportero aumenta a razón de 2 a 8 veces (dependiendo de la concentración), lo que nos indica que la expresión del gen clonado bajo este promotor puede ser inducida.

### 7.7.2 Expresión de *CrcZ* en el vector pSRK ( $Km^r$ ) en el fondo de la mutante *cbrA::Sp* polar.

Como se indicó anteriormente los resultados de expresión de *crcZ* revelaron que la transcripción de este gen se encuentra disminuida en la mutante *cbrA*. Para investigar si ésta era la razón de la sobre-producción de alginato, decidimos expresar el sRNA *CrcZ* en el fondo de la mutante *cbrA::Sp* polar. Nuestra hipótesis era que al aumentar los niveles de transcripción de *CrcZ* en la cepa mutante (los cuales comprobamos mediante las fusiones transcripcionales que se encuentra disminuidos), la síntesis de alginato se restauraría a niveles silvestres. Para este fin se construyó el plásmido pSRK-*crcZ* tal y como se describe en Materiales y Métodos y se conjugó a la cepa *cbrA::Sp* polar. Las transconjugantes fueron crecidas en medio BS sólido por 48 hrs como en los experimentos anteriores, se creció la cepa *cbrA::Sp* P/pSRK-*crcZ* en medio Burk Sacarosa con diferentes concentraciones de inductor (0, 100, 250, 500  $\mu$ M y 1 mM), donde observamos si el fenotipo que presentaba dicha cepa cambiaba (disminuía la síntesis de alginato) con diferentes concentraciones de inductor. Posteriormente cuantificamos la producción específica

de alginato de esta cepa a las 18 hr de crecimiento y a la mayor concentración de inductor (1mM). Como puede observarse en la Figura 25, la expresión en *trans* del gen *crcZ* en el fondo de la cepa *cbrA* no redujo la producción específica de alginato, lo que sugiere que CbrA ejerce el efecto negativo por una vía independiente a CrcZ. Sin embargo existe aun la posibilidad de que los niveles de expresión de CrcZ a partir del vector pRSK/*crcZ*, en el fondo de la mutante *cbrA::Sp*, sean insuficientes para alcanzar los niveles silvestres y poder evaluar de manera concluyente el efecto de CrcZ sobre la síntesis de alginato.

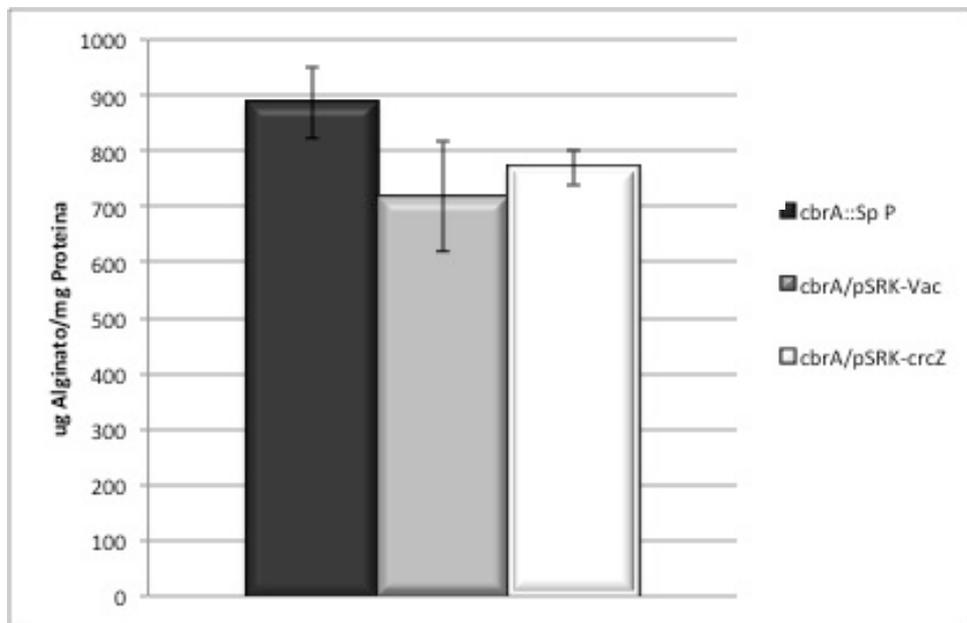


Figura 25. Producción específica de alginato en la cepa *cbrA::Sp polar/pSRK-Km*. Cepa *cbrA::Sp polar/pSRK-crcZ* en medio mínimo Burk Glucosa con diferentes concentraciones de IPTG.

### 7.7.3 Sobreexpresión de Crc en el vector pSRK (Km<sup>r</sup>) en el fondo de la AEIV.

El gen *crc* fue clonado en el vector pSRK-Km tal como se describe en Materiales y Métodos, generando el vector pSRK-*crc*. Este plásmido fue conjugado a la cepa silvestre AEIV y se indujo con 1mM de IPTG. El efecto de esta inducción sobre la síntesis de alginato se evaluó en placas de medio BS a las 18 hr de crecimiento. De acuerdo a nuestra hipótesis, un aumento en la concentración intracelular de la proteína Crc pudiera ser la razón del aumento en la síntesis de alginato en la cepa GG15. De esta manera esperaríamos que el incremento de la actividad de Crc,

debida a la expresión en *trans*, en el fondo genético de la cepa silvestre AEIV incrementaría la producción de alginato.

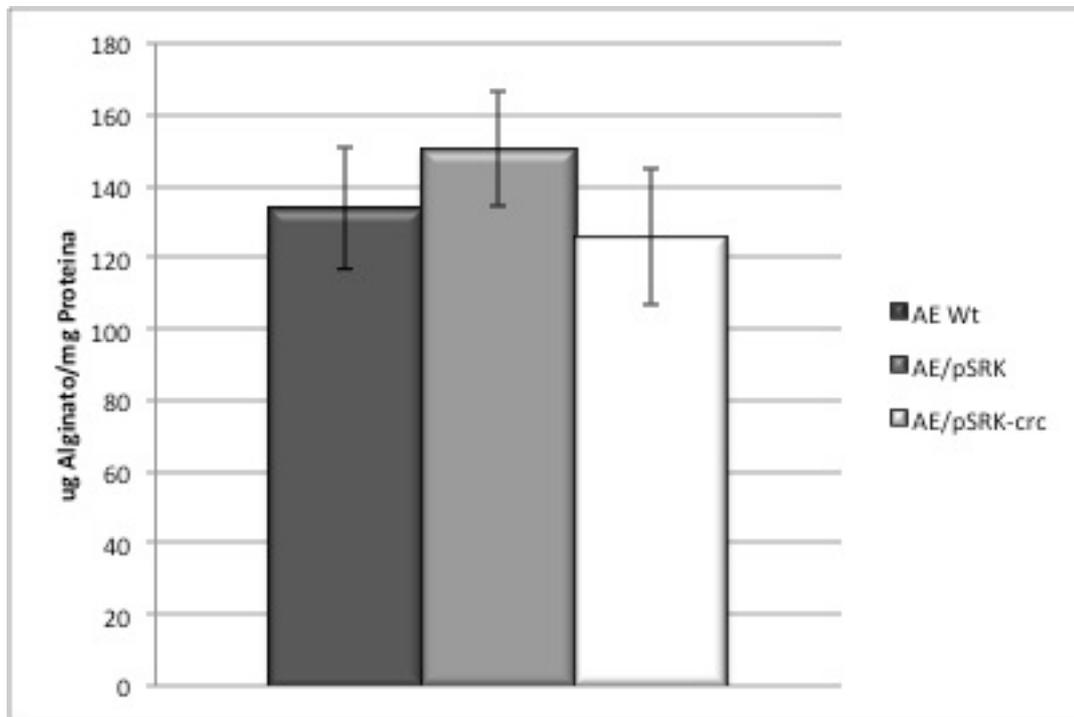


Figura 26. Producción específica de alginato en la cepa AEIV/pRSK-Km y AEIV/pRSK-crc en medio mínimo Burk Sacarosa con 1 mM de IPTG a las 24 hrs de crecimiento.

Después de permitir que la cepa creciera durante 18 horas se cuantificó la producción específica de alginato. Como se puede observar en la Figura 26, no detectamos diferencias significativas entre la cepa con el vector vacío y la que sobre-expresa Crc.

Para investigar si la proteína Crc verdaderamente se estuviera sobre-expresando a niveles lo suficientemente altos como para superar la actividad antagónica del sRNA CrcZ, crecimos esta misma cepa en medio Burk con glucosa como única fuente de carbono en presencia de 1 mM de IPTG. En el laboratorio tenemos evidencias que indican que la proteína Crc bloquea la utilización de glucosa muy probablemente al impedir la traducción del transportador de glucosa, llamado GluP. Es por esto que la mutante *cbrA* no puede utilizar glucosa en el crecimiento diauxico glucosa-acetato (Hernández, 2010). En concordancia con este antecedente la cepa AEIV/pSRK-crc mostró una inhibición del crecimiento en glucosa a las 18 horas de la incubación (Figura 27), lo cual nos indica que hay una expresión suficiente de Crc como para

superar la actividad antagónica de CrcZ y bloquear la asimilación de glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo este fenotipo se pierde después de las 24 horas de crecimiento, muy probablemente debido a que en cultivos tardíos la expresión de CrcZ aumenta (ver Figura 20), secuestrando a Crc y disminuyendo así su actividad.

Colectivamente estos resultados nos llevan a proponer que Crc no media el efecto negativo que ejerce CbrA sobre la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

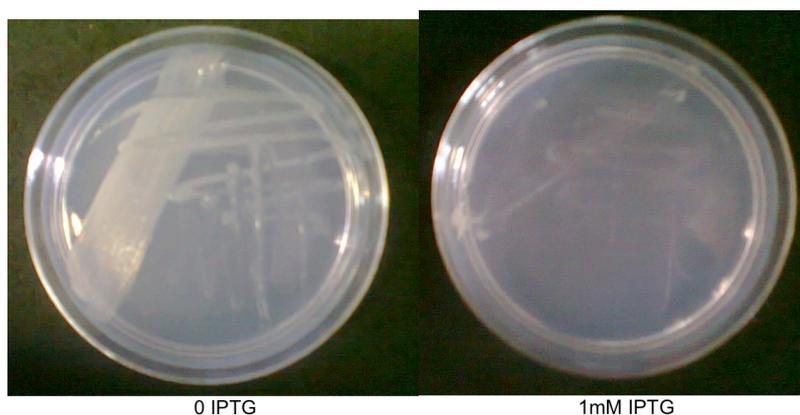


Figura 27. Cepa AEIV/pSRK-crc en medio mínimo Burk Glucosa con diferentes concentraciones de IPTG a las 18 horas de crecimiento.

#### 7.7.4 Expresión de Crc en el vector pBBRIMCS-2 ( $Km^r$ ) en el fondo de la AEIV.

El vector pBBRIMCS-2 se ha utilizado de manera rutinaria en nuestro laboratorio para la clonación y expresión en *trans* de genes para propósitos de complementación génica en *A. vinelandii*. La expresión de los genes clonados en este vector es constitutiva. Por tal razón construimos un vector derivado del pBBRIMCS-2 que porta el gen *crc* bajo su propio promotor; a este vector se le llamo pEY06. Se comprobó, mediante patrón de restricción que este vector portase el inserto correcto de 1.2 kb (Figura 28).

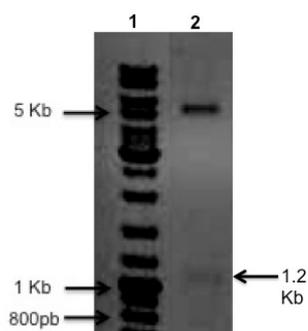


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la digestión del plásmido pEY06 con las enzimas *HindIII* y *SacI* con la cual se libera la banda de 1.2 kb del gen *crc* (Carril 2). Carril 1, . Marcador de peso molecular.

Después de comprobar la clonación, se conjugó este vector a la cepa AEIV. Posteriormente se determinó la producción específica de alginato.

La cuantificación de alginato se realizó a partir de cultivos desarrollados en placas de medio Burk sacarosa crecidas 48 hr. Las cepas de las cuales cuantificamos alginato fueron: la cepa silvestre AEIV, la cepa AEIV con el vector vacío y la cepa AEIV con el plásmido que porta el gen *crc*, expresado bajo su propio promotor. En la Figura 29 se muestra la comparación de la producción de alginato de las tres cepas antes mencionadas.

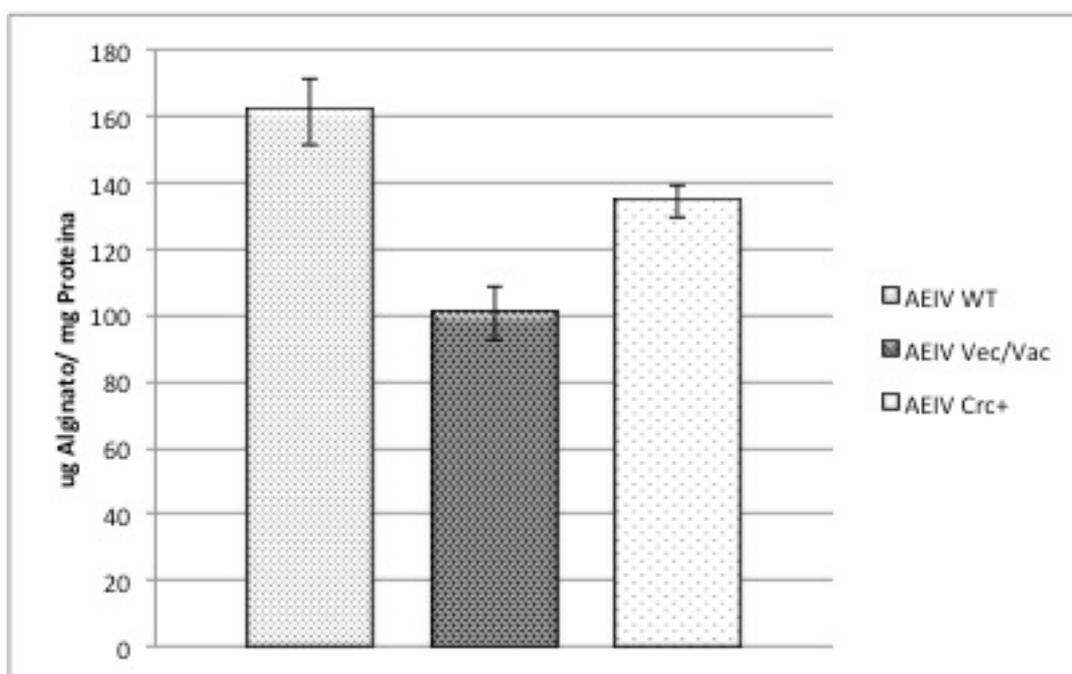


Figura 29. Cuantificación de alginato de la cepa que sobreexpresa *crc*: AEIV silvestre (AEIV WT), AEIV con el vector vacío ( AEIV Vec/Vac) y la cepa AEIV que sobreexpresa la proteína *crc* (*crc+*)

Aun cuando la cepa que sobre-expresa *Crc* produce 30% más alginato que la cepa que contiene el vector vacío (138 vs 100  $\mu\text{g}$  alginato/mg de proteína, respectivamente), este aumento en la producción no es significativo cuando se compara con el exhibido por la cepa GG15 (620  $\mu\text{g}$  alginato/mg de proteína). Por estas razones podemos concluir que un aumento en la actividad de *Crc* no es la causa del incremento en la producción de alginato en la mutante GG15 *cbrA* como lo planteábamos originalmente en la hipótesis.

Para corroborar que la proteína se estuviera sobreexpresando en el fondo de la AEIV, la crecimos en glucosa como única fuente de carbono, en donde observamos que la cepa que sobreexpresa *Crc* es incapaz de crecer (datos no mostrados), lo

que indica que, efectivamente, dicha proteína se está sobreexpresando. Sin embargo, el fenotipo de no crecimiento en glucosa de esta cepa es muy inestable, ya que a la segunda o tercera resiembra ya es capaz de crecer en glucosa; no sabemos si esto es debido a que la sobreexpresión de Crc causa una gran inestabilidad en el metabolismo celular y tal vez para compensar este incremento se sobre-exprese el sRNA regulador CrcZ.

### 7.8 Análisis del arreglo transcripcional y de la expresión del gen *cbrB*.

El gen *cbrB* se localiza río abajo de *cbrA* (Figura 30). Para investigar si CbrA y CbrB forman un operón, tratamos de amplificar la región intergénica *cbrA-cbrB* a partir de mRNA de la cepa silvestre AEIV mediante ensayos de reverso transcripción seguidos de PCR (RT-PCR) utilizando los oligonucleótidos *cbrA/B-F* y *cbrA\_Comp\_R*. El fragmento amplificado de 500 pb abarca una región del final de *cbrA* y del inicio de *cbrB* (Figura 30). Paralelo a esto decidimos usar otro par de oligonucleótidos de los cuales ya se había comprobado amplificaban una región cotranscrita (*eda-zwf*) como control positivo, tanto de la síntesis de cDNA, como de la reacción de PCR final (García, 2012). Cabe mencionar que se realizó un control sobre el RNA para asegurarnos que este ya no contuviera DNA que pudiera ocasionar falsos positivos en nuestra reacción de RT-PCR (datos no mostrados).

```

1  CCTCAATCTC TGGGATCCCG GCCACTGCGT GGTCGGCGAC CCTCAGCGGC TGGTGCAAGT
61  ACTGGTCARC CTGCTTTCCA AGCCCGCGA CGCCTCCCCT CCCGGCGGAG TCATCCGCGT
121 GCGCAGCGAG GCCGTGGAAC AGAGCATCGA CCTGATCGTC GAGGATGAGG GCAGCGGCAT
181 CCCCAGGGCC ATCGCCGGCC GTCTGTTTGA CCCCTTCTTC ACCACCAGG ACCCAGGCCA
      - 35                               - 10
241 GGGGACCGGC CTCGGCCTCG CACTGGTCTA TTCGATCGTG GAGAGCATT ATGGCCGGAT
301 CGCCGTCGAC AGCCCGGCCG ACCCCGAGCG GCACGCGGG ACCCGCATCC GGTCAACCCT
      stop cbr A                               cbr B
361 GCCACGGCAT GTCGACATGG CGCCGGTGCC GTGAGACCGT CGAGAGAGTC CGTCCGATGC
421 CACATATTCT GATCGTCGAA GACGAAACCA TCATCCGCTC CGCCCTGCGC CGCCTGCTGG
481 AACGCACCCA CTATCAGGTC AGCGAGGCCG GCTCGGTGCA GGAGCCCGG GAGCGCCACA
541 GCCTGCCCGG CTTGACCTG ATCATCA|

```

Figura 30. Secuencia de la región intergénica del locus *cbrA-cbrB*; en negritas se muestra el codón de paro TGA (“Stop”) del gen *cbrA*, al igual que el inicio de la transcripción del gen *cbrB* (ATG). Subrayados podemos observar las cajas -10 y -35 del posible promotor  $\sigma^{70}$  de *cbrB* y, al inicio y final de la secuencia, la región de los oligonucleótidos para amplificar este fragmento intergénico.

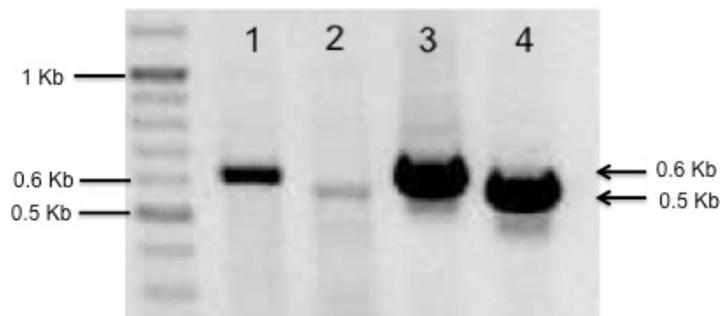


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR de la región intergénica de los genes *eddA-zwF* (carril 1), *cbrA-cbrB* (carril 2), y de los productos de PCR de las mismas regiones (carriles 3 y 4, respectivamente) a partir de DNA cromosomal.

Como podemos observar en la Figura 31, los resultados de ensayo de RT-PCR sugieren que los genes *cbrA* y *cbrB* forman un operón ya que se pudo obtener el producto de la región intergénica. Sin embargo, este resultado no descarta que el gen *cbrB* posea su propio promotor. A este respecto, anteriormente ya se había descrito un promotor  $\sigma^{70}$  río arriba de *cbrB*, el cual fue identificado mediante ensayos de extensión del iniciador en *P. aeruginosa* (Nishijyo et al., 2001). De manera interesante este mismo promotor está conservado en la región promotora de *cbrB* en *A. vinelandii* (Figura 30).

Con el fin de investigar si existía un efecto polar del mTn5 sobre la expresión de *cbrB* en la mutante GG15 se realizó una qPCR para el gen *cbrB* y así determinar los niveles de expresión que el gen tiene en la mutante GG15. Esta cuantificación se realizó por triplicado de dos muestras biológicas independientes, de las que se extrajo RNA de células en fase exponencial. Los resultados obtenidos mostraron valores muy bajos de expresión del gen *cbrB* en la cepa GG15 en comparación con la cepa silvestre (0.03 vs 1.0 Unidades de expresión relativa, respectivamente). Esto concuerda con el resultado de que el gen *cbrB* forma un operón con *cbrA* y sugiere que en nuestras condiciones de cultivo *cbrB* se expresa a partir del promotor río arriba de *cbrA* y no de su propio promotor. El fenotipo de la mutante *cbrB* (Bonilla 2010) es diferente al de la mutante GG15 ya que la primera crece muy mal tanto en medio mínimo como en medio rico, lo cual no sucede con la segunda. Esto indica que en la mutante GG15 la baja expresión de *cbrB* es suficiente y necesaria para un buen crecimiento en nuestras condiciones de laboratorio.

Por otro lado, nuestros resultados indican que el sistema de regulación postranscripcional Crc/CrcZ tiene un rol esencial en el metabolismo celular de *A. vinelandii*; esto debido a que no pudimos lograr mutantes nulas en estos genes.

Esto concuerda con el fenotipo de la mutante en el regulador de respuesta CbrB la cual tiene afectado el crecimiento celular (Bonilla, 2010), lo que se debe muy probablemente a que se abate la expresión de CrcZ. El sistema de dos componentes CbrA/CbrB en *P. aeruginosa* regula los flujos de carbono y nitrógeno, lo cual en parte es mediado por el sistema Crc/CrcZ (Nishijo et al., 2001; Rojo, 2010). En esta bacteria las mutantes *crc* o *crcZ* sí son viables. *A. vinelandii* es capaz de fijar nitrógeno, no así *P. aeruginosa*, lo que implica todo un mecanismo diferente de regulación de los flujos de carbono y nitrógeno. Tal vez esta sea la razón por la que los genes *crc* y *crcZ* son esenciales en *A. vinelandii*.

En el genoma de *A. vinelandii* existe un parólogo de *crcZ* al que hemos llamado *crcX*. El análisis de su región reguladora sugiere que su expresión es independiente del sistema de dos componentes CbrA/CbrB, ya que carece de un promotor  $\sigma^{54}$  y de los sitios putativos de unión a CbrB. Es muy probable que CrcX se exprese en condiciones diferentes a CrcZ lo que explicaría la esencialidad de CrcZ en nuestras condiciones de cultivo. Por ello surge la necesidad de investigar la expresión de *crcX* y si ésta depende o no de CbrA/CbrB. Sin embargo, aun es necesario demostrar de manera experimental que tanto *crc* como *crcZ* son esenciales en el metabolismo celular, lo cual podría ser comprobado expresando estos genes bajo un promotor independiente e inducible, además de eliminar el gen silvestre; de esta manera si la bacteria crece solo en condiciones de inducción se habrá probado la esencialidad de ambos genes. Por otro lado, se podría hacer uso de una fusión transcripcional de la región reguladora de *crcX* con el fin de demostrar que este sRNA no se está expresando en nuestras condiciones de laboratorio, lo que explicaría la dificultad de obtener la mutante en *crcZ*. Por otro lado, es importante investigar si la transcripción de *crcX* se encuentra o no, bajo la regulación del sistema de dos componentes CbrA/CbrB.

Colectivamente nuestros resultados indican que la hipótesis que habíamos planteado al inicio del proyecto no es correcta, ya que la sobreexpresión de la proteína Crc en el fondo de la cepa silvestre no mostró el aumento que esperábamos en la síntesis de alginato (diez veces mayor que la cepa silvestre). Por otro lado la expresión en *trans* del sRNA CrcZ en la cepa mutante *cbrA::Sp* no redujo la síntesis de alginato a niveles silvestres como fue propuesto en un inicio. Estos resultados nos permiten proponer que el control negativo de CbrA sobre la síntesis de alginato no es mediante el sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ.

Sin embargo, aún quedan la interrogante de cual es la vía por la que CbrA tiene un efecto negativo sobre la síntesis de alginato. Podemos proponer varias hipótesis a este respecto; Una posibilidad es que el regulador de respuesta CbrB esté involucrado en esta vía al activar la expresión de un gen cuyo producto sea un represor de la síntesis de alginato. La segunda posibilidad es que CbrA fosforile a un regulador de respuesta, diferente a CbrB, el cual estaría controlando negativamente la síntesis de alginato. Ya se ha documentado previamente que una cinasa histidínica puede fosforilar a dos reguladores de respuesta *bona fide* (Laub y Goulian, 2007). A este respecto, vale la pena recordar que en *P. aeruginosa* ya se han propuesto la existencia de vías de regulación encabezadas por CbrA que son dependientes o independientes del regulador de respuesta CbrB (Yeung et al., 2011). Para abordar la primera posibilidad es necesario realizar un análisis *in silico* en el genoma de *A. vinelandii* con el fin de encontrar los posibles blancos de regulación de CbrB. Como ya se mencionó anteriormente ya se tiene la secuencia consenso de unión para este regulador. Con esta estrategia esperaríamos identificar genes cuyos productos regulen negativamente la síntesis de alginato como los genes *mucABCD*, que codifican reguladores negativos del factor sigma AlgU, o el gen *rsmA* cuyo producto regula negativamente la traducción del mRNA de *algD*. Sin embargo, una búsqueda preliminar en la región reguladora de estos dos *loci* no mostró un sitio de unión a CbrB, lo cual sugiere que estos no son el blanco de regulación de este factor transcripcional. Es por esto que debemos tomar en cuenta la posibilidad de que CbrB active la expresión de un gen cuyo producto tenga un efecto negativo sobre la síntesis de alginato y que hasta el momento no haya sido caracterizado. Para tratar de identificar el posible represor que media el efecto de CbrA sobre la síntesis de alginato se podría realizar una mutagénesis al azar de la cepa *cbrA*<sup>-</sup> con un mTn5 y se identificarían derivadas en las que se restablezcan los niveles silvestres de alginato. La caracterización de estas derivadas nos ayudarían a esclarecer la vía de señalización de CbrA sobre la producción de alginato.

En el estudio de la vía de señalización de CbrA sobre la síntesis de alginato sería interesante determinar la actividad de reguladores globales de esta vía como el TCS GacS/GacA y el factor sigma AlgU. Esto se puede lograr mediante el uso de fusiones transcripcionales con *gusA* de genes controlados por estos dos reguladores (como *rsmZ2*, en el caso de GacS/GacA o *algC* en el caso de AlgU). Alternativamente, el uso de herramientas como Proteómica o Transcriptómica nos

ayudarían a conocer la función que tiene la cinasa histidínica en el metabolismo de *A. vinelandii* y a entender su efecto sobre la síntesis de alginato.

## 8. CONCLUSIONES

- El sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ en *Azotobacter vinelandii* no participa en la regulación de la síntesis de alginato. Esto implica que la cinasa histidínica CbrA controla de manera negativa la síntesis de alginato por una vía independiente a Crc/CrcZ
- El sistema de dos componentes CbrA/CbrB activa la transcripción del sRNA CrcZ
- El sistema de regulación postranscripcional Crc/CrcZ es esencial en *A. vinelandii*.

## 9. PERSPECTIVAS

- Investigar el efecto de la cinasa histidínica CbrA sobre reguladores de la síntesis de alginato (como GacA y AlgU) mediante el uso de fusiones transcripcionales con el gen *gusA*.
- Estudiar la función de la cinasa histidínica CbrA en el metabolismo de *A. vinelandii* mediante un análisis proteómico y transcriptómico utilizando la cepa silvestre y la mutante *cbrA*.
- Identificar intermediarios de la cascada de regulación de CbrA sobre la síntesis de alginato mediante mutagénesis al azar de la cepa *cbrA* en búsqueda de derivadas que muestren niveles silvestres en la producción de alginato.
- Identificar, mediante análisis *in silico*, los blancos de regulación de CbrB con el fin de investigar posibles intermediarios de la cascada de regulación de CbrA en la síntesis de alginato.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abdou, L., Chou, H. T., Haas, D., and Lu, C. D. (2011). Promoter Recognition and Activation by the Global Response Regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**, 2784-92.
- Bakkevig K, Sletta H, Gimmestad M, Aune R, Ertesvåg H, Degnes K, Christensen BE, Ellingsen TE, Valla S. (2005). Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *J Bacteriol*. 2005 Dec;187(24):8375-84.
- 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
- Bergey, D. H., Garrity, G.M., Boone, D.R., Castenholz, R.W., Brenner, D.J. (2001). "Bergey's manual of systematic bacteriology. ," New York.
- Bijlsma, J. J., and Groisman, E. A. (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* **11**, 359-66.
- Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* **54**, 484-9.
- Bonilla, F. (2010). Caracterización funcional del sistema de dos componentes CbrA/CbrB en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.
- Calva, E., and Oropeza, R. (2006). Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. *Microb Ecol* **51**, 166-76.
- Castañeda, M., Guzman, J., Moreno, S., and Espin, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **182**, 2624-8.
- Castañeda, M., Sanchez, J., Moreno, S., Nunez, C., and Espin, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**, 6787-93.
- Cimini, D., Rosa, M.D., Schiraldi, C. (2012). Production of glucuronic acid-based polysaccharides by microbial fermentation for biomedical applications. *Biotechnol J*. 2012 Feb;7(2):237-50. doi: 10.1002/biot.201100242. Epub 2011 Nov 29.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* **9**, 1-27.

- Ertesvag H, Hoidal HK, Hals IK, Rian A, Doseth B, Valla S. (1995). A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol*. 1995 May;16(4):719-31.
- Espin, G. (2003). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Instituto de biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. .
- Galindo, E., Pena, C., Nunez, C., Segura, D., and Espin, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* **6**, 7.
- Gao, R., Stock, A.M., (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:133-54.
- Gaona, G., Nunez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. S., Najera, R., Castaneda, M., Guzman, J., Espin, G., and Soberon-Chavez, G. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 199-206.
- García V., Velázquez C. Nuñez, C. (2012). 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.
- Gimmestad M, Steigedal M, Ertesvåg H, Moreno S, Christensen BE, Espín G, Valla S. (2006). Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases. *J Bacteriol*. 2006 Aug;188(15):5551-60.
- Guzman, G. (2001). Caracterización molecular de mutantes de *Azotobacter vinelandii* sobreproductoras de alginato. *Tesis de Licenciatura*, Instituto de Biotecnología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Hernández, R.M., Orive, G., Murua, A., Pedraz, J.L. (2010). Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Jun 15;62(7-8):711-30. Epub 2010 Feb 11.
- Hernández-Ortiz, A., Morales, E., Castañeda. M., Nuñez, C., Espín, G., (2010). Función de la cinasa histidínicas *CbrA* en el metabolismo de glucosa en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández-Ortiz, A., Nuñez, C., Espín, G., (2012). Estudio de la función de *GluP* en la utilización de glucosa y su regulación por el sistema *CbrA/CbrB* en *Azotobacter*

*vinelandii*. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Johnson DC , MC Unciuleac , Dean DR .(2006) Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* 2006 Nov;188(21):7551-61. Epub 2006 Aug 25
- Khan Sharik R., Gaines, Jennifer,R. Martin Roop II, and Stephen K. Farrand (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti Plasmid Quorum Sensing. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Aug. 2008, p. 5053–5062.
- Knutson CA, Jeanes A (1968) A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Anal Biochem.* 24:470–481
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd, and Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-6.
- Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni ME, Ramos JL.(2009). Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:539-59.
- Laub, M. T., and Goulian, M. (2007). Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *The Annual Review of Genetic.*
- Li, W., and Lu, C. D. (2007). Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 5413-20.
- 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-Yañez M, Tzontecomani T, Martínez VM, Bustillos R, Velásquez C, Goiz Y, Solís Y, López L, Fuentes LE, Núñez C, Segura D, Espín G, Castañeda M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2011;21(3-4):147-59. Epub 2012 Jan 31
- Martínez-Salazar JM, Moreno S, Nájera R, Boucher JC, 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.* 1996 Apr;178(7):1800-8.

- Metcalf, WW, W Jiang, LL Daniels, SK Kim, A Haldimann, BL Wanner (1996). Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying lacZ alpha for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid* 35(1):1-13.
- Moreno, R. Fonseca, P. Rojo, F. (2011). Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol*. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07912.x.
- Moreno, R., Marzi, S., Romby, P., and Rojo, F. (2009). The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* 37, 7678-90.
- Moreno, S., Najera, R., Guzman, J., Soberon-Chavez, G., and Espin, G. (1998). Role of alternative sigma factor *algU* in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 180, 2766-9.
- Nishijyo, T., Haas, D., and Itoh, Y. (2001). The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 40, 917-31.
- Núñez, C., Leon, R., Guzman, J., Espin, G., and Soberon-Chavez, G. (2000). Role of *Azotobacter vinelandii mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J Bacteriol* 182, 6550-6.
- Oglesby LL, Jain S, Ohman DE. (2008). Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*. 2008 Jun;154(Pt 6):1605-15.
- Potvin E, Sanschagrín F, Levesque RC. (2007). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Jan;32(1):38-55. Epub 2007 Dec 7.
- Rehm, B.H.A. (2008) Microbial Production of biopolymers and polymer precursors: Applications and perspectives. ed. **Bernd H.A. Rehm**; Horizon Bioscience, Caister Academic Press, in press.
- Remminghorst, U., and Rehm, B. H. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* 28, 1701-12.
- Remminghorst U, Rehm BH. (2006). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jan;72(1):298-305.
- Robles-Price A, Wong TY, Sletta H, Valla S, Schiller NL. (2004). AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2004 Nov;186(21):7369-77.

- Romeo T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* 1998 Sep;29(6):1321-30. Review.
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev.*
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* **39**, 516-39.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual," 2 nd/Ed., N.Y.
- Serrano, J. (2010). Efecto del sistema de dos componentes CbrA/CbrB sobre la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México .
- Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvag, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T. J., Latreille, P., Ligon, L. S., Lu, J., Maerk, M., Miller, N. M., Norton, S., O'Carroll, I. P., Paulsen, I., Raulfs, E. C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S. L., Studholme, D. J., Sun, J., Viana, C. J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D. R., Dixon, R., and Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* **191**, 4534-45.
- Sonnleitner, E., Abdou, L., and Haas, D. (2009). Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Vázquez, A., Moreno, S., Guzmán, J., Alvarado, A., Espín, G., (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLIVFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* **232**:217-222
- West, A. H., and Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-76.
- Yeung, A. T., Bains, M., and Hancock, R. E. (2011) The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**, 918-31.
- Zhang, X. X., Liu, Y. H., and Rainey, P. B. (2010). CbrAB-dependent regulation of *pcnB*, a poly(A) polymerase gene involved in polyadenylation of RNA in *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Microbiol* **12**, 1674-83.