



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DE
ALQUILRESORCINOLES POR LOS SISTEMAS Gac, Rsm, EL FACTOR SIGMA
RpoS Y EL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL ArpR EN *Azotobacter
vinelandii***

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

YANET ROMERO RAMÍREZ

TUTOR:

DR. DANIEL SEGURA GONZÁLEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ:

DRA. GLORIA SOBERON CHÁVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM
DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 <i>Generalidades de Azotobacter vinelandii.</i>	3
1.2 <i>Enquistamiento en A. vinelandii.</i>	3
1.3 <i>Producción y función de los alquilresorcinoles en A. vinelandii.</i>	4
1.4 <i>Ruta biosintética de los alquilresorcinoles en A. vinelandii.</i>	6
1.5 <i>Organización de los genes de biosíntesis de alquilresorcinoles en A. vinelandii.</i>	7
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.	
2.1 <i>Expresión del operón arsABCD.</i>	9
2.2 <i>ArpR y la familia de reguladores transcripcionales LysR.</i>	9
2.3 <i>Sistema de dos componentes GacS/GacA en A. vinelandii.</i>	10
2.4 <i>El factor sigma RpoS en A. vinelandii.</i>	11
2.5 <i>Sistema CsrA/CsrB (RsmA/RsmZ/RsmY) en A. vinelandii.</i>	12
2.6 <i>Regulación de los ARNs regulatorios por el sistema de dos componentes GacS/GacA.</i>	13
2.7 <i>ArpR, RpoS, GacA, RsmZ1 y RsmA controlan la síntesis de alquilresorcinoles.</i>	13
2.8 <i>ArpR, RpoS, GacA, RsmZ1 y RsmA regulan la expresión del operón de biosíntesis de alquilresorcinoles y del gen arpR.</i>	15
CAÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	
3.1 <i>Justificación</i>	17
3.2 <i>Hipótesis.</i>	17
3.3 <i>Objetivo general.</i>	18

3.4	Objetivos particulares.	18
-----	-------------------------	----

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1	Medios y condiciones de cultivo de las cepas de <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i> .	21
4.2	Construcción de las fusiones transcripcionales y traduccionales <i>parsA-gusA</i> y <i>parpR-gusA</i> .	21
4.3	Construcción de los plásmidos <i>pACYC/pKK-arsA</i> , <i>pACYC/pKK-arpR</i> , <i>pBAD-arpR</i> y <i>pBBR-arpR/His</i> .	23
4.4	Construcción del plásmido <i>pMAL-ArpR</i> y purificación de <i>MBP-ArpR</i> .	23
4.5	Cuantificación de proteína por método de Lowry.	24
4.6	Determinación de actividad de β -glucuronidasa.	24
4.7	Determinación de actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CAT).	25
4.8	Cuantificación de alquilresorcinoles.	25
4.9	Caracterización fenotípica sobre producción de alquilresorcinoles de las mutantes de <i>A. vinelandii</i> .	25
4.10	Purificación de ARN total de <i>A. vinelandii</i> .	26
4.11	Síntesis de ADN complementario.	26
4.12	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	26
4.13	Determinación del inicio de la transcripción.	27
4.14	Ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA).	27
4.15	Determinación de la constante de disociación (Kd).	27
4.16	Geles SDS-PAGE y Western blot.	28

CAPÍTULO 5. RESULTADOS.

PARTE I: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *arsABCD* Y DEL GEN *arpR*.

5.1	<i>ArpR</i> activa la transcripción del gen <i>arsA</i> .	29
5.2	<i>ArpR</i> se une a la región reguladora de <i>arsA</i> .	31
5.3	La expresión de <i>ArpR</i> se activa sólo en condiciones de enquistamiento.	32
5.4	<i>ArpR</i> activa su propia expresión.	33
5.5	<i>ArpR</i> autoregula su transcripción positivamente uniéndose a su región reguladora <i>arpR</i> .	35
5.6	Efecto de la mutación <i>rpoS</i> en la expresión del gen <i>arpR</i> .	36

PARTE II: REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *arsABCD* Y DEL GEN *arpR*.

5.7	El regulador de respuesta <i>GacA</i> actúa a través del sistema <i>RsmA/RsmZ</i> .	39
5.8	Los transcritos de <i>arsA</i> y <i>arpR</i> son un posible blanco del sistema	

	<i>RsmA/RsmZ.</i>	41
5.9	<i>GacA controla la producción de AR's por una vía adicional al control del sistema RsmA/RsmZ.</i>	44

PARTE III: IDENTIFICACIÓN DEL COINDUCTOR DE ArpR PARA ACTIVAR LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN *arsABCD*.

6.1	<i>Los reguladores globales RpoS, GacA, RsmA y RsmZ1 regulan la expresión de operón arsABCD a través de ArpR.</i>	46
6.2	<i>ArpR utiliza acetoacetyl-CoA para activar su propia expresión y la del gen arsA.</i>	49

	CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.	55
--	-------------------------------	----

	CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.	61
--	----------------------------------	----

	CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS.	62
--	----------------------------------	----

	CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA.	63
--	----------------------------------	----

	CAPÍTULO 10. APENDICE.	72
--	-------------------------------	----

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria que tiene la capacidad de llevar a cabo un proceso de diferenciación que resulta en la formación de quistes resistentes a la desecación. Durante el proceso de enquistamiento, ocurre un remplazo de los fosfolípidos por una familia de lípidos específicos denominados, Alquilresorcinoles. La ruta biosintética de los alquilresorcinoles ha sido establecida en *A. vinelandii* si embargo, poco se sabe sobre la regulación de los genes biosintéticos. Recientemente se observó que el regulador transcripcional ArpR y los reguladores globales GacA, RpoS, RsmA y RsmZ1 regulan la expresión de los genes involucrados en la síntesis de alquilresorcinoles, ya que mutantes inactivadas en estos reguladores afectan el fenotipo de producción de alquiresorcinoles. En este estudio proponemos un modelo de regulación en el cual, el regulador específico ArpR y los reguladores globales GacA, RpoS, RsmA and RsmZ1 están involucrados en el control de la expresión del operon *arsABCD*. Ensayos de cambios en la movilidad electroforética de la región reguladora utilizando ArpR y la inducción de la transcripción de *arsA* en *E.coli* en presencia de ArpR, confirmaron la activación directa de la expresión de *arsABCD* por este regulador. Se cuantificó la expresión de *arpR* a través de fusiones *arpR-gusA* integradas en el cromosoma, así como también, experimentos RT-PCR cuantitativo. Con estas metodologías se logró determinar la expresión del gen *arpR* en condiciones de inducción a enquistamiento y que al igual que otros reguladores de la familia LysR activa su propia transcripción. Ensayos *in vivo* induciendo la expresión de *arpR* y complementando con Acetoacetil-CoA en condiciones vegetativas, junto con ensayos tipo EMSA utilizando Acetoacetil-CoA, se logró demostrar que ArpR utiliza este intermediario del metabolismo del poli- β -hidroxibutirato como coinductor para activar la expresión del operón *arsABCD*. Al medir la expresión de *arsA* y *arpR* en cada una de las mutantes en los reguladores GacA, RpoS, RsmA y RsmZ mediante fusiones transcripcionales y traducionales *arsA-gusA* y *arpR-gusA*, se determinó que estos reguladores controlan la expresión de *arsA*, a través de regular la expresión de su activador directo ArpR y además, que los ARN mensajeros de *arpR* son un posible blanco directo de RsmA. La expresión de *arpR* en trans en cada una de las mutantes confirmó que RpoS regula la transcripción de *arpR* y que el sistema de dos componentes GacS/GacA se encuentra controlando la expresión de *arsA* a través de una vía adicional independiente de ArpR y del sistema Rsm. Nosotros sugerimos que podría ser a través de otro intermediario aún no identificado.

ABSTRACT

The bacterium *Azotobacter vinelandii* has been a model of study for various metabolic, genetics and physiological characteristics. Among these characteristics are: be able to undergoes encystment, a morphological differentiation process to form mature cysts resistant to desiccation, produces alginate and poly- β -hydroxybutyrate, polymers of industrial importance, and the ability to synthesize lipid specific of encystment: the alkylresorcinols. In order to investigate the regulation involved in the process of differentiation, we study the transcriptional regulation of the *arsABCD* operon, genes involved in synthesis of alkylresorcinols. These genes have been considered as reporters because its expression is correlated with the alkylresorcinols synthesis and the initiation of differentiation process. Recently was observed that the transcriptional regulator ArpR and global regulators as GacA, RpoS, RsmA and RsmZ1 controls the production of alkylresorcinols to regulate the expression of the biosynthetic genes, but without defining the relationship between all these regulators. In the present study we identify and propose a regulatory network in which ArpR, a specific regulator, and the global regulators GacA, RpoS, RsmA and RsmZ1 are involved in activate the expression of the biosynthetic operon *arsABCD*. We defined the hierarchical level in each of these regulators within the regulatory network. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and transcription induction of *arsA* in presence of ArpR in *E. coli* were performed to confirm that the direct activator of expression operon *arsABCD* is ArpR. We measured the *arpR* expression using a transcriptional fusion *arpR-gusA* integrated in chromosome as well as experiments of reverse transcription and real-time PCR (qRT-PCR). With these methodologies was possible to determine that *arpR* is expressed only during encystment process and like other transcriptional regulator LysR-type it activates its own transcription. *In vivo* assays inducing the expression of *arpR* in presence of acetoacetyl-CoA in vegetative conditions, together with electrophoretic mobility shift assay using acetoacetyl-CoA, showed that ArpR uses this intermediary of metabolism of poly- β -hydroxybutyrate as co-inductor to activate the *arsABCD* expression. We measured the *arsA* and *arpR* expressions using transcriptional and translational fusions with *gusA* as reporter. These fusions were integrated in chromosome of strains mutants in *gacA*, *rpoS*, *rsmA* and *rsmZ*, determining that these regulators control the *arsA* expression through regulating the expression of its direct activator, ArpR. Moreover, the mRNA of *arpR* is a possible direct target of RsmA. The expression of *arpR* from a plasmid in each of the mutants confirmed that RpoS regulates the *arpR* transcription and the two component system GacS/GacA is controlling the expression of *arsA* through an additional pathway independent of the Rsm system and ArpR. We suggest that it could be through another unidentified intermediary yet.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Azotobacteraceae. Es un organismo de células grandes y pleomórficas, variando desde formas ovals hasta bacilares de 1.5 a 2.0 μm de diámetro. El volumen celular de *A. vinelandii* en estado vegetativo puede alcanzar de 5 a 10 veces el volumen de *Escherichia coli* y se ha vinculado esta característica con su poliploidía, que alcanza hasta 80 copias de su cromosoma (Allison *et al.*, 1956; Espín, 2003). La reproducción de estos organismos se da por fisión binaria, su locomoción es por flagelos peritricos y habitan tanto en suelos como agua (Espín, 2003). Consumen sales inorgánicas, alcoholes y azúcares para su alimentación, característicos de un quimioorganotrofo. *A. vinelandii* tiene la capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de aerobiosis, pese a la alta sensibilidad de la nitrogenasa hacia el oxígeno. Esta propiedad es única dentro de los organismos quimioheterótrofos Gram negativos (Espín, 2003; Stanier *et al.*, 1996; Sadoff, 1975). Desde el punto de vista biotecnológico, *A. vinelandii* es una bacteria interesante por su capacidad de producir dos polímeros de importancia comercial, el poli- β -hidroxibutirato (PHB, poliéster intracelular) y el alginato (polisacárido extracelular). Esta bacteria presenta un ciclo de vida característico, presentando una fase vegetativa en la que se mueve mediante flagelos peritricos, y una fase de diferenciación morfológica y fisiológica en la que se forman quistes resistentes a la desecación que pueden permanecer en estado de latencia por largos periodos de tiempo (Lin y Sadoff, 1968; Sadoff, 1975; Sadoff, 2001; Vela, 1974).

1.2 Enquistamiento en *A. vinelandii*.

En cultivos de *A. vinelandii* creciendo en glucosa o sacarosa, el enquistamiento se da de manera natural cuando la bacteria llega a fase estacionaria tardía, aunque el porcentaje de enquistamiento es bajo (0.001%; Sadoff, 2001; Segura *et al.*, 2009). Sin embargo, el enquistamiento se puede inducir al transferir células vegetativas a un medio de cultivo con n-butanol o β -hidroxibutirato (BHB) como única fuente de carbono (Medio BOH, Lin y Sadoff, 1968; Reusch y Sadoff, 1979; Socolofsky y Wyss, 1962; Wyss *et al.*, 1969). Durante el proceso de enquistamiento las células pierden su locomoción y presentan una última división, adquiriendo una forma esférica. Se forma una cápsula alrededor de la célula y hay acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB), polímero de reserva que será utilizado en la germinación como fuente de carbono y energía. La cápsula que rodea al cuerpo central, está formada por una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina, ambas compuestas principalmente por alginato, lípidos y proteínas (Lin y Sadoff, 1969; Hitchins y Sadoff, 1970; Winogradski, 1983). El enquistamiento se lleva a cabo en 3 a 5 días, resultando en la formación de quistes maduros de un tamaño de 1.5 a 2 μm de ancho. Cuando el quiste maduro entra en una etapa de germinación, existe una depolimerización de PHB y posteriormente la célula se divide y al empezar a

crecer se fractura la exina y emergen dos células por cada quiste, perdiéndose de esta manera la cápsula (Jarman *et al.*, 1978; Wyss *et al.*, 1961).

El polímero extracelular alginato y el intracelular PHB son componentes principales del quiste (Fig. 1.1; Sadoff, 1975). Se ha determinado que el alginato es esencial para el proceso de diferenciación, dado que mutantes bloqueadas en la síntesis de este polímero son incapaces de producir quistes maduros resistentes a la desecación (Funa *et al.*, 2006; Gaona *et al.*, 2004; Núñez *et al.*, 2000; Núñez *et al.*, 2003); mientras que se ha observado una estrecha relación con el grado de síntesis de PHB y el porcentaje de enquistamiento (Hitchins y Sadoff, 1973; Segura *et al.*, 2003; Stevenson y Socolofsky, 1966), aunque la producción de este poliéster no es esencial para la formación de quistes maduros (Segura *et al.*, 2003).

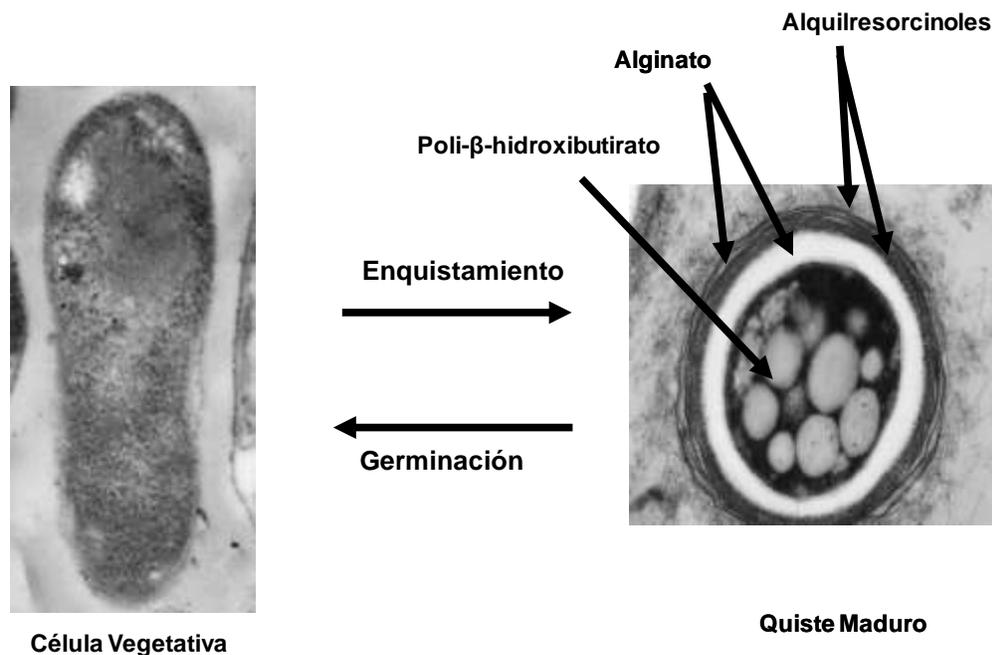


Fig. 1.1 Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*.

1.3 Producción y función de los alquilresorcinoles en *A. vinelandii*.

Durante el enquistamiento, hay un cambio de metabolismo de carbohidratos a metabolismo de lípidos que resulta en la formación de una familia de 5-n-alquilresorcinoles (AR's) y 6-n-alquilpironas (Reusch y Sadoff, 1983). Los ARs son lípidos fenólicos homólogos de orcinol (1-3 dihidroxi 5-metil benceno) de cadenas laterales largas. Este tipo de lípidos son muy raros en animales, pero han sido ampliamente estudiados en plantas, teniendo mayor incidencia en algunas familias como son: Ginkgoaceae, Anacardiaceae y Gramineae. También se han reportado en 5 familias de algas y hongos y se confirmó posteriormente la existencia de estos lípidos resorcinólicos en algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas*,

Mycobacterium, *Streptomyces* y *Azotobacter* (Kozubek y Tyman, 1999). Además de ARs, *Azotobacter* sintetiza durante el enquistamiento otros lípidos denominados 6-n-alkilpironas con cadenas laterales de 19 y 21 carbonos, las cuales, junto con los ARs, reemplazan los fosfolípidos de las membranas de las células vegetativas durante el proceso de enquistamiento (Reusch y Sadoff, 1979; Reusch y Sadoff, 1983), constituyendo ambos el 95% de lípidos en las membranas del quiste (Reusch y Sadoff, 1981; Reusch y Sadoff, 1983; Su *et al.*, 1981; Su y Sadoff, 1981). En *A. vinelandii* los ARs más abundantes son el 5-n-heneicosilresorcinol y el 5-n-tricosilresorcinol, que contienen cadenas de 21 y 23 carbonos respectivamente (en proporciones 7:1) y sus derivados galactosidados en la misma proporción (Reusch y Sadoff, 1979). Las alkilpironas identificadas son la 6-heneicosil-4-hidroxi-2-pirona y 4-hidroxi-6-(2'-oxotricosil)-2-pirona (Funa *et al.*, 2006; Reusch y Sadoff, 1983). La producción de ARs, se puede cuantificar por un método químico-espectrofotométrico utilizando una solución reactiva de "Azul Rápido B" específica para ARs (Tluscik *et al.*, 1981). Este mismo reactivo puede usarse para observar la producción de estos lípidos de manera cualitativa en placas de cultivo, por la coloración roja que produce (Segura *et al.*, 2009).

La síntesis de ARs en *A. vinelandii* se induce durante el enquistamiento, su producción se observa únicamente en los cultivos crecidos en medio de inducción de enquistamiento (medio Burk butanol, BOH; Figura 1.2). La cinética de producción de ARs correlaciona con la formación de quistes en el cultivo (porcentaje de quistes maduros y resistentes a desecación; Segura *et al.*, 2009).

La presencia de ARs en la membrana de los quistes cambia las propiedades fisicoquímicas de ésta, precisamente por contener cadenas alifáticas largas que hacen que estos lípidos sean prácticamente insolubles en agua, por lo que se ha propuesto que favorecen la resistencia a la desecación de los quistes (Kozubek y Tyman, 1999; Parker y Socolofsky, 1966); sin embargo, pruebas de resistencia a desecación utilizando mutantes en los genes biosintéticos de ARs han mostrado que estos lípidos no contribuyen de forma significativa a la resistencia a falta de agua de los quistes, al menos en condiciones de laboratorio (Segura *et al.*, 2009).

Se ha determinado que los ARs tienen un papel estructural dentro del quiste, dado que los quistes de mutantes incapaces de producir ARs presentan una cápsula (exina) desestructurada en comparación con los quistes de las cepa silvestre. La cápsula de las mutantes se observa desorganizada o se llega a perder por completo. Las laminillas que se observan en la cápsula de los quistes silvestres, y que están constituidas por ARs, desaparecen en la cepa mutante (Segura *et al.*, 2009). Se observó también que los quistes de las mutantes se aglutinan de manera que forman agregados por uniones entre las cápsulas, por lo tanto los ARs son componentes estructurales importantes de la cápsula (Segura *et al.*, 2009).

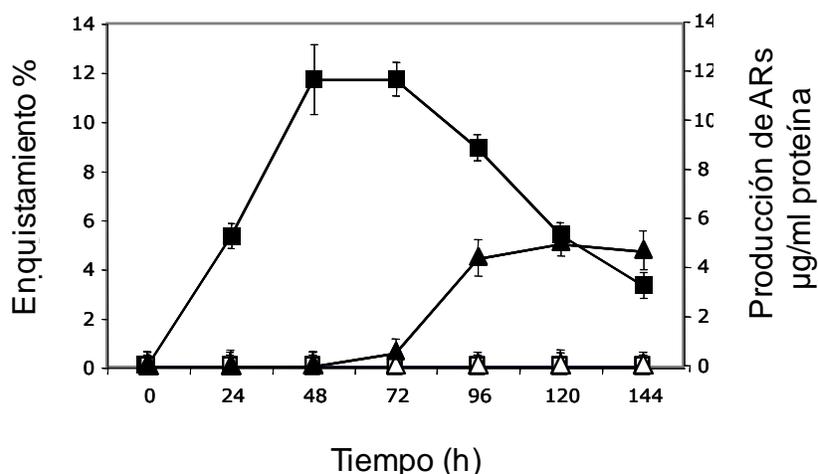


Fig. 1. 2 Producción de alquilresorcinolos y enquistamiento en la cepa SW136. ARs en medio BS (□) y BOH (■). Enquistamiento en BS (△) y BOH (▲). Segura *et al.*, 2009.

1.4 Ruta biosintética de los alquilresorcinolos en *A. vinelandii*.

Funa y colaboradores (Funa *et al.*, 2006) propusieron una ruta de síntesis de alquilresorcinolos en *A. vinelandii* donde interviene un grupo de proteínas denominadas ArsA, ArsB, ArsC y ArsD. ArsA cataliza la síntesis de una molécula de 22 carbonos, el n-behenil-CoA a partir de una unidad iniciadora de acetyl-CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA. El n-behenil-CoA es utilizado como sustrato por ArsB para sintetizar, junto con malonil-CoA, los 5-n-heneicosilresorcinolos por condensación aldólica entre C2 y C7, o bien, por ArsC para la formación de 6-n-alquelpironas. ArsD catalizaría la modificación postraduccional del dominio ACP (proteína acarreadora de acilos) de la proteína ArsA, uniendo covalentemente un "brazo" de 4-fosfopanteteína proveniente de coenzima A, para de esta manera hacer funcional a ArsA para aceptar a sus sustratos (Fig. 1.3; Funa *et al.*, 2006; Miyanaga *et al.*, 2008).

La figura 1.3 esquematiza además de la síntesis de ARs, el metabolismo central, el metabolismo de los inductores del enquistamiento y la ruta de biosíntesis PHB en *A. vinelandii*. Se observa de donde proceden los sustratos para la síntesis de los lípidos fenólicos y alquelpironas (APs), el acetyl-CoA y malonil-CoA, así como también, del coinductor acetoacetyl-CoA.

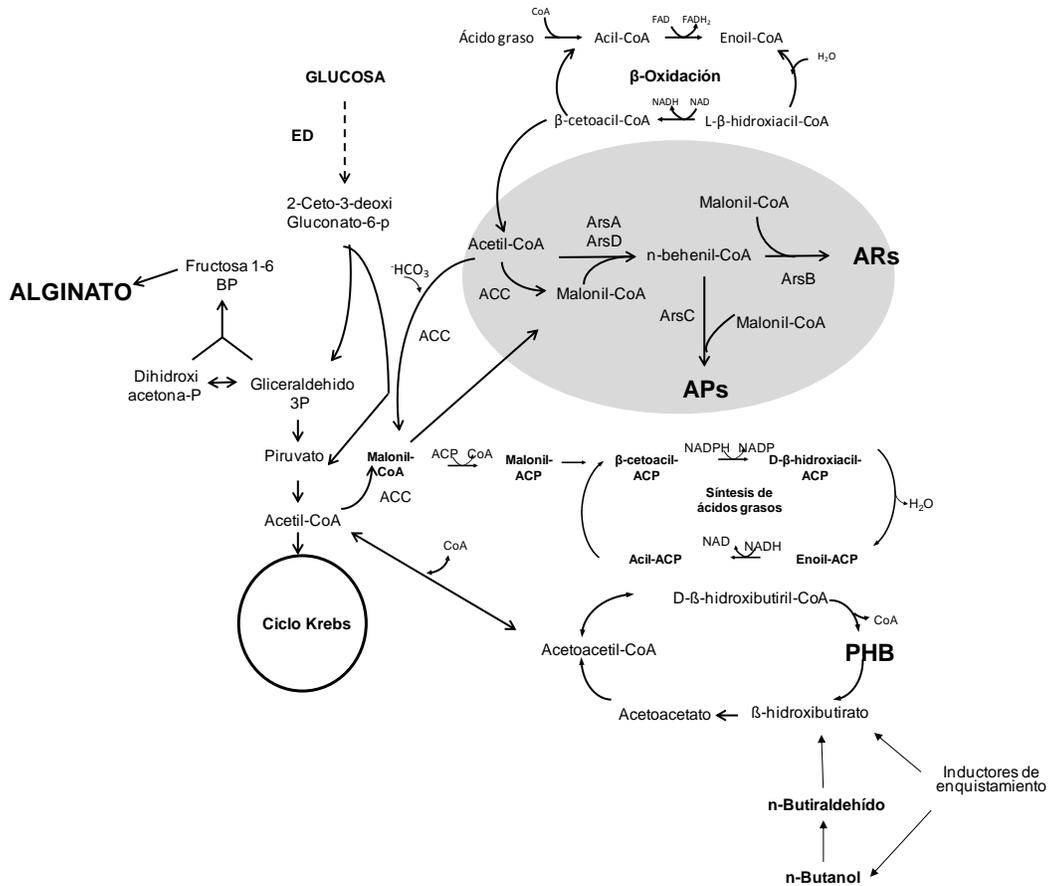


Fig. 1.3. Metabolismo central y rutas de biosíntesis de ARs y PHB.

1.5 Organización de los genes de biosíntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii*.

En el laboratorio, de manera simultánea al grupo de Funa *et al.*, (2006), se identificaron los genes involucrados en la síntesis de ARs a través de mutagénesis de *A. vinelandii* con el transposón Tn5*gusA40*. Se localizó un grupo de 11 genes que intervienen en la síntesis de alquilresorcinoles (Segura *et al.*, 2009; Vite, 2003). A estos genes se les llamó coincidentemente *ars* (alkyl resorcinol synthesis, fig. 1.4). Dentro de este grupo se encuentran los genes *arsABCD* reportados por Funa *et al.*, (2006). El gen *arsA*, que codifica para una sintasa de ácidos grasos tipo I modular en la cual se identificaron los dominios de enoil reductasa, β-cetoacil sintasa, acil transferasa, un dominio de proteína acarreadora de acilos (ACP) y uno semejante a alcohol deshidrogenasa. Los genes *arsB* y *arsC* codifican para las policétido sintasas tipo III, comunes en plantas, y actualmente se han comenzado a caracterizar en algunos géneros de bacterias (Jarman *et al.*, 1978). *arsD* codifica para una 4-fosfopanteteinil transferasa (Funa *et al.*, 2006). Se ha sugerido que estos cuatro genes están organizados en un operón (Operón *arsABCD*, Fig. 1.4, Funa *et al.*, 2006).

Nosotros adicionalmente identificamos los genes *arsE-K*. Las proteínas ArsE y ArsF tienen similitud con transportadores tipo ABC, ArsG y ArsH son proteínas hipotéticas de función desconocida. ArsI presenta similitud con glicosil transferasas y ArsJ con un dominio de acil transferasa de sintasas de ácidos grasos o policétido sintasas diversas. ArsK tiene un péptido señal que podría ser utilizado para dirigir esta proteína a través de la membrana celular (Vite, 2003). Para el resto de los genes de este grupo (de *arsE* a *arsK*) no se ha determinado su organización genética ni función; sin embargo, se tiene la hipótesis que codifican para proteínas que estarían involucradas en la modificación de los ARs sintetizados y en su transporte hacia la cápsula (Romero, 2008; Segura *et al.*, datos no publicados).

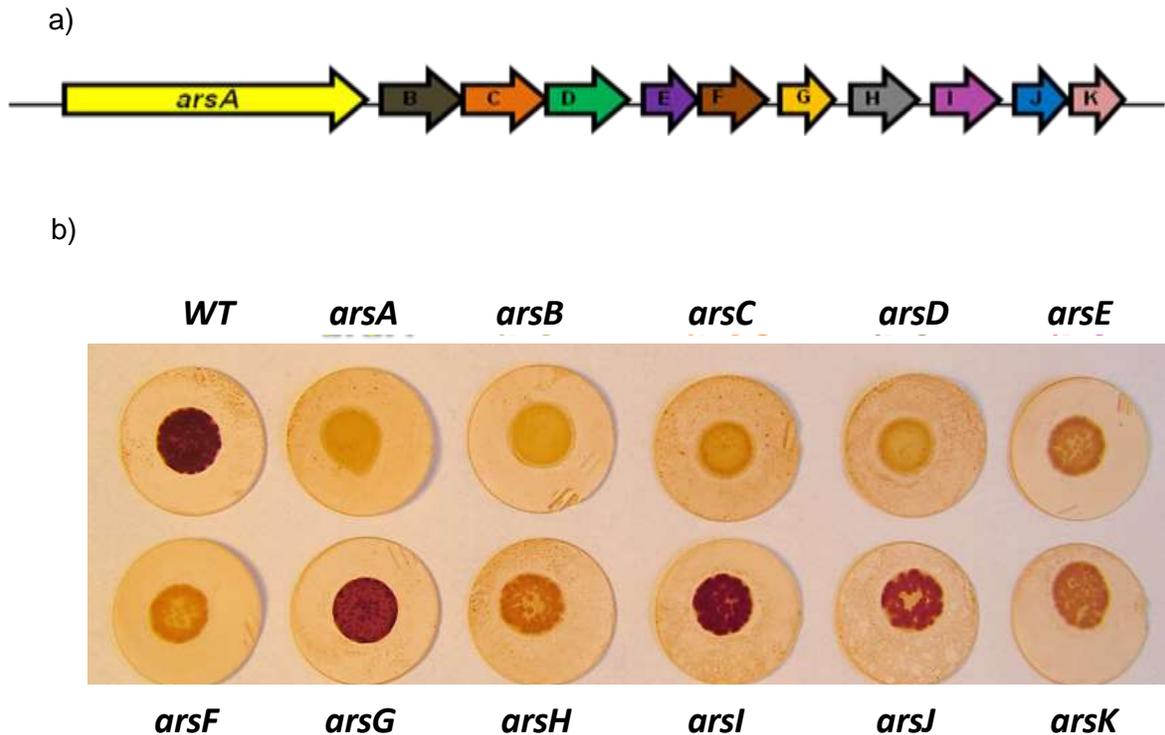


Fig. 1.4. Distribución de los genes de *A. vinelandii* que intervienen en la síntesis, modificación y transporte de ARs (a) y Fenotipos de producción de ARs de mutantes obtenidas en fondo SW136 (b).

La inactivación de los genes biosintéticos *arsABCD* abate la síntesis de estos lípidos, como era de esperarse, mientras que la inactivación de los genes *arsE* a *arsK* provoca efectos parciales negativos o positivos en la síntesis de estos lípidos fenólicos, lo que muestra su participación en el metabolismo de ARs (Segura *et al.*, datos no publicados).

CAPÍTULO 2.

ANTECEDENTES

2.1 Expresión del operón *arsABCD*

El gen *arsA* encabeza al operón *arsABCD*, involucrado en la síntesis de ARs (Fig. 1.4). Este gen junto con *arsD* codifican para una enzima sintasa de ácidos grasos tipo I, Funa *et al.*, 2006; Miyanaga *et al.*, 2008). Al estudiar su expresión (Segura *et al.*, 2009; Fig. 2.1), se observó que su transcripción y la producción de ARs son procesos que se llevan a cabo en aquellas células que entran en el proceso de diferenciación. Bajo condiciones de crecimiento vegetativo en medio Burk sacarosa (BS) *arsA* se expresa únicamente cuando el cultivo se ha incubado por largos periodos de tiempo, cuando algunas células comienzan a enquistarse (menos del 0.001%). Bajo estas condiciones, la expresión de *arsA* aumentó sólo 14 veces a las 120 horas de incubación con respecto al nivel de expresión inicial. En cambio, en medio de enquistamiento (BOH), la expresión de *arsA* se indujo antes de las 24 horas de incubación, incrementando su expresión de más de 400 veces a las 72 horas; posteriormente se observó un decremento en la expresión (Fig. 2.1, Segura *et al.*, 2009).

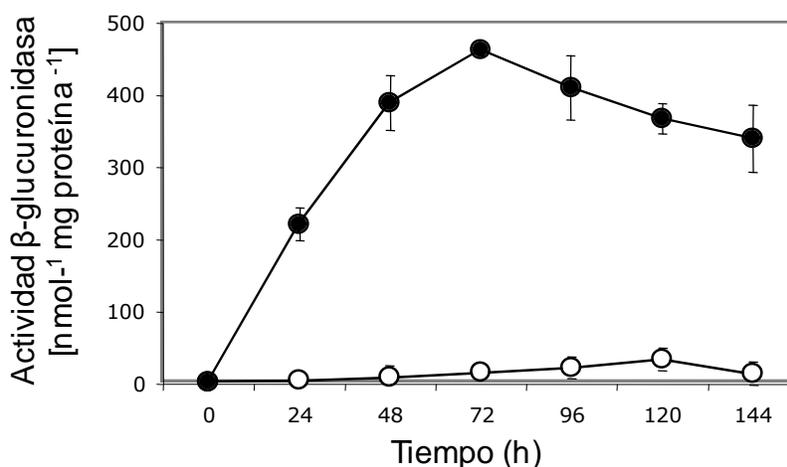


Fig. 2.1 Expresión del gen *arsA* en la cepa OV11. Actividad de β-glucuronidasa de una fusión transcripcional *arsA::uidA* en medio BS (○) y BOH (●). Segura *et al.*, 2009.

2.2 *ArpR* y la familia de reguladores transcripcionales *LysR*.

En *A. vinelandii* además del grupo de genes involucrados en la síntesis, modificación y transporte de los ARs, fue identificado el gen *arpR*. Éste se encontró al realizar una mutagénesis al azar con un minitransposón Tn5 en la que se aisló una cepa incapaz de producir ARs (Vite, 2003). El gen *arpR* codifica para la proteína ArpR, de 35 kDa, que presenta hasta un 75% de identidad con proteínas reguladoras de la familia *LysR*. Los reguladores transcripcionales de la

familia LysR (LTTRs) son los más comunes en procariontes y los mejor caracterizados (Schell, 1993; Pareja *et al.*, 2006; Hernández-Lucas y Calva, 2012). Los LTTRs regulan genes involucrados en metabolismo, división celular, virulencia, respuesta a estrés oxidativo, motilidad, producción y secreción de toxinas, entre otros. La mayoría de los miembros de esta familia tienen otras características: 1) son reguladores que funcionan como activadores o represores de sus genes blanco, 2) los genes que los codifican frecuentemente se transcriben de manera divergente, al gen blanco pero pueden también estar localizados en otra parte del cromosoma y 3) la activación transcripcional de sus genes blanco comúnmente es optimizada por un co-inductor (Schell, 1993, Maddocks y Oyston, 2008).

En *A. vinelandii* la inactivación de *arpR* no afectó el crecimiento de la cepa, así como tampoco la síntesis de alginato ni PHB, pero sí provocó un efecto negativo en la síntesis de ARs.

2.3 Sistema de dos componentes GacS/GacA en *A. vinelandii*.

El sistema GacS/GacA es un sistema de dos componentes utilizado por una gran variedad de bacterias (Lapouge *et al.*, 2008). El sistema consiste en una cinasa sensora (GacS en el caso del sistema GacS/GacA) y un regulador de respuesta (GacA). GacS, también conocido como BarA, ExpS, VarS, ApdA, RepA, PheN o LemA (Corbell y Loper, 1995.), es un miembro de la subclase de cinasas sensoras tripartitas, que consisten de un dominio transmisor primario, un dominio central receptor y un dominio fosfotransferasa C-terminal. GacS podría detectar señales bióticas o abióticas que aún se desconocen, y de esta manera sufre una autofosforilación en un residuo de histidina conservado (H1). Después, el grupo fosfato (P) es transferido desde H1 a un residuo de aspartato (D) y luego a una segunda histidina (H2) de GacS y, posteriormente, es transferido a un aspartato conservado del regulador transcripcional GacA, que de esta manera se activa y actúa sobre sus genes blanco. GacA (UvrY, ExpA, SirA, VarA), es un regulador de respuesta de la familia FixJ que contiene un motivo Hélice-vuelta-Hélice (HTH) involucrado en la unión a ADN (Kitten *et al.*, 1998). Se han identificado cerca de 20 homólogos de GacS/GacA, en bacterias entéricas (*E. coli*, *Salmonella enterica* y *Erwinia carotovora*), *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Azotobacter* (Haas y Keel, 2003.).

El sistema GacS/GacA ayuda a estos organismos a adaptarse a diferentes condiciones en respuesta a cambios ambientales; controla la producción de metabolitos secundarios y enzimas o productos extracelulares que están involucradas en patogenicidad (Heeb y Haas, 2001). Está reportado en *Serratia plymuthica* que la producción de antibióticos, antifúngicos y exoenzimas requeridos para el control de hongos patógenos de plantas es dependiente de este sistema GacA/GacS (Ovadis *et al.*, 2004). En *Azotobacter vinelandii* se ha demostrado que el sistema GacS/GacA regula positivamente la producción de alginato y PHB. Adicionalmente, se ha observado un efecto negativo sobre el proceso de enquistamiento en las cepas que tienen *gacA* inactivo (Castañeda *et al.*, 2000), pero no se ha estudiado su efecto en la síntesis de ARs.

2.4 El factor sigma RpoS en *A. vinelandii*.

El sistema GacS/GacA (BarA/UvrY) controla, entre otros genes, la expresión de *rpoS* durante la fase estacionaria de crecimiento en *Pseudomonas fluorescens* (Lavilla *et al.*, 1992; Whistler *et al.*, 1998) y en *E. coli* (Martinez *et al.*, 1996). En *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, organismos filogenéticamente cercanos a *A. vinelandii*, se ha determinado que GacS/GacA no ejercen ninguna regulación sobre la expresión de *rpoS* (Bertani *et al.*, 2003). Se sabe también que GacA controla la expresión de *rpoS* en las cepas de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AEIV (Castañeda *et al.*, 2001). Sin embargo, hay evidencias que indican que la regulación de GacA sobre *rpoS* varía entre las cepas de esta bacteria (Sampieri A., datos no publicados). Un ejemplo de ello es la cepa SW136, donde se comparó la expresión de *rpoS* con la de la mutante SW5 (mutante *gacA*, derivada de la cepa SW136) a través de PCR en tiempo real; observando que la mutación en *gacA* no afectó la expresión de *rpoS*, ya que presentó el mismo nivel de expresión que la cepa silvestre (Romero, 2008). El gen *rpoS* codifica para el factor σ^s o σ^{38} el cual interviene en la expresión de un gran número de genes involucrados en diversas respuestas celulares: estrés osmótico, choque a temperaturas altas y bajas, y durante el estado de transición de fase exponencial a estacionaria en diversas bacterias (Navarro *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2004).

Se ha descrito también que este factor sigma desempeña un papel en la regulación de la síntesis de alginato y PHB en *A. vinelandii*, dado que una mutación en *rpoS* provocó un decremento y abatimiento en la producción de alginato y PHB respectivamente (Campos *et al.*, 1996; Castañeda *et al.*, 2001). La regulación que ejerce RpoS sobre la síntesis de alginato es a nivel del control de la expresión del gen biosintético *algD* a partir de uno de sus tres promotores, mientras que para la síntesis de PHB es a través de la regulación la expresión del gen biosintético *phbB* y el gen *phbR*, que codifica para el activador transcripcional de la síntesis de PHB (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

En ambos casos la regulación es sobre uno de los dos promotores de dichos genes. Además, se determinó que RpoS está involucrado en la regulación del proceso de enquistamiento, dado que la inactivación de *rpoS* provocó incapacidad para formar quistes resistentes a la desecación y para sintetizar ARs (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). Específicamente, lo que se observó en las mutantes *rpoS*, fue que al inducirla a enquistamiento, los quistes que éstas producen carecen completamente de exina e intina y por lo tanto fueron incapaces de resistir la desecación. La incapacidad de la mutante *rpoS* para formar las capas del quiste no es consecuencia del efecto en la síntesis de alginato, dado que esta mutante si produce suficiente de éste polisacárido extracelular. Por lo tanto, RpoS debe estar regulando otros genes esenciales para la formación de quistes maduros (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011)

2.5 Sistema CsrA/CsrB (RsmA/RsmZ/RsmY) en *A. vinelandii*.

CsrA/CsrB constituye un sistema global de regulación post-transcripcional que controla principalmente el metabolismo central de carbono, la motilidad y la conducta multicelular en *E. coli* (Romeo, 1998). El efector de este sistema es CsrA, una proteína de unión a ARN de 61 aminoácidos. CsrA tiene la capacidad de unirse a regiones consenso (GGA) generalmente cerca al sitio de unión a ribosoma de los ARN mensajeros blanco, impidiendo así su traducción y promoviendo su degradación (Baker *et al.*, 2002; Liu y Romeo, 1995; Liu y Romeo, 1997; Romeo, 1998). Sin embargo, también puede actuar como regulador positivo de ciertos genes involucrados en motilidad, glicólisis y metabolismo de acetato, aunque se sabe muy poco sobre el mecanismo bioquímico de activación (Romeo, 1998; Wei *et al.*, 2001). El segundo componente de este sistema es CsrB, un ARN no codificante que puede formar un gran complejo nucleoproteínico capaz de interactuar con hasta 18 subunidades de CsrA, antagonizando los efectos de esta proteína *in vivo* (Dubey *et al.*, 2005; Gudapaty *et al.*, 2001; Romeo, 1998).

Homólogos a CsrB han sido reportados en otras bacterias Gram-negativas (Valverde *et al.*, 2001) como *Salmonella enterica* (CsrB/CsrC), *Vibrio cholerae* (CsrA/CsrB/CsrC), *Erwinia carotovora* (RsmB), *Pseudomonas fluorescens* (RsmX/RsmY/RsmZ), en donde están involucrados también en cascadas reguladoras (Babitzke y Romeo, 2007). En *P. fluorescens* este sistema de regulación post-transcripcional reprime genes de fase estacionaria (Kay *et al.*, 2006). En *Erwinia carotovora* reprime la traducción de mensajeros de genes involucrados en patogénesis (Cui *et al.*, 2001). En *V. cholerae* regula la multicelularidad, y en *S. enterica* genes que intervienen en la invasión entérica (Altier *et al.*, 2000). Recientemente se identificó el sistema RsmA/RsmZ/RsmY en *A. vinelandii* que está conformado por un gen *rsmA*, siete genes de la familia *rsmZ* (*rsmZ1* a *rsmZ7*) y dos genes de la familia *rsmY* nombrados *rsmY1* y *rsmY2*. Se determinó que este sistema RsmA/RsmZ/RsmY regula la síntesis de alginato y PHB (Manzo *et al.*, 2011; Hernández-Eligio *et al.*, 2012), dado que mutaciones en *rsmZ1* y *rsmZ2* afectan la producción de alginato y PHB de manera negativa, ya que la producción de estos polímeros disminuye, y cuando hay expresión ectópica de RsmA se observa un efecto negativo sobre la producción de alginato y PHB (Manzo *et al.*, 2011; Hernández-Eligio *et al.*, 2012). Se reportó que esta regulación es directa teniendo como blancos a los ARN mensajeros de los genes biosintéticos *algD* y *phbB* para los respectivos polímeros, así como también, teniendo como blanco directo al ARN mensajero del gen *phbR* que codifica para el activador transcripcional de la biosíntesis de PHB (Manzo *et al.*, 2011; Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

2.6 Regulación de la expresión de los ARNs reguladores por el sistema de dos componentes GacS/GacA.

En muchas γ -proteobacterias, GacA o sus homólogos controlan positivamente la expresión de los ARN reguladores pequeños de la familia RsmZ/RsmY/RsmX (CsrB/CsrC) que interaccionan con las proteínas RsmA (CsrA). La relación entre estos dos sistemas globales de regulación se definió inicialmente en *Pseudomonas fluorescens* (Blummer, 1999). A partir de este antecedente, fue determinándose la cascada de transducción Gac/Rsm en diversas bacterias como *E. coli* (Susuki *et al.*, 2002; Weilbacher *et al.*, 2003; Tomenius *et al.*, 2006), *Erwinia carotovora* (Cui *et al.*, 2001; Lebeau *et al.*, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Kay *et al.*, 2006; Dubuis *et al.*, 2007), *Pseudomonas auroginosa* (Parkins *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2006), *Salmonella entérica* (Altier, 2000), *Vibrio cholerae* (Lenz *et al.*, 2005), *Serratia marcencens* y recientemente en *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011). En muchas de estas especies, GacA activa la transcripción de los pequeños ARN's de manera directa uniéndose a la caja consenso que reconoce esta proteína (TGTAAGNNATNNCCTACA) que está presente en la región promotora de los genes que los codifican. Se tiene evidencia experimental de que GacS/GacA regulan directamente la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* (Manzo *et al.*, 2011).

La regulación por el sistema GacS/GacA de los siete genes de la familia *rsmZ/RsmY* adicionales, está por ser determinada, dado que una mutante *gacA* es incapaz de producir alginato, mientras que mutantes en *rsmZ1*, *rsmZ2* o la doble mutante *rsmZ1-rsmZ2* producen un 20% de alginato, lo que sugiere la participación de algún otro de los ARNs. La reiteración de los pequeños ARN's no es una característica única de *A. vinelandii*, sino, de la mayoría de las bacterias como una opción para la regulación fina de la expresión genética. Un ejemplo se da en *P. fluorescens* que presenta tres pequeños ARN's (RsmZ/RsmY/RsmX) activados por GacA. En *A. vinelandii* esta redundancia puede estar involucrada en la respuesta a una amplia variedad de condiciones ambientales y respuestas, tal como la inducción a enquistamiento, un proceso que no llevan a cabo otras bacterias que presentan el sistema Gac-Rsm.

2.7 ArpR, RpoS, GacA, RsmZ1 y RsmA controlan la síntesis de alquilresorcinoles.

Está reportado que los reguladores globales RpoS, GacA, RsmZ1, RsmZ2 y RsmA controlan la producción de PHB y alginato, dos polímeros involucrados en el proceso de enquistamiento, al regular la expresión de los genes biosintéticos de estos (Gaona *et al.*, 2004; Hernández-Eligio *et al.*, 2012, Manzo *et al.*, 2011).

Por otra parte, la inactivación de *arpR* afecta la producción de ARs, pero no afectó la producción de estos polímeros ni el crecimiento de la cepa mutante (SW7); por lo que se descartó que ArpR sea un regulador global (Romero, 2006.). Ya se ha estudiado el efecto que presentan las mutaciones *arpR*, *rpoS*, *gacA*, *rsmZ1* y *rsmA* sobre la producción de ARs. Se observó que las cepas SW7, SW9 SW5 y SW13 llevando las mutaciones en los genes *arpR*, *rpoS*, *gacA* y *rsmZ1* respectivamente, presentaron un fenotipo blanco al realizar tinciones de los ARs

con azul rápido B y la cepa SW11 llevando la mutación en el gene *rsmA* un fenotipo rojo comparándolas con su cepa parental, SW136. Un fenotipo rojo muestra producción de ARs, mientras que un fenotipo blanco refleja un bloqueo en la síntesis de estos lípidos. El fenotipo ilustrado en la figura 2.2a muestra el efecto negativo de las mutaciones *arpR*, *rpoS*, *gacA* y *rsmZ1* y positivo de la mutación *rsmA* sobre la síntesis de alquilresorcinoles (Romero, 2008). Al cuantificar la producción de ARs en la cepa SW11 se observó que esta produce 2 veces más que la cepa parental SW136 (Fig. 2.2b; Romero, 2008).

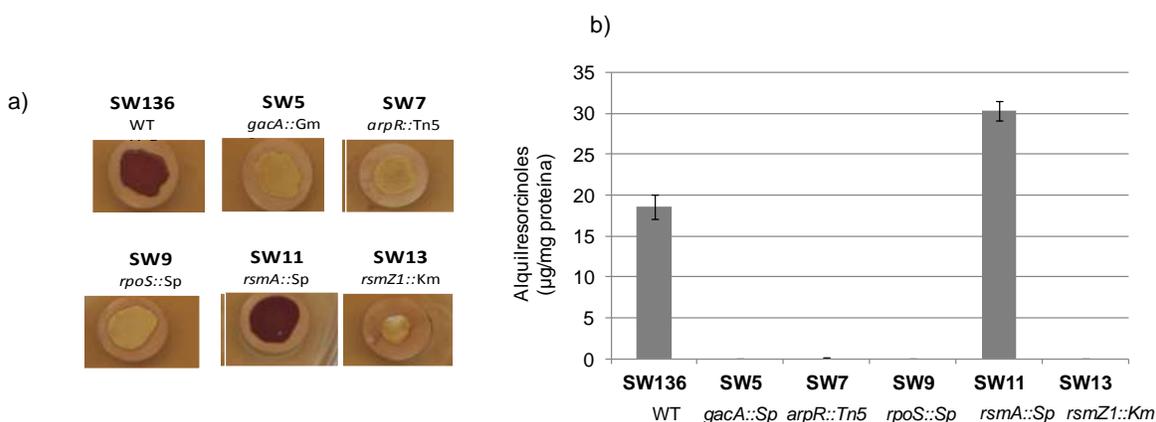


Fig. 2.2 Fenotipos (a) y cuantificación de producción de alquilresorcinoles (b) de mutantes obtenidas en fondo SW136. SW136 (WT), SW5 (*gacA*), SW7 (*arpR*), SW9 (*rpoS*), SW11 (*rsmA*) y SW13 (*rsmZ1*). Los valores son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar. Romero, 2008.

Es importante notar que la inactivación del gen *rsmZ1* que codifica para uno de los nueve ARNs, fue suficiente para bloquear la síntesis de ARs; a diferencia de la producción de alginato donde no es suficiente con inactivar a *rsmZ1* y *rsmZ2* para bloquear su síntesis, dado que la doble mutante disminuyó su producción hasta un 80% (Manzo *et al.*, 2011).

Estos resultados demostraron la importancia de los productos de los genes *arpR*, *rpoS*, *gacA*, *rsmZ1* y *rsmA* en la producción y acumulación de ARs en *A. vinelandii* (Romero, 2008).

2.8 *ArpR*, *RpoS*, *GacA*, *RsmZ1* y *RsmA* regulan la expresión del operón de biosíntesis de alquilresorcinoles *arsABCD* y del gen *arpR*.

La expresión del gene *arsA* se da a partir de un único promotor sigma 70 dependiente (P1, fig. 2.3a) identificado utilizando el programa Softberry-BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) y experimentos de determinación del inicio de la transcripción

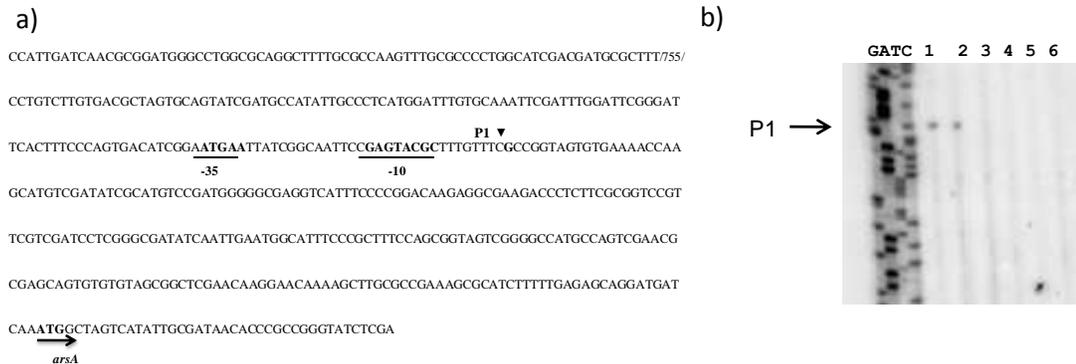


Fig. 2.3: Análisis de la región promotora de *arsA* y su sitio de inicio de la transcripción. (a) Secuencia de ADN de la región 5' de *arsA*. Se muestran el sitio de inicio del ARNm P1, y las cajas -10 y -35 del promotor Sigma 70 (b) Análisis del efecto de la inactivación de diversos reguladores sobre la transcripción de *arsA* por "primer extension". Cepas SW136 (WT, carril 1), SW11 (*rsmA*⁻, carril 2), SW13 (*rsmZ1*⁻, carril 3), SW9 (*rpoS*⁻, carril 4), SW5 (*gacA*⁻, carril 5) y SW7 (*arpR*⁻, carril 6). Romero, 2008.

En la regulación de la síntesis de alquilresorcinoles, *GacA*, *RpoS*, *ArpR* y *RsmZ1* tienen una influencia en la cantidad de transcritos de *arsA* (Romero, 2008). A través de ensayos de "primer extension" utilizando ARN total de las diferentes mutantes derivadas de la cepa SW136 de *A. vinelandii* obtenidas después de 36 horas de inducción a enquistamiento, se observó que la transcripción de *arsA* a partir del promotor P1 disminuyó en las mutantes en *gacA*, *rpoS*, *rsmZ1* y *arpR*, mientras que en la mutante *rsmA* parece no haberse afectado la expresión (Fig. 2.3b). En el caso de *GacA*, *RpoS* y *ArpR*, dados los antecedentes de su participación en el control transcripcional de sus blancos, se considera que el efecto es debido a que estos reguladores participan en la regulación de la transcripción de *arsA* a partir de P1. Sin embargo, el decremento de transcritos *arsA*, en la cepa *rsmZ1*⁻ (SW13) puede indicar un efecto en la estabilidad del mensajero de *arsA*, dado que *rsmZ1* es un regulador post-transcripcional (Romeo, 1998; Manzo *et al.*, 2011). En el caso de la mutante SW11 (*rsmA*⁻), parece no haberse afectado la expresión de *arsA*, ya que la cantidad de transcritos desde P1 se mantiene similar a la cepa silvestre.

El nivel de los ARN mensajeros de *arsA* fue cuantificado a través de qRT-PCR en células cosechadas a las 36 horas de inducción a enquistamiento en las cepas llevando las mutaciones en los genes *gacA*, *rpoS*, *arpR*, *rsmA* y *rsmZ1* (Fig. 2.4a). Se encontró que la expresión relativa de *arsA* disminuyó un 82% en la cepa

mutante SW7 (*arpR*), un 92% en la cepa SW9 (*rpoS*) y hasta un 95% en las cepas SW5 (*gacA*) y SW13 (*rsmZ1*); caso contrario en la cepa mutante SW11 (*rsmA*) donde hubo un incremento de sólo un 20% en los transcritos con respecto a la cepa silvestre SW136.

La expresión de *arsA* en cada una de las cepas mutantes, concuerda con el fenotipo de bloqueo de la síntesis de ARs observado previamente.

Se demostró que estas mutaciones afectaron también la expresión de *arpR* (Romero, 2008; Fig. 2.4b) de manera similar a lo observado para el gen *arsA*. En las mutantes SW5 (*gacA*) y SW9 (*rpoS*) se afectó la expresión de *arpR* de manera negativa, ya que disminuyeron hasta en un 60% y 96% respectivamente, en cambio, la mutación *rsmA* (SW11) afectó de manera positiva, aumentando hasta 1.7 veces la expresión de *arpR*. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la regulación de la expresión de *arsA* por estos reguladores es a través del control de la expresión del activador transcripcional ArpR.

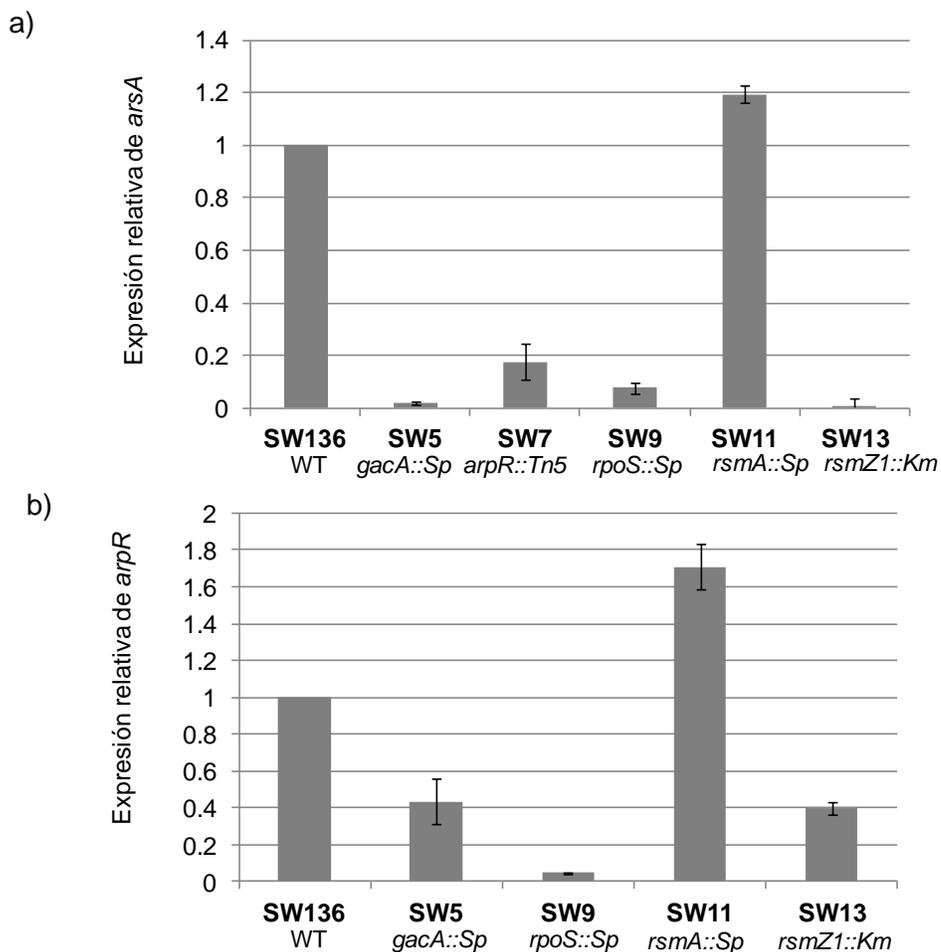


Fig. 2.4. Expresión de los genes *arsA* (a) y *arpR* (b) en la cepa SW136 (WT) y en las cepas mutantes SW5 (*gacA*), SW7 (*arpR*), SW9 (*rpoS*), SW11 (*rsmA*) y SW11 (*rsmZ1*). Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar. Romero, 2008

CAPÍTULO 3.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 *Justificación.*

El enquistamiento es un proceso que le confiere a *A. vinelandii*, una ventaja de sobrevivencia ante condiciones adversas, y es además un tipo de diferenciación poco conocido a nivel molecular, a pesar de que se presenta en procariontes muy diversos (Berleman y Bauer, 2004; Sadasivan y Neyra, 1985; Tudor y Conti, 1977). En *A. vinelandii* la expresión del operón *arsABCD* y la biosíntesis de AR's están correlacionadas con el proceso de enquistamiento.

Nos interesa conocer las vías de señalización responsables de encender la expresión génica que conduce a la síntesis de AR's, con la finalidad de descifrar los mecanismos de transducción de señales que intervienen en la formación de los quistes maduros. Determinamos que ArpR y diversos reguladores globales como GacA y RpoS regulan la expresión del operón *arsABCD*, considerados genes reporteros del proceso de enquistamiento. Sin embargo, no sabemos la manera de cómo sistema de dos componentes GacS/GacA está conectado con la expresión de *arpR*, dado que, su regulación no es a través del control de la expresión de RpoS como sucede en otras bacterias (Romero, 2008).

El reciente descubrimiento del sistema RsmA/RsmZ en *A. vinelandii*, y la evidencia de que éste controla la síntesis de alquilresorcinoles, sugiere que este sistema se encuentra regulando también la expresión de los genes *arsABCD*, y por lo tanto, parte del proceso de diferenciación. De ser así, la expresión de los genes para la síntesis de AR's no sólo sería regulada transcripcionalmente por ArpR, GacA y RpoS, sino también a nivel post-transcripcional por el sistema RsmA/RsmZ.

Proponemos que el efecto de GacA sobre la expresión de *arpR* y los genes *arsABCD* sea a través del sistema RsmA/RsmZ. Por lo tanto, nos enfocaremos a determinar a qué nivel está participando el sistema RsmA/RsmZ en la síntesis de AR's. La realización de este proyecto proporciona información novedosa, ya que hasta la fecha hay pocos datos sobre la regulación genética que desencadena el enquistamiento en *A. vinelandii*. Además, los AR's son interesantes porque podrían tener una aplicación industrial. Por lo tanto, nos interesaba conocer más sobre la regulación de su síntesis.

3.2 *Hipótesis.*

Se planteó como hipótesis de este trabajo, que la expresión del operón *arsABCD* se controla transcripcionalmente por el regulador ArpR, quien sería el activador directo de su transcripción. El factor sigma RpoS controla la transcripción de *arpR* o del operón *arsABCD*, y los sistemas de dos componentes GacS/GacA y RsmA/RsmZ los regulan a nivel post-transcripcional a través de una red de regulación. El regulador global que inicia la cascada es el sistema de dos componentes GacS/GacA controlando la síntesis de AR's a través del control de la transcripción de *rsmZ1* en *A. vinelandii* SW136. La proteína RsmA reconoce los

mensajeros de *arpR* o de *arsA* inhibiendo su traducción. RpoS regula la expresión del operon *arsABCD* de manera independiente del sistema Gac-Rsm.

3.3 Objetivo general.

Definir el mecanismo de regulación de la expresión del operón de biosíntesis de alquilresorcinoles *arsABCD* por los sistemas GacS/GacA, RsmA/RsmZ/RsmY, RpoS y por el regulador transcripcional ArpR en *Azotobacter vinelandii*.

3.4 Objetivos particulares.

1. Determinar si ArpR es un activador directo de la transcripción de *arsABCD*.
2. Estudiar si el efecto del sistema GacS/GacA sobre la regulación de la expresión de *arsABCD* es a través del control de la expresión de *rsmZ1* en *A. vinelandii* SW136.
3. Definir cuáles son los blancos de regulación de RsmA/RsmZ1 en la síntesis de alquilresorcinoles.
4. Determinar si estos sistemas de regulación ejercen su efecto en la expresión de los genes biosintéticos de ARs a través del control del regulador ArpR.

CAPÍTULO 4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Descripción	Referencias
<i>A. vinelandii</i>		
SW136	<i>algU</i> [*] Derivada de la UW136, mucoide	Segura <i>et al.</i> (2009)
OV8	SW136 con inserción <i>arsA::Tn5SSgusA40</i> , mucoide	Segura <i>et al.</i> (2009)
SW5	SW136 <i>gacA::Gm</i>	Este trabajo
SW7	SW136 <i>arpR::Sp</i>	Este trabajo
SW9	SW136 <i>rpoS::Sp</i>	Este trabajo
SW11	SW136 <i>rsmA::Sp</i>	Este trabajo
SW13	SW136 <i>rsmZ1::Km</i>	Este trabajo
SW15	SW136 <i>gacA::Gm-rsmA::Sp</i>	Este trabajo
YRR30	SW136 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR31	SW136 fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR32	SW5 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR33	SW5 conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR34	SW7 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR35	SW7 conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR36	SW9 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR37	SW9 conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR38	SW11 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR39	SW11 conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR40	SW13 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR41	SW13 conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR42	SW15 conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR43	SW15 conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
YRR50	SW136 conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR51	SW136 conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR52	SW5 conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR53	SW5 conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR54	SW9 conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR55	SW9 conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR56	SW11 conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR57	SW11 conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR58	SW13 conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR59	SW13 conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR60	SW15 conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR61	SW15 conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
YRR62	SW136 conteniendo fusión transcripcional <i>prsmZ1-gusA</i>	Este trabajo
YRR63	SW5 conteniendo fusión transcripcional <i>prsmZ1-gusA</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, D., 1983
BL21	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3)</i>	Invitrogene

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pMOSBlue	Plásmido para clonar productos de PCR	Amersham
pKK232-8	Plásmido derivado de pBR322 conteniendo el gen cloranfenicol acetil transferasa (<i>cat</i>), Ap ^R	Pharmacia Biotech
pACYC177	Vector de clonación con origen de replicación p15A	New England Biolabs
pMAL-c2X	Vector de expresión de proteínas fusionadas a MBP, Ap ^R	New England Biolabs
pBBR1MCS-2	Vector de clonación de productos de PCR con cassette de resistencia a Km	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBAD/His A	Vector de expresión para construir proteínas conteniendo His en el C-terminal, promotor <i>ara</i> , Ap ^R	Invitrogen
pYRR40	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo un fragmento de 2.6 kb de <i>arsA</i>	Este trabajo
pYRR41	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo un fragmento de 1.8 kb de <i>arpR</i>	Este trabajo
pMOS-RIC	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo la región intergénica de <i>arpR</i>	Este trabajo
pMOSR-His	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo el gen <i>arpR</i> etiquetado con 6 histidinas en el amino terminal	Este trabajo
pMOSgA	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo <i>gusA::Sp</i> , <i>gusA</i> sin SD	Este trabajo
pMOSgA2	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo <i>gusA::Sp</i> , <i>gusA</i> con SD	Este trabajo
pYRR50	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo fusión transcripcional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
pYRR51	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo fusión traduccional <i>parsA-gusA</i>	Este trabajo
pYRR52	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo fusión transcripcional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
pYRR53	Plásmido derivado de pMOSBlue conteniendo fusión traduccional <i>parpR-gusA</i>	Este trabajo
pACYC/PKK-ArsA	Plásmido derivado de pACYC177 y pKK232 -8 conteniendo una fusión transcripcional <i>parsA-cat</i> . Región <i>arsA</i> de -250 a + 191	Este trabajo
pACYC/PKK-ArpR	Plásmido derivado de pACYC177 y pKK232 -8 conteniendo una fusión transcripcional <i>parpR-cat</i> . Región <i>arpR</i> de -250 a + 191	Este trabajo
pMAL-ArpR	Plásmido derivado de pMAL-c2X expresando MBP-ArpR	Este trabajo
pBBR-ArpR/His	Derivado del plásmido pBBR1MCS-2 expresando el gen <i>ArpR-His</i> a partir del promotor <i>lac</i>	Este trabajo
pBAD-ArpR	Plásmido derivado de pBAD/His expresando el gen <i>ArpR-His</i> a partir del promotor <i>ara</i>	Este trabajo

4.1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*.

Las cepas de *A. vinelandii* se crecieron a 30°C por 72 h en medio Burk Sacarosa (BS) sólido, cuya composición es la siguiente (g/l): MgCl₂·6H₂O 0.160, NaMoO₄·2H₂O 0.0002, FeSO₄·7H₂O 0.005, CaCl₂·2H₂O 0.073, Na₂SO₄ 0.183, K₂HPO₄ 0.8, KH₂PO₄ 0.2 y 15 de agar; se ajustó el pH a 7.1, sacarosa 20 g/l. El medio Burk Butanol (BOH) se utilizó para la inducción del enquistamiento de las cepas de *A. vinelandii*, y su composición es igual a la del medio BS, pero reemplazando la sacarosa por butanol al 0.2%. Para preparar células competentes de *A. vinelandii* se utilizó medio CM sólido y líquido, su composición es la misma que el medio BS excepto que no contiene NaMoO₄·2H₂O ni FeSO₄·7H₂O. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (composición en g/l: peptona de caseína 10, cloruro de sodio 10, extracto de levadura 5 para medio líquido, suplementado con 15 de agar para medio sólido) o medio M9 (composición g/l: Na₂HPO₄·7H₂O 12.8, KH₂PO₄ 3, NaCl 0.5, NH₄Cl 1 y 20% glucosa) y se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm). Los antibióticos usados para *E. coli* fueron: ampicilina 100 µg/ml, ácido nalidíxico 100 µg/m, kanamicina µg/ml 15 y para *A. vinelandii* fueron: ácido nalidíxico 30 µg/ml, espectinomicina 100 µg/ml, kanamicina 2 µg/ml, tetraciclina 15µg/ml y gentamicina 1.5 µg/ml en medio sólido o líquido.

4.2 Construcción de las fusiones transcripcionales y traduccionales *parsA-gusA* y *parpR-gusA*.

Para construir las fusiones transcripcionales *parsA-gusA* y *parpR-gusA*, se amplificaron fragmentos de ADN conteniendo las regiones reguladoras y parte de las regiones codificantes de *arsA* y *arpR* por PCR, utilizando los oligonucleótidos UIARS y LIARS y PwarsR y ARSRIw respectivamente. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pMOSBlue, generando los plásmidos pYRR40 y pYRR41 respectivamente. Un fragmento de ADN conteniendo los genes *gusA* y *Sp* fueron amplificados utilizando los pares de nucleótidos UGA y SPlow o UGA2 y SPlow y el plásmido pMP01 como ADN templado (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Los fragmentos fueron clonados en el vector pMOSBlue y a los plásmidos obtenidos se le nombró pMOSgA2 y pMOSgA respectivamente. Para construir la fusión transcripcional *parsA-gusA::Sp*, el plásmido pYRR40 fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y se ligo un fragmento *HindIII-EcoRI* conteniendo los genes *gusA::Sp* escindido del plásmido pMOSgA2. El plásmido generadó fue nombrado pYRR50. El plásmido pYRR51 conteniendo la fusión traduccional *parsA-gusA::sp* fue construido; digiriendo el plásmido pYRR40 con las enzimas de resctricción *BglII*-*Apal* y se clonó los genes reporteros *gusA::Sp* recuperados con los mismos sitios de restricción a partir del plásmido pMOSgA. Para construir la fusión transcripcional *parpR-gusA::Sp*, se utilizó el plásmido pYRR41, se integró el fragmento *gusA::Sp* en los sitios *NdeI*-*PstI* de pYRR41, diseñando el plásmido pYRR52. La fusión traduccional *arpR-gusA::Sp* se construyó integrando en el plásmido pYRR41 el cassette *gusA::Sp* escindido con las enzimas *BamHI*-*HindIII* del plásmido pMOSgA, generando el plásmido pYRR53.

Los plásmidos pYRR50, pYRR51, pYRR52 y pYRR53 fueron utilizados para transformar *A. vinelandii* y las mutantes derivadas SW5, SW7, SW9, SW11, SW13 y SW15. Las cepas transformantes resistentes a espectinomicina fueron seleccionadas (Ver tabla 1 para ubicar las cepas resultantes), la integración de las fusiones por reemplazamiento en el cromosoma fue confirmado por ensayos de PCR (Dato no mostrado).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia
arsA-RT-F	5' cac cct cgt caa tct gct c 3'
arsA-RT-R	5' gat cct ggt cga aga cct tg 3'
arpR-RT-F	5' ctt ccc ctg ctg gca ctc 3'
arpR-RT-R	5' cgt tcc tgg agt tct tcg ag 3'
arpRU1	5' att cct cgc tca cgt ctg a 3'
arpRL1	5' tac tgg tca tcg caa agc tg 3'
fw-gyrA	5' cca gca agg gca agg tct a 3'
rev-gyrA	5' tcg tcc agc ggc aac agg t 3'
PparsR	5'cgt aga att cc acct gcg ccc act act 3'
PwarsR	5' atc tgg atc cat ggg gaa ggc cta tcc 3'
ArpRu	5' gac ggt gag ctc atc gct ttt tgc tca tgg 3'
ArpRw	5' cgc taa gaa ttc agg ttg cca gaa cga t 3'
ArpRHIS	5' atg cat cat cat cat cat atc gct ttt tgc tca tgg 3'
UIARS	5' atg ctt cta gag tct gtg ctg atc cat 3'
LIARS	5' cta gtg agc tca ggg gct ttc gtc gg 3'
ARSRIw	5' ctg cgt gcc gtg agg tac 3'
UGA	5' gct ata gat ctc tta atg agg agt ccc tt 3'
UGA2	5' ctt atg tta cgt cct gta gaa acc cca ac 3'
SPIow	5'gct tta tgc ttg taa tcc 3'
ArsA-5	5' gag gat cga cga acg gac 3'
arsAEMSA1	5' gct tgt gtg ctt gat ggt 3'
arsAEMSA3	5' ggt ctt cgc ctc ttg tcc 3'
arpREMSA1	5' cag tca gac cgg cat ac 3'
RediR3	5' tcc atg agc aaa aag cga tc 3'
emsaSup	5' ctc tgg tgg gac gct ttt c 3'
emsaSdwn	5' cct tca cct gtt gtc ctt c 3'
ArpRp3	5' gac ggt gga tcc atc gct ttt tgc tca tgg 3'
ArpRp4	5' cgc taa aag ctt agg ttg cca gaa cga t 3'

4.3 Construcción de los plásmidos pACYC/pKK-arsA, pACYC/pKK-arpR, pBAD-arpR y pBBR-arpR/His.

Para construir los plásmidos pACYC/pKK-*arsA* y pACYC/pKK-*arpR* conteniendo fusiones transcripcionales *parsA-cat* y *parpR-cat* respectivamente, se generó primero el plásmido pACYC/pKK. Este plásmido es derivado de los vectores pACYC177 y pKK232-8 los cuales fueron digeridos con *Bam*HI-*Pst*I y *Sma*I-*Nde*I respectivamente, rellenos con la enzima Klenow (Roche) y ligados con la ligasa DNA T4 (Roche). La región promotora de *arsA* fue escindida del vector pYRR40 con las enzimas *Sac*II y *Bgl*I y fue clonado en los mismos sitios de restricción de pACYC/pKK, dejando el gen reportero *cat* bajo la regulación del promotor *arsA* en el plásmido pACYC/pKK-*arsA*. Para la fusión transcripcional de la región reguladora de *arpR* con el gen *cat*, se amplificó la región promotora de *arpR* con los oligonucleótidos PwarsR y PparsR. El producto de PCR fue clonado en el vector pMOSBlue, originando el plásmido pMOS-RIC. La región promotora de *arpR* fue escindida de pMOS-RIC con las enzimas *Sac*II y *Bgl*I y clonada en el plásmido pACYC/pKK, digerido con las mismas enzimas de restricción. Al plásmido generado se le nombró pACYC/pKK-*arpR*. El regulador ArpR fue expresado en *E. coli* a partir del plásmido pBAD-*arpR*. Para construir este plásmido, la región codificante de *arpR* fue amplificada utilizando ADN total de la cepa SW136 de *A. vinelandii* y los oligonucleótidos *arpRu* y *arpRw*. Este producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *Sac*I y *Eco*RI, purificado a partir de gel de agarosa por el método GENECLEAN (MP) y clonado en el vector pBAD/His A (Invitrogen), generando el plásmido pBAD-*arpR*. Para expresar la proteína ArpR en *A. vinelandii*, se construyó el plásmido pBBR-*arpR*/His. Un fragmento de ADN conteniendo la región codificante de *arpR* fue obtenido de pBAD-*arpR* por PCR, utilizando los oligonucleótidos *arpRHIS* y *arpRp4*. El producto de PCR fue clonado en el vector pMOSBlue, generando el plásmido pMOSR-His. El gen *arpR* etiquetado con 6 histidinas en el amino terminal, fue escindido de pMOSR-His con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI y clonado en el vector pBBR1MCS-2, digerido con las mismas enzimas. El plásmido generado fue pBBR-*arpR*/His y fue transferido a *A. vinelandii* por conjugación triparental.

4.4 Construcción del plásmido pMAL-ArpR y purificación de MBP-ArpR.

Para construir el plásmido pMAL-ArpR, que permite expresar la proteína recombinante MBP-ArpR, un fragmento de PCR de 1.2 Kb conteniendo la región codificante de *arpR* sin los codones de inicio y paro, fue amplificado con los oligonucleótidos *arpRp3* y *arpRp4*. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, purificado por el método GENECLEAN (MP) y clonado en el extremo 3' del gen *malE* dentro del vector pMAL-p2X (New England Biolabs), produciendo el plásmido pMAL-ArpR. La proteína MBP-ArpR fue expresada a partir del plásmido pMAL-ArpR en *E. coli* BL21. Se creció *E. coli* en 100 ml de medio LB con 0.2% de glucosa hasta llegar a una D.O de 0.5. Una vez en la D.O deseada, se adicionó al cultivo 0.5 mM de IPTG y se dejó induciendo por 3 horas a 30°C. Las células fueron cosechadas, centrifugadas a 10,000 rpm a 4°C y lavadas con buffer columna (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol), resuspendidas en 10 ml del mismo buffer y sonicadas. Se

0.4. Cuando las células alcanzaron la O.D.₆₀₀ deseada, se agregó arabinosa (0.05%) para promover la inducción de ArpR y se colectaron las células a los tiempos 0, 3, 6 y 12 h de inducción con arabinosa para medir la actividad de CAT de la fusión *arsA-cat* y a los tiempos 0 y 12 h para la actividad de la fusión *arpR-cat*. El ensayo CAT se realizó como se describió previamente (Martinez-Laguna *et al.*, 1999). La actividad específica de CAT fue cuantificada en μ moles de sustrato (cloranfenicol) hidrolizado por minuto por mg de proteína.

4.8 Cuantificación de alquilresorcinoles.

Las mutantes aisladas se crecieron por 5 días en medio Burk Butanol líquido para inducir síntesis de ARs. Después las células se colectaron y se pasaron a tubo Eppendorf, se resuspendieron en 1 ml de MgSO₄ 10mM. Se tomó una muestra (300 μ l) para cuantificación de proteína, la muestra restante se centrifugó a 14,000 rpm por dos minutos. Al terminar de centrifugar, se retiró el sobrenadante y se dejó la pastilla, a esta se le adicionó 1 ml de acetona para la primera extracción de ARs, se agitó en vortex y se dejó reposar 1 h. Posteriormente se centrifugó a la misma velocidad y tiempo. Se colectó la acetona y se añadió otro mililitro de acetona a la pastilla para la segunda extracción. Se agitó en vortex hasta resuspender y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente, sin exposición a la luz. Al día siguiente las muestras se centrifugaron y se recolectó la acetona. Los dos extractos obtenidos se mezclaron y se llevaron a una centrifuga de vacío (Savant), para concentrar el extracto y llevarlo a un volumen de 200 μ l. Posteriormente se tomaron 50 μ l de las muestras y se secaron en el Savant. Para hacer la cuantificación de ARs se añadió 1 ml de la solución azul rápido B-Propanol (ver apéndice) y se dejó reaccionando las muestras 1 h en la oscuridad (Tluscik *et al.*, 1980). Para leer las muestras en el espectrofotómetro se utilizó una longitud de onda de 520 nm. Simultáneamente se realizó una curva patrón con un estándar de 4-(4-Nitrofenilazo) resorcinol (Aldrich) en acetona a distintas concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 μ g/ml).

4.9 Caracterización fenotípica sobre producción de alquilresorcinoles de las mutantes de *A. vinelandii*.

Para determinar el fenotipo de ARs en placa de las mutantes, se realizó el siguiente procedimiento: Se crecieron las mutantes en medio Burk Sacarosa, se lavaron con MgSO₄ 10 mM y se colocaron filtros con 10 μ l del cultivo en placas con medio Burk Sacarosa para crecimiento vegetativo o medio Burk Butanol para inducir enquistamiento y síntesis de ARs. Después de cinco días de incubación, las placas se rociaron con una solución reveladora de placas (ver apéndice). Mediante esta metodología las colonias que producen y acumulan ARs se tiñeron de rojo por la reacción del colorante, mientras que las no productoras permanecieron del color original blanquecino.

4.10 Purificación de ARN total de *A. vinelandii*.

Se colectaron las células de 1.5 ml de cultivo de 36 h de crecimiento en medio BOH, se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se resuspendieron en 50 μ l de H₂O con DEPC (di-etil pirocarbonato) 0.1% V/V. Se adicionaron 5 μ l de DEPC

0.5% y 400 μ l de acetona helada, se mezcló manualmente y centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante con cuidado. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 50 μ l de DEPC 0.1%, se agregaron 10 μ l de lisozima (10 mg/ml) preparada con DEPC 0.5% y se incubó a 37°C por 10 min. Terminado el tiempo de incubación se agregó 1 μ l de proteinasa K (100 μ g/ml), se incubó en hielo 10 min, se adicionaron 7 μ l de DEPC 0.5%, 200 μ l de fenol (precalentado a 70°C), se dejó reposando por 5 min a 60°C y se agregaron 150 μ l de cloroformo, se mezcló manualmente. Se adicionaron 120 μ l de DEPC 0.1% y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Se removió la fase acuosa y adicionó 1 ml de etanol absoluto, se dejó precipitando por 1 h o toda la noche a -20°C. Se recuperó el ARN centrifugando a 12,000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante, se centrifugaron las muestras al vacío para evaporar el etanol y la pastilla se resuspendió en 50-100 μ l de DEPC 0.1% y se guardó a -20°C.

4.11 Síntesis de ADN complementario.

Para la síntesis de ADN complementario se utilizó el kit Revert Aid TM H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). El ARN se cuantificó y diluyó a 100 ng/ μ l en agua con DEPC, se tomaron 2 μ l y colocaron en un tubo. Se añadió 1 μ l (2 pmoles/ μ l) de cada oligonucleótido reverso del gen cuya expresión se cuantificara así como del gen control (Tabla 3), a un volumen final de 12 μ l con agua con DEPC, se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se colocó el tubo en hielo y agregó 4 μ l de buffer de reacción 5X, 1 μ l de inhibidor de nucleasa y 2 μ l de nucleótidos 10 mM, se mezcló, centrifugó y se dejó incubando a 37°C por 5 min. Se añadió 1 μ l de reverso transcriptasa y se mantuvo en incubación por 60 min a 42°C. La reacción se detuvo calentando a 70°C por 10 min, se enfrió en hielo y mantuvo en congelación.

4.12 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La cuantificación de la expresión de los genes *arsA* y *arpR* se realizó utilizando como control interno al gen *gyrA*. Para los genes *arsA*, *arsR* y *gyrA* se llevo a cabo la siguiente mezcla por triplicado de cada cepa SW136, SW5, SW7, SW9, SW11, SW13, SW15: 10 μ l de SYBRGREEN (Applied Biosystem), 1 μ l de ADN complementario (5 ng), 1 μ l de los oligonucleótidos Fw (250 nM; *arsA*-RT-F, *arpR*-RT-F y *fw-gyrA* para *arsA*, *arpR* y *gyrA* respectivamente), 1 μ l de los oligonucleótidos Rev (250 nM; *arsA*-RT-R, *arpR*-RT-R y *Rev-gyrA* para *arsA*, *arpR* y *gyrA* respectivamente) y 7 μ l de H₂O estéril. Las mezclas fueron colocadas en una placa de 96 pozos y se colocó en el termociclador. Las condiciones para el PCR tiempo real fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 10 min, 1 ciclo a 95°C por 15 segundos y 1 ciclo a 60°C por 15 min, los dos últimos ciclos se repitieron 40 veces.

4.13 Determinación del inicio de la transcripción.

Los ensayos tipo Primer extension se realizaron con 50 μ g de ARN purificado de cultivos crecidos por 36 h en medio de inducción a enquistamiento

(Burk Butanol, BOH). Las reacciones de extensión se realizaron marcando los oligonucleótidos con gama ATP³² utilizando la enzima polinucleótido cinasa (Roche) y 20 pmol del oligonucleótido e incubando 1 h a 37°C. Para realizar el cADN se utilizó la enzima AMV (Roche) con una temperatura de extensión de 42°C, se precipitó utilizando acetato de amonio 10 M mas 100 µl de etanol absoluto, se centrifugo a 14 mil rpm por 10 min, se lavó con etanol al 70% al menos tres veces y finalmente el pellet fue resuspendido en 8 µl de agua mas 4 µl de colorante. Posteriormente para realizar la secuencia nucleotidica se utilizó el kit Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit (USB) siguiendo las instrucciones del fabricante. El oligonucleótido utilizado para el primer de *arsA* fue ArsA-5 y el plásmidos para la secuencia de la región promotora de *arsA* fue pYRA40.

4.14 Ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA).

Las regiones reguladoras de *arsA*, *arpR* y *rpoS* fueron amplificadas por PCR usando los pares de oligonucleótidos *arsAEMSA1* y *arsAEMSA3*, *arpREMSA1* y *RediR3*, y *emsaSup* y *emsaSdwn* respectivamente y ADN de la cepa SW136 de *A. vinelandii* como templado. Los productos de PCR fueron marcados durante la reacción de PCR con (γ 32P)-dCTP, purificados utilizando el Kit GENE CLEAN^R III (MP). Las reacciones de unión a ADN se realizaron en buffer de unión a (10mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol y 10 µg/ ml BSA], mezclando 10 nmol de cada producto de PCR e incrementando la concentración de proteína MBP-ArpR purificada en un volumen total de 20 µl. Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min, y después separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 6% en buffer 0.5X de Tris-Borato-EDTA (TBE) a temperatura ambiente. El gel se seco y se expuso en un cassette de Fosforimager^R, al cabo de 24 horas se visualizó.

4.15 Determinación de la constante de disociación (Kd).

Para calcular la afinidad de ArpR por la región promotora de *arsA*, se calculó la constante de afinidad (Kd) analizando ensayos de movilidad electroforética en ausencia o presencia de acetoacetil-CoA (5 mM). Las cantidades de ADN retardados utilizando diferentes concentraciones de proteína MBP-ArpR (0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 3000 nM y 10 mM de ADN marcado) fueron calculados a través de densitometría utilizando el software Molecular Dynamics PhosphorImager e ImageQuant. Se grafico la fracción de ADN retardado en función de la concentración de proteína MBP-ArpR utilizada y se calculó la Kd mediante los recíprocos de la cinética de Michaelis-Menten.

4.16 Geles SDS-PAGE y Western blot.

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 12% (ver apéndice) para llevar a cabo electroforesis de proteínas. Los pozos fueron cargados de acuerdo a

la concentración de la muestra más 1 volumen de buffer de carga (ver apéndice); como marcador de peso molecular se utilizó PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Se dejó corriendo el gel a 20 mA por 2 h en solución amortiguadora Tank (ver apéndice). Posteriormente, el gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie durante 1 h, en seguida se lavó con una solución para desteñir por 30 min (ver apéndice). Se corrió un gel de proteínas (SDS-PAGE). Se mantuvo en buffer de transferencia (ver apéndice) la membrana de nylon para transferencia de proteínas y el papel filtro unos minutos, se armó el aparato para transferir proteínas, se ensambló la red conteniendo el gel, la membrana y papeles filtro y se agregó buffer de transferencia, se dejó transfiriendo por 2 h a 150 mA en el cuarto frío, ya terminado el tiempo se desensambló y se colocó la membrana en solución PBS 1X (ver apéndice) por 15 min. Inmediatamente se preparó 20 ml de solución bloqueadora (BSA 3.0% en PBS 1%) y se dejó reposando la membrana por 1 h como mínimo. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con PBS Tween 0.3%, en cada lavado se dejó incubando por 5 min, se continuó con 3 lavados utilizando PBS también por espacios de 5 min. Al finalizar los lavados se agregó el anticuerpo primario Anti-His₆ (Roche) en una relación 1:1000 que se preparó en 15-20 ml de PBS-BSA 0.3%, se dejó toda la noche incubando en el cuarto frío. Al siguiente día se dio nuevamente 3 lavados con PBS-Tween 0.3% y 3 con sólo PBS, se agregó el 2º anticuerpo Anti-Rabbit IgG-POD (Roche) 1:5000 que fue preparado en PBS-BSA 0.3%, se dejó incubando en el cuarto frío por toda la noche. Para finalizar se dieron los 3 lavados con PBS-Tween 0.3% y 3 con PBS, se agregó el reactivo para la reacción de la fosfatasa alcalina, se detuvo la reacción con agua.

CAPÍTULO 5.

RESULTADOS

PARTE 1: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *arsABCD* Y DEL GEN *arpR*.

5.1 *ArpR* activa la transcripción del gen *arsA*.

La proteína ArpR regula la producción de ARs, una mutante en el gen *arpR* abate la producción de estos lípidos y disminuye considerablemente la expresión de *arsA* (Romero, 2008). Los experimentos previos de análisis del inicio de transcripción de *arsA* por “primer extension” en la mutante *arpR* (SW7; fig. 2.3, carril 6), así como la reducida expresión de este gen en la mutante SW7 (*arpR*) con respecto a la cepa silvestre (Fig. 2.4a; Romero, 2008), sugerían que ArpR es un activador de *arsA*. Con el objetivo de evaluar esta posibilidad, se generó el plásmido pBAD-ArpR que permite la expresión de este regulador con una etiqueta de histidinas en *E. coli* a partir de un promotor inducible por arabinosa. Adicionalmente se construyó el plásmido compatible pACYC/pKK-*parsA-cat* que contiene una fusión transcripcional del promotor y la región reguladora de *arsA* con el gen reportero de la cloranfenicol acetil transferasa para monitorear su expresión. Se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α con estos plásmidos y se analizó el efecto de la inducción de la expresión de ArpR sobre la expresión de *parsA-cat* creciendo las cepas en cajas de medio LB conteniendo cloranfenicol (15 μ g/ml), con o sin arabinosa (0.05%). El crecimiento de la cepa en cloranfenicol (expresión del gen *cat*), se observó únicamente en presencia de arabinosa y no en su ausencia (Fig. 5.1a y b). Este resultado se confirmó de manera cuantitativa, determinando la actividad específica de CAT de esta cepa de *E. coli* con ambos plásmidos en medio M9 con glucosa, en presencia y en ausencia de arabinosa. La actividad de CAT determinada en distintas fases del crecimiento (D.O₆₀₀: 0.3 (3 h), 0.8 (6 h) y 1.5 (12 h)), mostró que la transcripción de *arsA* es completamente dependiente de la proteína ArpR (Fig. 5.1c).

En condiciones de no inducción (sin arabinosa), se observaron niveles muy bajos de actividad CAT, mientras que la expresión de ArpR provocó un incremento de 8 veces en la actividad CAT (expresión *arsA*) a las 12 horas. Esto indica que la proteína ArpR es un activador de la expresión de la fusión *parsA-cat* en *E. coli*, donde el gen *arsA* y el regulador ArpR están ausentes. Es importante hacer notar que el máximo de actividad CAT (8 veces) se obtuvo hasta 12 horas después de la inducción de la expresión de *arpR*. Una menor actividad CAT se observó durante los primeros tiempos de inducción (3 y 6 h); esto podría tener dos explicaciones.

Una sería que durante las primeras horas la cantidad de proteína ArpR no es suficiente para obtener la máxima expresión del promotor *parsA-cat*, y la inducción óptima de ArpR se alcanzaría hasta las 12 horas. Sin embargo, ese tiempo de inducción es muy largo. La segunda explicación considera algunos antecedentes que sugieren que la proteína ArpR necesitaría de otro factor, posiblemente un coinductor, para activar la expresión de *parsA-cat*. Dicho factor estaría ausente en

las primeras horas de crecimiento bacteriano y presente a las 12 horas, tiempo en que la bacteria se encuentra en fase estacionaria.

Para descartar la primera opción y determinar si la proteína ArpR está siendo expresada desde las primeras horas de inducción con arabinosa y estimar su cantidad relativa, se realizó un experimento tipo Western Blot con un anticuerpo anti-Histidinas utilizando extractos celulares de *E. coli* DH5 α obtenidos tras 3, 6 y 12 horas de inducción.

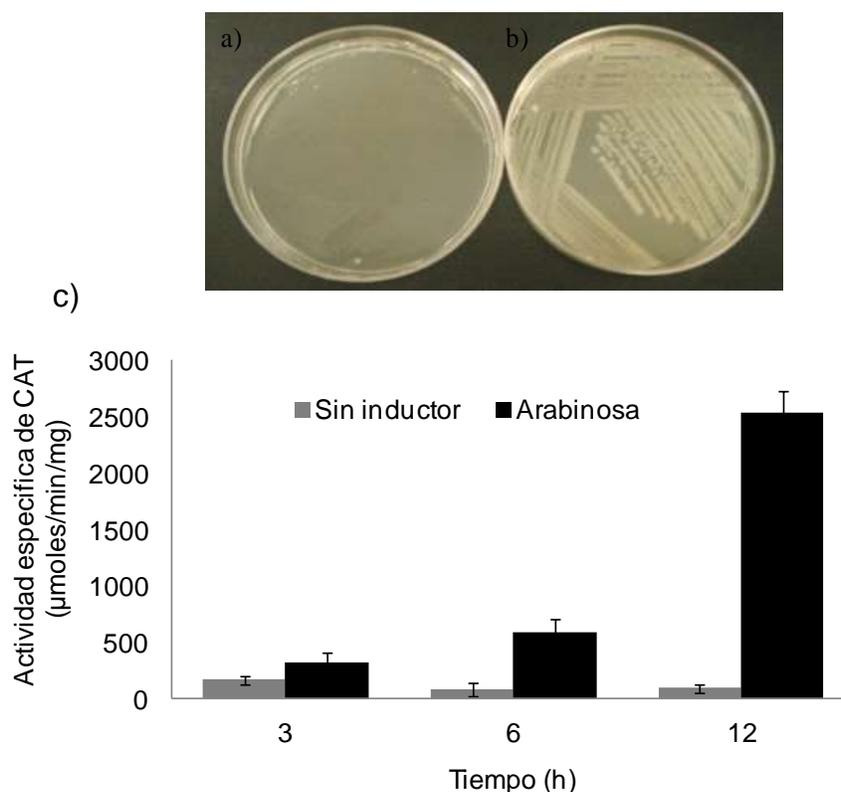


Fig. 5.1: Efecto de ArpR sobre la expresión de *arsA* en *E. coli* DH5 α . El crecimiento en cloranfenicol (a y b) y la actividad específica del reportero CAT en medio sin cloranfenicol (c) requieren de la presencia de la proteína ArpR. La cepa fue transformada con los plásmidos pBAD-ArpR y pACYC/pKK-*parsA-cat*, que contienen el gen *arpR* bajo el control del promotor inducible por arabinosa, y la región reguladora de *arsA* fusionada con el gen reportero *cat* respectivamente. (a) Cepa sembrada en ausencia de arabinosa. (b) Cepa crecida en presencia de arabinosa. (c) Las actividades fueron tomadas a distintos tiempos de crecimiento sin inductor y en presencia de arabinosa en medio M9 suplementado con glucosa. Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

Los resultados del Western Blot revelaron que ArpR se expresa desde las primeras horas de inducción (Fig. 5.2). Esto permitió concluir que la baja actividad de CAT obtenida a 3 y 6 horas (Figura 5.1) no se debe a una baja expresión de ArpR, y podría deberse a la ausencia de algún factor adicional (coinductor) requerido para que ArpR active la expresión del reportero. Dicho coinductor

estaría presente durante la fase estacionaria de crecimiento (12 h) lo que permitiría una mayor expresión de CAT.

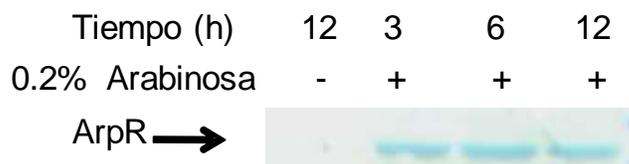


Fig. 5.2: Ensayo tipo Western Blot para detectar la expresión de ArpR en *E. coli* DH5 α . Se utilizó un anticuerpo para detectar la etiqueta de histidinas de la proteína ArpR. Se usaron extractos celulares obtenidos de los cultivos en medio M9 con o sin arabinosa reportados en la figura 6.1c.

5.2 *ArpR se une a la región reguladora del gen arsA.*

El sistema heterólogo de activación de la transcripción de *arsA* en *E. coli* utilizando como reportero el gen *cat* (Fig. 5.1), permitió determinar que ArpR activa la expresión del gen *arsA*. Para determinar que esta regulación es directa se analizó la interacción de esta proteína con la región reguladora de *arsA*. Se purificó ArpR como una proteína de fusión MBP-ArpR, expresada desde el plásmido pMAL-ArpR. La unión de la proteína MBP-ArpR al producto de PCR marcado con ^{32}P -CTP (10 nM) que abarca la región reguladora de *arsA* (-209 al +82 con respecto al sitio de inicio de la transcripción) fue examinado a través de ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA). La presencia de la proteína MBP-ArpR cambió el patrón de migración del fragmento *arsA* desde una concentración de 50 nM (Fig. 5.3, carril 3).

Por el contrario, al utilizar un fragmento de ADN conteniendo la región reguladora de *rpoS*, el cual fue utilizado como control negativo, no se observaron cambios en el patrón electroforético, aun cuando se utilizó una concentración de 1 μM de MBP-ArpR purificada (Fig. 5.3, carril 10). La especificidad de la interacción fue confirmada haciendo ensayos de competencia en la unión de MBP-ArpR entre *arsA* marcado y los fragmentos específico (100 veces más *arsA*; fig. 5.3, carril 7) y no específico (*rpoS*; fig. 5.3, carril 8) no marcados. Como se muestra en la figura 5.3, sólo el fragmento de *arsA* no marcado (carril 7) fue capaz de competir por la unión entre MBP-ArpR y el ADN marcado de *arsA*.

La unión específica de ArpR a la región reguladora *arsA*, soporta la idea que la expresión de *arsA* es activada de manera directa por el regulador transcripcional ArpR.

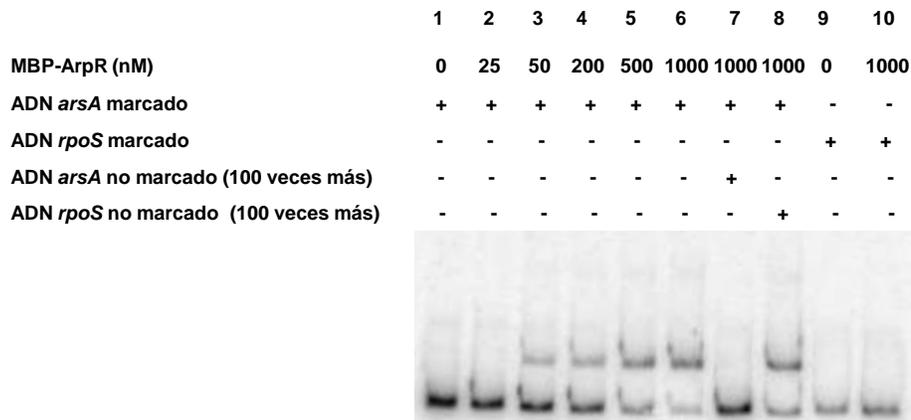


Fig. 5.3. ArpR interacciona de manera específica con la región reguladora de *arsA* *in vitro*. Ensayo tipo EMSA con un fragmento de PCR conteniendo la región reguladora de *arsA* (*arsA* -209/+82). Los fragmentos de ADN (10 nM) se mezclaron e incubaron con concentraciones crecientes de MBP-ArpR: 0, 25, 50, 200, 500 y 1000 nM (carriles 1 a 6). Para los ensayos de competencia al fragmento *arsA* -209 /+82 con 1.0 μ M de MBP-ArpR purificada se agregó 100 veces más de ADN específico (*arsA*-209 /+82) no marcado (carril 7) o ADN inespecífico (región reguladora de *rpoS*) (carril 8). Como ADN control se usó la región reguladora de *rpoS* con o sin MBP-ArpR (carriles 9 y 10 respectivamente). Los fragmentos se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida al 12%.

5.3 La expresión del gen *ArpR* se activa sólo en condiciones de enquistamiento.

Dado que la proteína ArpR es esencial para activar la transcripción de *arsA*, se determinaron las condiciones bajo las cuales se expresa el gen *arpR*; para ello se realizó un experimento en condiciones de crecimiento vegetativo y bajo condiciones de enquistamiento. La expresión de los mensajeros de *arpR* se detectó mediante transcripción reversa y PCR no cuantitativo (RT-PCR). Para esta técnica se utilizó ARN extraído de cultivos crecidos a distintos tiempos de incubación. De los ADNs complementarios obtenidos de cada ARN, se amplificaron fragmentos de *arpR* de un tamaño de 300 pb. Como control se amplificaron fragmentos de *gyrA* de un tamaño de 100 pb. Los productos de estas reacciones se corrieron en un gel de agarosa. En la figura 5.4a se observa que se amplificaron fragmentos de *arpR* sólo en condiciones de enquistamiento y no durante crecimiento vegetativo. De esta manera se demostró que la expresión del gen *arpR* es regulada de manera diferencial y éste se expresa sólo durante el enquistamiento, al igual que la expresión del gen *arsA* (Segura *et al.*, 2009).

El resultado anterior fue confirmado cuantificando la actividad β -glucuronidasa de una fusión transcripcional *parpR-gusA* en células vegetativas y en células inducidas a enquistamiento de la cepa YRR50 (SW136, fusión *parpR-gusA* transcripcional) de *A. vinelandii*. Como se muestra en la figura 5.4b, los resultados reflejaron un incremento en la expresión de *arpR* de hasta 20 veces durante el proceso de enquistamiento, mientras que en condiciones vegetativas la

expresión fue significativamente baja y sólo aumentó ligeramente en tiempos tardíos del cultivo.

5.4 *ArpR activa su propia expresión.*

Dado que el regulador transcripcional ArpR tiene homología con reguladores de la familia LysR, cuyas proteínas en muchos casos autoregulan su expresión (Schell, 1993, Maddocks y Oyston, 2008), se decidió determinar si ArpR estaría regulando también su transcripción. Se comparó la expresión de *arpR* en la cepa silvestre SW136 y en la cepa mutante en el gen *arpR* (SW7) que contiene una inserción de un transposón en la posición 756 de este gen. Para cuantificar los mensajeros de *arpR* se usó la técnica de reverso transcripción y PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando ARN extraído 36 horas después de la inducción a enquistamiento.

Para la RT-qPCR se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 100 nucleótidos en la región que antecede a la inserción. Como se muestra en la figura 5.5, la mutante SW7 presentó una disminución de hasta un 85% en la expresión relativa de *arpR* con respecto a la cepa silvestre. El resultado indica que ArpR tiene un efecto positivo en la cantidad de sus propios transcritos.

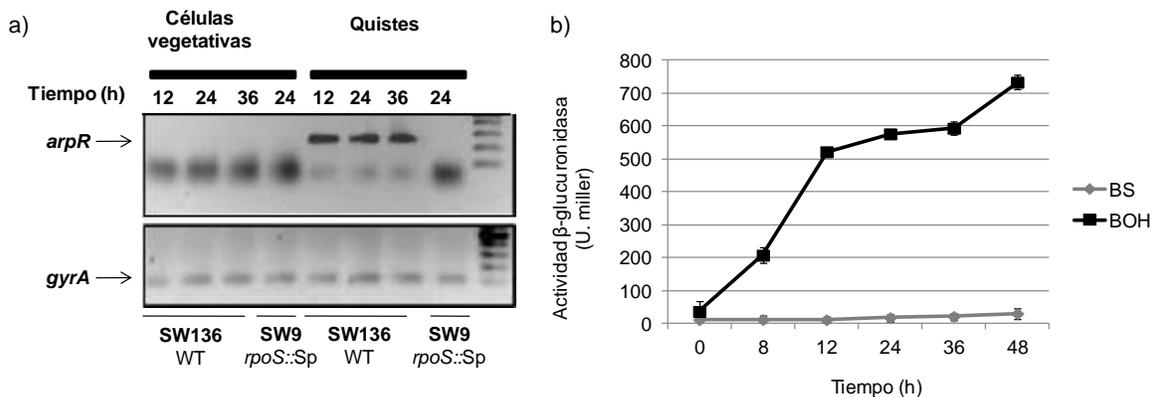


Fig. 5.4: Expresión de *arpR* y *gyrA* determinada mediante RT-PCR (a) y cuantificación de la actividad β -glucuronidasa de una fusión transcripcional *parpR-gusA* en cromosoma de la cepa YRR50 de *A. vinelandii* (b). El tiempo de crecimiento de las cepas en (a) fue a las 12, 24 y 36 h en cada condición. Se utilizó la cepa SW9 (*rpoS*) como control negativo. Panel superior: fragmentos *arpR* amplificados. Panel inferior: fragmentos de *gyrA* amplificados. La actividad β -glucuronidasa en (b) fue determinada durante condiciones de crecimiento vegetativo (BS, \blacklozenge) y de inducción a enquistamiento (BBOH, \blacksquare).

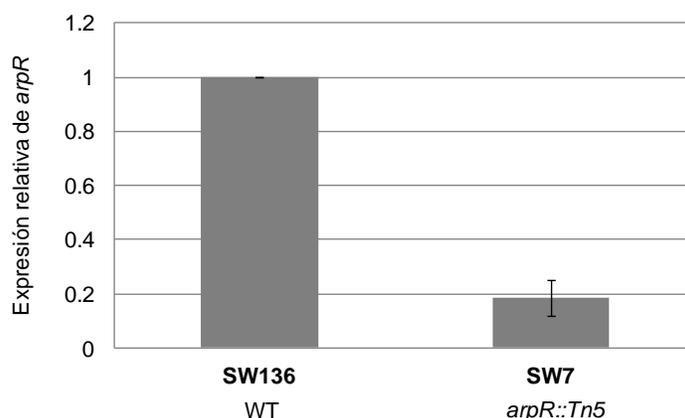


Fig. 5.5: Expresión relativa de *arpR* en la cepa silvestre (SW136) y la mutante *arpR*⁻ (SW7) bajo condiciones de enquistamiento (36 horas). Se ilustra el promedio \pm desviación estándar.

Los resultados anteriores fueron confirmados a través de ensayos de expresión heteróloga en *E. coli*, en donde se utilizó el plásmido pBAD-ArpR que expresa el regulador ArpR a partir de un promotor inducible, y se construyó un plásmido llevando una fusión transcripcional de la región reguladora de *arpR* y el gen reportero *cat* (*parpR-cat*, plásmido pACYC/pKK-*arpR-cat*).

Ambos plásmidos se introdujeron a la cepa de *E. coli* DH5 α . Se determinó la actividad específica de CAT de esta cepa a las 12 horas, en ausencia o presencia de arabinosa como inductor. Como se muestra en la figura 5.6, se observó un aumento en la actividad CAT (Expresión *parpR-cat*) de hasta 15 veces en presencia del inductor arabinosa (Expresión de ArpR) con respecto a la condición sin inducción (no expresión de ArpR).

Los datos demuestran que el regulador transcripcional ArpR, al igual que la mayoría de las proteínas de la familia LysR, autoregula su expresión, a pesar de que el gen que codifica la proteína no se encuentra de manera divergente al gen blanco (gen *arsA*), a diferencia de lo que ocurre frecuentemente con estos reguladores (Schell, 1993).

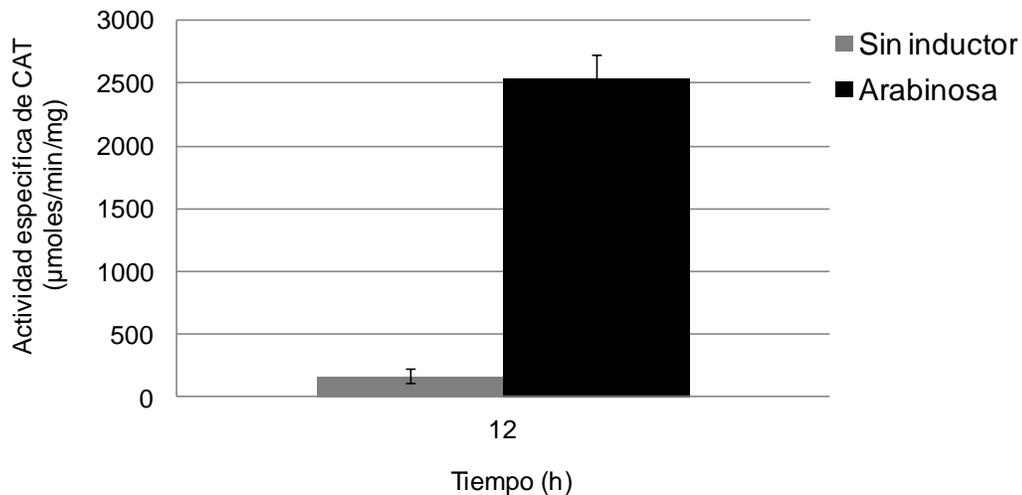


Fig. 5.6: Efecto de ArpR sobre la expresión de *arpR*. Determinación de la actividad específica de CAT al fusionar el promotor de *arpR* con el gen *cat* en *E. coli* DH5 α llevando los plásmidos pBAD-ArpR y pACYC/pKK-*arpR-cat* a las 12 horas de crecimiento en ausencia y presencia de arabinosa en medio M9 suplementado con glucosa. Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

5.5 ArpR autoregula su transcripción positivamente uniéndose a su región reguladora *arpR*.

Los valores de expresión relativa de *arpR* en la mutante SW7 con respecto a los de la cepa silvestre (Fig. 5.5) y los resultados de inducción de la expresión de la fusión *parpR-cat* en *E. coli* en presencia de ArpR (Fig. 5.6) indican que ArpR regula su propia transcripción de manera positiva. Para confirmar la interacción de ArpR sobre su propia región reguladora se realizaron ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA).

Los ensayos tipo EMSA se realizaron mezclando concentraciones crecientes de la proteína MBP-ArpR purificada (0, 25, 50, 200, 500 y 1000 nM) y 10 nM de un fragmento de PCR marcado con ^{32}P -CTP que abarca la región reguladora del -217 al + 82 con respecto al primer sitio (P1) de inicio de la transcripción de *arpR* (fig. 5.8). Como se muestra en la figura 5.7, ArpR se une específicamente a su propia región reguladora de una manera dependiente de concentración, observándose un cambio en el corrimiento de las bandas desde 50 nM.

	1	2	3	4	5	6	7	8
MBP-ArpR (nM)	0	25	50	200	500	1000	1000	1000
ADN <i>arpR</i> marcado	+	+	+	+	+	+	+	+
ADN <i>arpR</i> no marcado (100 veces más)	-	-	-	-	-	-	+	-
ADN <i>rpoS</i> no marcado (100 veces más)	-	-	-	-	-	-	-	+

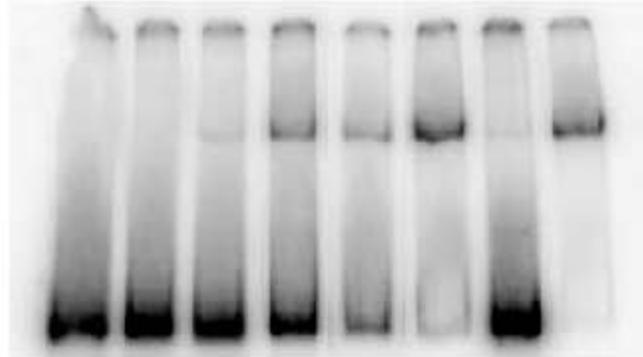


Fig. 5.7. ArpR interacciona con su propia región reguladora *arpR* in vitro. Se realizó un ensayo tipo EMSA con un fragmento de PCR conteniendo la región reguladora de *arpR* (*arpR* -217 al + 82). Los fragmentos de ADN (10 nM) se mezclaron e incubaron con concentraciones crecientes de MBP-ArpR: 0, 25, 50, 200, 500 y 1000 nM (carriles 1 a 6). Para los ensayos de competencia al fragmento *arpR* -217/+82 con 1.0 μ M de MBP-ArpR purificada se agregó 100 veces más de ADN específico (*arpR* -217 al + 82) no marcado (carril 7) o ADN inespecífico (*rpoS*) (carril 8). Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida al 12%.

La especificidad de la interacción de ArpR por su región reguladora fue confirmada a través de ensayos de competencia. En la figura 5.7 se observa que un fragmento específico no marcado (100 veces más *arpR*; carril 7) logró competir con *arpR* marcado por la unión de MBP-ArpR, mientras que el fragmento no específico no (*rpoS*, carril 8).

5.6 Efecto de la mutación *rpoS* en la expresión del gen *arpR*.

Se tenía el antecedente de que en una mutante *rpoS* la expresión del gen *arsA* disminuye de manera significativa (Romero, 2008), a pesar de no haber encontrado en la secuencia de su región reguladora un posible promotor dependiente del factor sigma RpoS. Esto sugiere que la regulación de RpoS sobre la expresión de *arsA* sería a través de algún intermediario, el cual puede ser ArpR.

Al observar el efecto que ejerce la mutación *rpoS* sobre la expresión de *arpR* en condiciones de enquistamiento (36 h) a través de RT-qPCR, se notó un decremento de hasta un 95% la expresión de *arpR* en la cepa SW9 (*rpoS*) con respecto a la cepa silvestre SW136 (Fig. 2.4b). Esto indica que RpoS es esencial para la expresión del gen *arpR*. Con la finalidad de investigar la regulación de

ArpR, se analizó la región intergénica 5' del gen *arpR* y se localizó, a 105 nucleótidos del codón de inicio de la traducción del gen, una posible caja -10 típica de promotores reconocidos por el factor sigma S (Castañeda *et al.*, 2001; fig. 5.8), lo cual apoya la hipótesis de que RpoS podría ejercer su efecto sobre la expresión de *arsA* a través del control de la expresión de ArpR como intermediario.

Para verificar esta hipótesis, se realizó la amplificación directa de los sitios de inicio de la transcripción del gen *arpR* por DMTSS (Mendoza-Vargas, et al., 2009) en la cepa silvestre SW136. Como se observa en la figura 5.9, tres productos de la extensión fueron secuenciados y permitieron mapear el extremo 5' de *arpR*. El inicio P1, localizado en el residuo G a 64 pb rio arriba del codón de inicio de la traducción de *arpR* corresponde al sitio de inicio de la transcripción identificado anteriormente por primer extensión (Dato no mostrado).

Para este posible inicio, la caja -10 identificada (CTCGATT, marcada en la fig.6.8a) se localiza a 7 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción (P1), lo que sugiere que corresponde al promotor P1.

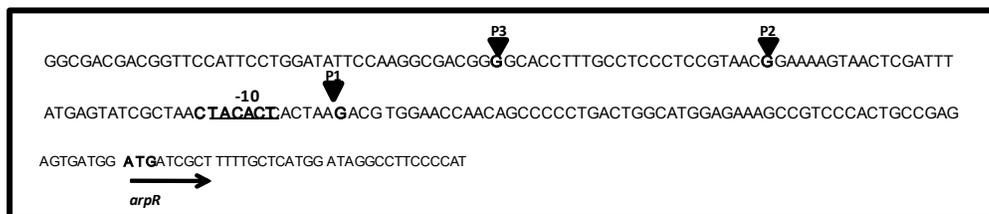


Fig. 5.8: Análisis de la región promotora de *arpR* y sus posibles sitios de inicio de la transcripción. Región intergénica 5' de *arpR*. El sitio -10 que reconoce el factor sigma S está subrayado y los sitios de inicio marcados como P1, P2 y P3.

Adicionalmente al sitio P1, se identificaron dos sitios de inicio de la transcripción los cuales se denominaron P2 y P3. Estos posibles sitios están ubicados a 108 y 132 pb del codón de inicio de la traducción respectivamente (Fig. 5.8 y 5.9).

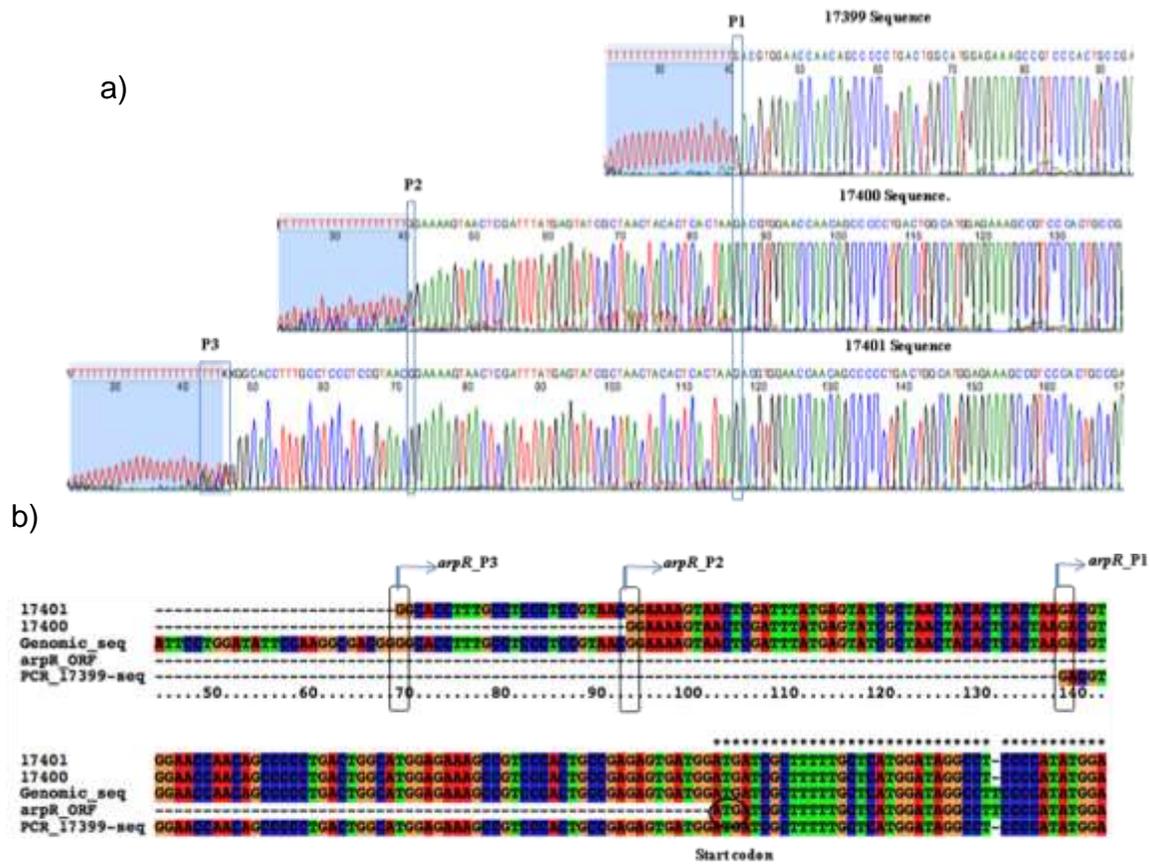


Fig. 5.9: Mapeo de los sitios de inicio de la transcripción del gen *arpR*. a) secuencia de nucleótidos de los productos de PCR. El nucleótido inmediatamente antes de la cola de polinucleótidos corresponde a los sitios de inicio de la transcripción. b) comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia del gen *arpR* (Avin_19160) y su región intergénica reportadas.

El resultado anterior es una evidencia que sugiere, que la regulación de RpoS sobre *arsA* podría ser indirecta al regular a su activador transcripcional ArpR dado que, entre los tres posibles sitios de inicio de la transcripción P1 permitió identificar una caja -10 que es reconocida por los factores sigma RpoS.

PARTE II: REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *arsABCD* Y *ArpR*.

5.7 El regulador de respuesta *GacA* actúa a través del sistema *RsmA/RsmZ*.

Los reguladores globales *GacA*, *RsmZ1* y *RsmA* están involucrados en el control de la síntesis de ARs dado que, la inactivación de estos reguladores afecta la producción de estos lípidos, así como la expresión de *arsA* y de *arpR* (Romero, 2008). Anteriormente se descartó el efecto del sistema de dos componentes *GacS/GacA* sobre la expresión de *arpR* y *arsA* en *A. vinelandii* SW136, a través del control de la expresión del factor sigma *RpoS*, dado que en la cepa SW136 de *A. vinelandii*, *GacA* no regula la expresión de *rpoS*, como sucede en la cepa ATCC 9046 (Romero, 2008).

Con este antecedente se consideró que la regulación por *GacA* podría ser a través del sistema *RsmA/RsmZ* como intermediario, pues *GacA* activa la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* en las cepas ATCC9046 y AEIV de *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011). Así, se planteó la hipótesis de que el sistema *GacS/GacA* podría estar controlando la producción de ARs al regular la expresión de *RsmZ*, que titularía a la proteína *RsmA*, que sería un regulador negativo de la traducción de *arpR* o de *arsA*.

Para evaluar el efecto de la mutación *gacA* sobre la transcripción de *rsmZ1*, se comparó la actividad de β -glucuronidasa en las cepas YRR62 y YRR63 (SW136 (WT) y SW5 (*gacA*⁻) que llevan una fusión transcripcional *prsmZ1-gusA* en el cromosoma). La actividad de β -glucuronidasa se determinó durante el crecimiento en medio Burk suplementado con sacarosa (Medio BS; fig. 6.1a).

Como se muestra en la figura 6.1b, la actividad de β -glucuronidasa en la cepa SW136 fue aumentando durante la curva de crecimiento, hasta alcanzar una máxima actividad a las 24 h. En la mutante en *gacA* la expresión de *rsmZ1* disminuyó drásticamente (Fig. 6.1b)

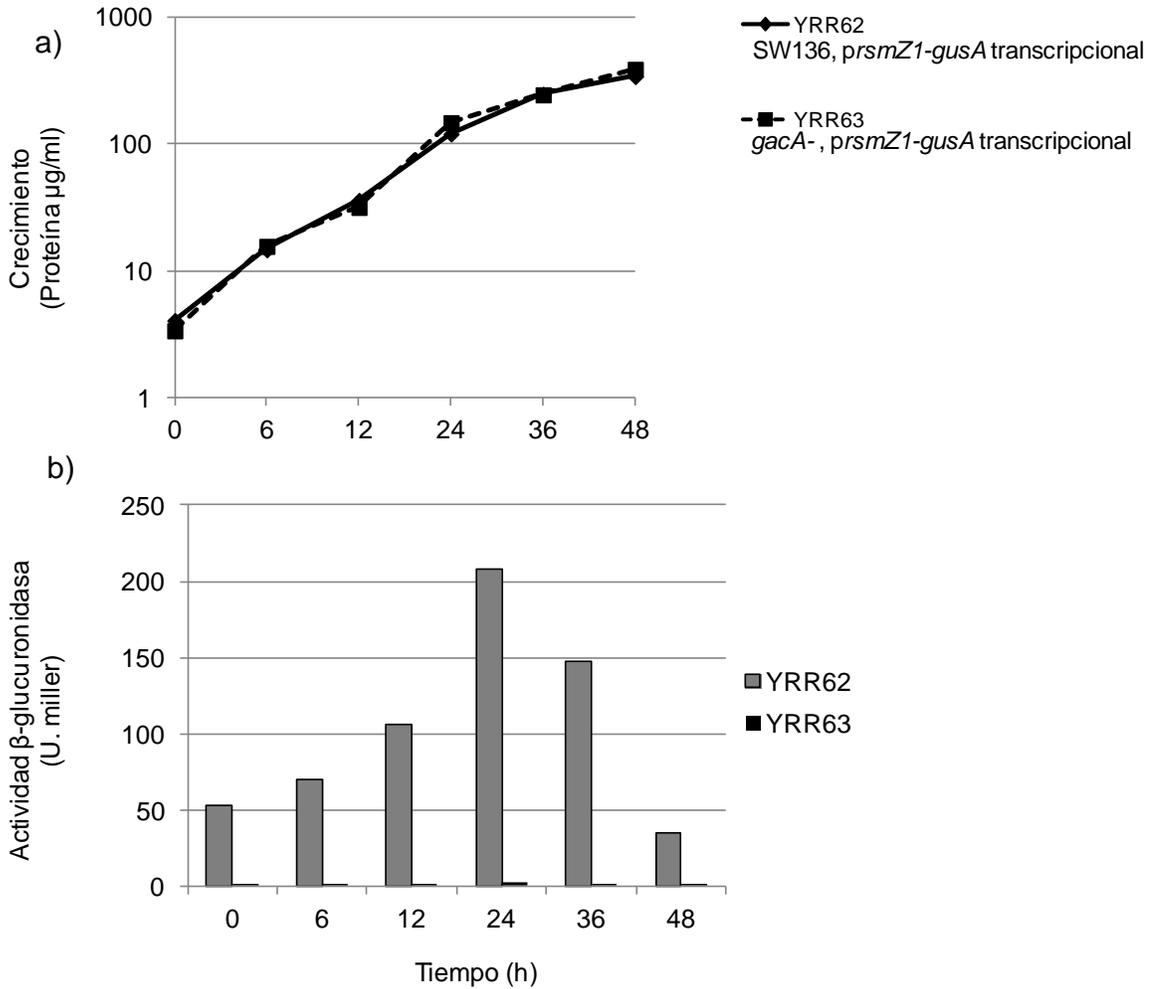


Fig. 6.1: Crecimiento (a) y actividad de β -glucuronidasa representando la expresi3n de *rsmZ1* (b) en medio Burk sacarosa mostrado para las cepa YRR62 (Fondo gen3tico silvestre; \blacktriangle y barras grises) y YRR63 (Mutante en *gacA*; \blacksquare y barras negras).

Se midi3 tambi3n la actividad de β -glucuronidasa de ambas cepas YRR62 (fondo silvestre) y YRR63 (fondo *gacA*⁻) llevando la fusi3n *prsmZ1-gusA* en condiciones de inducci3n a enquistamiento.

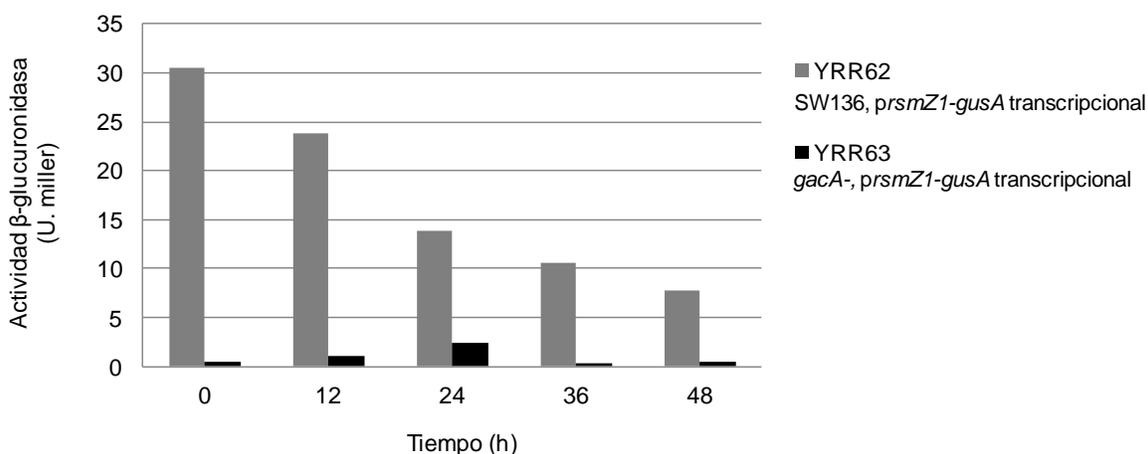


Fig. 6.2: Actividad de β -glucuronidasa que representa la expresión de *rsmZ1* en medio de inducción a enquistamiento en las cepas YRR62 (fondo silvestre) y YRR63 (*gacA*⁻, derivada de SW136).

Como muestra la figura 6.2, la expresión de *rsmZ1* en la cepa silvestre SW136 va decayendo de acuerdo al tiempo de inducción a enquistamiento. Bajo esta condición, GacA también se requiere para la expresión del ARN no traducible RsmZ1, ya que en la cepa SW5 su expresión disminuyó drásticamente. Los resultados anteriores indican que en condiciones de enquistamiento la expresión de *rsmZ1* es también dependiente de GacA, tal como lo observó Manzo *et al.*, 2011 en condiciones vegetativas.

5.8 Los transcritos de *arsA* y *arpR* son un posible blanco del sistema RsmA/RsmZ.

Mutaciones en el sistema RsmA/RsmZ, afectan la producción y acumulación de ARs (Romero, 2008). Se observó que una mutación *rsmZ1* provocó un bloqueo en la síntesis de ARs, mientras que una mutación *rsmA* la afectó de manera positiva, observándose una sobreproducción con respecto a la cepa silvestre (Fig. 2.2). Al cuantificar por RT-qPCR la cantidad de transcritos de *arpR* y *arsA* en ambas cepas (Fig. 2.4), los resultados correlacionaron con los fenotipos de producción de alquilresorcinoles.

Se observó un decremento en la cantidad de transcritos de *arsA* y *arpR* en la cepa SW13 (*rsmZ1*⁻), mientras que en la cepa SW11 (*rsmA*⁻) se obtuvo un aumento de sólo un 20% y de hasta 2 veces más transcritos para *arsA* y *arpR* respectivamente (Fig. 2.4). Dado que el ensayo RT-qPCR no permite determinar a qué nivel se da la regulación del sistema Rsm (RsmA es un regulador de la traducción) sobre *arpR* y *arsA*, se examinó la expresión de ambos genes midiendo la actividad de β -glucuronidasa de las cepas YRR30 a YRR59 llevando fusiones transcripcionales y traduccionales *parsA-gusA* y *parpR-gusA* integradas en el cromosoma en el fondo genético de la cepa SW136 de *A. vinelandii* y en el de

cada una de las mutantes en los genes *gacA*, *arpR*, *rpoS*, *rsmA* y *rsmZ1* (para ver descripción de las cepas dirigirse a la tabla 1) bajo condiciones de inducción a enquistamiento. Las actividades de las fusiones también fueron cuantificadas en cepas que llevaban mutaciones en los genes que codifican para los reguladores transcripcionales ArpR y RpoS, para confirmar los resultados obtenidos por RT-qPCR.

En la figura 6.3a se muestran las actividades de las fusiones transcripcional y traduccional *parsA-gusA* en los distintos fondos genéticos. En las cepas YRR38 y YRR39 con las fusiones *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente (fondo en *rsmA*) se observó un incremento considerable en la actividad glucuronidasa, con respecto a la cepa silvestre. Dado que RsmA es un regulador de la traducción, este resultado sugiere que la regulación podría darse a través del control traduccional del activador *arpR*, aunque no se puede descartar la regulación adicional de *arsA* por RsmA. Los niveles de actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcional y traduccional fueron similares entre ellas en el resto de las cepas YRR32 a YRR37, de manera que los reguladores GacA, ArpR y RpoS estarían regulando a *arsA* a nivel transcripcional (Fig. 6.3a). Para el caso de RpoS, la regulación sería al menos en parte a través del control de la expresión de *arpR*, como fue demostrado anteriormente.

El análisis de las cepas YRR38 y YRR39 (mutantes en el fondo *rsmA* con las fusiones transcripcionales y traduccionales *parsA-gusA* respectivamente) sugiere que RsmA podría tener como blanco a *arpR*. Para confirmar esta hipótesis, se construyeron también las fusiones *parpR-gusA* transcripcional y traduccional y se integraron al cromosoma de las cepas, tanto silvestre, como mutantes en cada uno de los reguladores globales. Se midieron las actividades de GusA de ambas fusiones en cultivos tras 36 horas de inducción a enquistamiento.

La figura 6.3b contiene los resultados de las mediciones. Como se puede observar, hay grandes diferencias entre los niveles de expresión de las fusiones transcripcionales y las traduccionales en las cepas YRR52 y YRR53 (*gacA*⁻, transcripcional y traduccional respectivamente) y YRR58 y YRR59 (*rsmZ1*⁻, transcripcional y traduccional respectivamente); se observó actividad sólo en las cepas de YRR52 y YRR58 que llevan la fusión transcripcional y no en las que tienen la fusión traduccional, lo que indica que GacA y RsmZ1 se encuentran regulando la expresión de *arpR* a nivel post-transcripcional. Este resultado es coherente con la hipótesis de que RsmA funcionaría como un regulador negativo de la traducción del regulador ArpR, RsmZ1 titularía a RsmA, ejerciendo un efecto positivo en la traducción de *arpR* y GacA sería un regulador positivo de la expresión de *rsmZ1*.

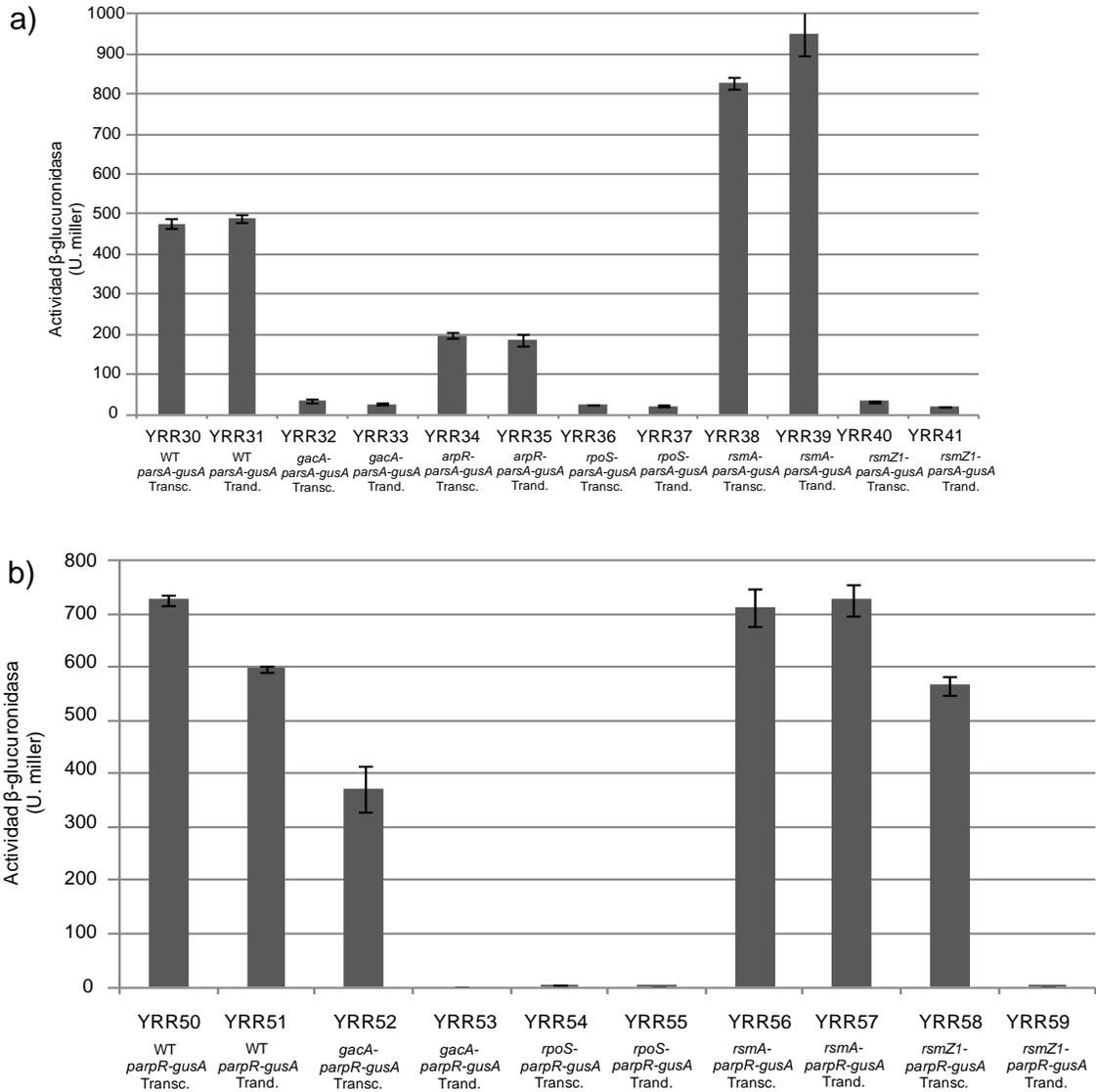


Fig. 6.3: Efecto de la inactivación de distintos reguladores sobre la expresión de *arsA* (a) y de *arpR* (b) medida como actividad de β -glucuronidasa de fusiones transcripcionales y traduccionales. En el panel a) se utilizaron fusiones *parsA::gusA* y en el b) *parpR::gusA*. Las cepas usadas en panel (a) fueron: YRR30 y YRR31 (SW136 con fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR32 y YRR33 (fondo *gacA*⁻ con fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR34 y YRR35 (fondo *arpR*⁻ con fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR36 y YRR37 (fondo *rpoS*⁻ con fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR38 y YRR39 (fondo *rsmA*⁻ con fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente) y YRR40 y YRR41 (fondo *rsmZ1*⁻ con fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente). Las cepas del panel (b) fueron: YRR50 y YRR51 (SW136 con fusión *parpR-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR52 y YRR53 (fondo *gacA*⁻ con fusión *parpR-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR54 y YRR55 (fondo *rpoS*⁻ con fusión *parpR-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), YRR56 y YRR57 (fondo *rsmA*⁻ con fusión *parpR-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente), y YRR58 y YRR59 (fondo *rsmZ1*⁻ con fusión *parpR-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente). Las cepas fueron inducidas a enquistamiento (36 horas). Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación

Las cepas YRR38 y YRR39 (*rsmA*⁻ conteniendo fusión *parsA-gusA* transcripcional y traduccional respectivamente) presentaron actividades de β-glucuronidasa altas con respecto a la cepa silvestre y similares entre ellas. Esto podría deberse a que RsmA, además de fungir como un regulador negativo de la traducción, afecta la estabilidad de sus mensajeros blanco. Así, es probable que la ausencia de RsmA permita una mayor estabilidad de los mensajeros de *arpR* y, por lo tanto, una mayor concentración de transcritos.

Esto explicaría también el efecto de la mutación *rsmA* sobre la transcripción de *arsA* dado que, la mayor cantidad de transcritos de *arpR*, así como de su proteína al perderse la regulación negativa de su traducción, afectaría positivamente la transcripción de *arsA* (Fig. 6.3a). En las cepas YRR54 y YRR55, mutantes de *rpoS* que llevan las fusiones transcripcional y traduccional respectivamente, prácticamente no se detectaron actividades de β-glucuronidasa, esto confirma que el factor sigma RpoS es necesario para activar la expresión de *arpR*.

5.9 GacA controla la producción de ARs por una vía adicional al control del sistema RsmA/RsmZ

Una de las estrategias que originalmente se propuso para determinar si la regulación de *arpR-arsA* por GacS/GacA se da sólo a través del sistema RsmA/RsmZ, fue el generar la mutación *rsmA* en el fondo genético de la cepa SW5 (*gacA*⁻), que presenta un bloqueo en la síntesis de ARs (fenotipo blanco).

De acuerdo con los resultados anteriormente expuestos, en la mutante *gacA*⁻, RsmA se encontraría libre por la falta de su titulador, el ARN *rsmZ1*, cuya expresión es activada por GacA. El bloqueo en la síntesis de ARs se debería al efecto represor de RsmA sobre *arpR*. De ser cierta esta hipótesis, la mutación en *rsmA* en el fondo de la cepa SW5 (*gacA*⁻) sería supresora del fenotipo de no producción de ARs pues permitiría la traducción de *arpR* y consecuentemente la expresión de *arsA* y la síntesis de ARs. Por ello, se realizó la doble mutante *gacA*⁻/*rsmA*⁻, integrando la mutación *gacA*::Gm en el cromosoma de la cepa SW11 (*rsmA*⁻), generando la mutante SW15. Se confirmó el remplazo del gen *gacA* silvestre por el gen inactivo *gacA*::Gm mediante amplificación por PCR (Dato no mostrado).

Al analizar el fenotipo de producción de ARs de las cepas dobles mutantes (*gacA*⁻/*rsmA*⁻), se observó la mutación *rsmA* no suprimió el fenotipo de no producción que provoca la mutación *gacA* (Fig. 6.4a y 4b) como sí sucede en la mutante SW17 (*rsmZ1*⁻/*rsmA*⁻, dato no mostrado).

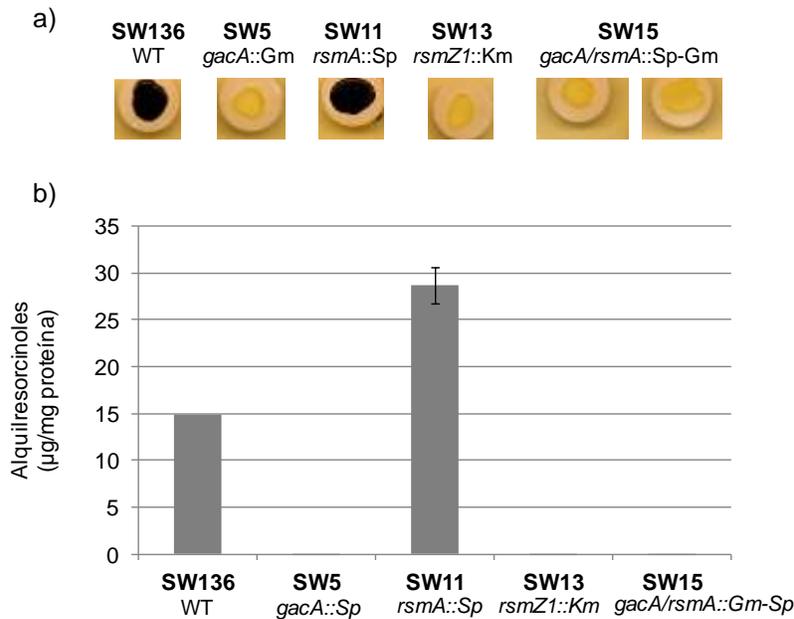


Fig. 6.4. Fenotipo (a) y producción de alquilresorcinolos (b) en las cepas SW136 (WT), SW5 (*gacA*⁻), SW11 (*rsmA*⁻), SW13 (*rsmZ1*⁻) y SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻). Los resultados son el promedio de dos determinaciones ± desviación estándar.

Para entender la razón de este resultado, se estudió la expresión de *arpR* y de *arsA* en la cepa SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻). Los resultados se grafican en la figura 6.5. Algo que ya se había observado anteriormente fue que los niveles de mensajeros de *arpR* disminuyeron un 50% en la mutante *gacA*, mientras que los de *arsA* presentaron una disminución más drástica (Figuras 2.4 y 6.5). La mutación *rsmA* restableció la expresión de *arpR* en la cepa SW15, provocando incluso su sobreexpresión (50%) con respecto a la cepa silvestre, como se esperaba para el fenotipo de producción de ARs; sin embargo, *arsA* siguió el mismo comportamiento en su expresión que en la mutante *gacA*⁻ (Fig. 6.5), lo que concuerda con la no supresión observada en esta doble mutante.

De los resultados anteriores se deduce que RsmA regula negativamente la expresión del regulador *arpR*, probablemente a nivel de traducción. El efecto de la mutación *gacA* sobre la expresión de *arpR* se dan a través del control de *rsmZ1* y de RsmA. La disminución en un 50% en los niveles del mensajero de *arpR* podrían deberse a que al regular su traducción se afecta su autoactivación, y/o a un efecto en la estabilidad de este mensajero, como se ha reportado que sucede con los mensajeros de otros blancos de RsmA (Hernández-Eligio *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos con la mutante *gacA*⁻/*rsmA*⁻ también indican que el sistema GacS/GacA controla positivamente la síntesis de ARs por una segunda vía que

afecta la expresión de *arsA*, de manera independiente del regulador ArpR y del control positivo de *rsmZ1*.

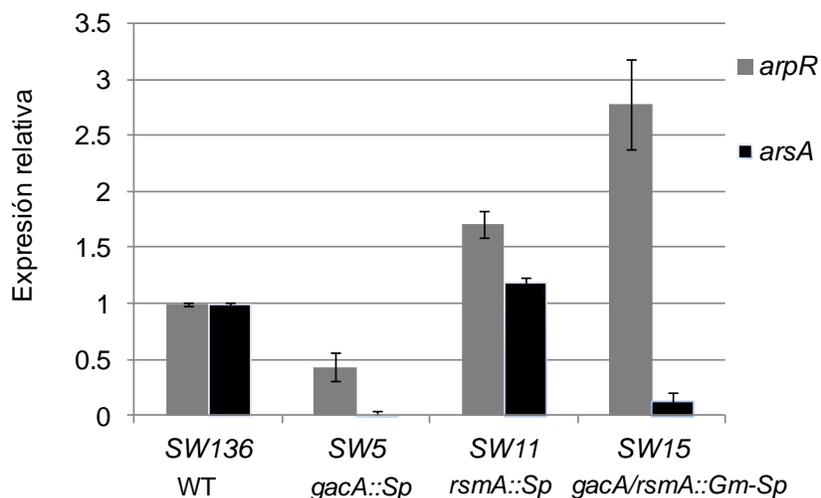


Fig. 6.5: Expresión relativa de *arpR* y *arsA* en la cepa SW136 (WT) y en las cepas mutantes SW5 (*gacA*), SW11 (*rsmA*) y SW15 (*gacA/rsmA*). Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

PARTE III: IDENTIFICACIÓN DEL COINDUCTOR DE ArpR PARA ACTIVAR LA EXPRESIÓN DE *arsA*.

6.1 Los reguladores globales *RpoS*, *GacA*, *RsmA* y *RsmZ1* regulan la expresión del gen *arsA* a través de ArpR.

La mutante SW7 (*arpR*⁻) se encuentra bloqueada en la síntesis de ARs (Fig. 6.6, filtro 2). Para demostrar que este efecto se debe a la inactivación del gen *arpR*, se complementó dicha cepa con un plásmido que lleva el gen *arpR* bajo la regulación de un promotor inducible. Un fragmento *HincII-BamHI* que contiene el gen *arpR* con una etiqueta de 6 Histidinas en la región amino terminal fue clonado en el vector multicopia pBBR1MCS-2, quedando bajo el control del promotor del cassette de resistencia a kanamicina. Al plásmido diseñado se le nombró pBBR-ArpR/His. Este plásmido fue introducido en la cepa mutante SW7 (*arpR*⁻) por conjugación triparental y se mantuvo adicionando kanamicina a una concentración 2 μ g/ml. La complementación de la mutante por introducción de *arpR* en *trans* en el plásmido pBBR-ArpR/His restauró la producción de ARs en condiciones de inducción a enquistamiento (Fig. 6.6, filtro 3). El resultado anterior indica que el bloqueo en la síntesis de ARs que presenta la cepa SW7 (*arpR*⁻) se debe a la inactivación del gen *arpR*.

Los resultados de los capítulos anteriores sugieren fuertemente que los reguladores globales ejercen la regulación sobre *arsA* a través de ArpR. Para confirmar esta hipótesis, se determinó el efecto de la expresión de ArpR a partir del plásmido pBBR-ArpR/His, en las cepas mutantes en los genes *gacA*⁻ (SW5),

rpoS⁻ (SW9), *rsmA*⁻ (SW11), *rsmZ1*⁻ (SW13), y la doble mutante *gacA*⁻/*rsmA*⁻ (SW15) (Fig. 6.6).

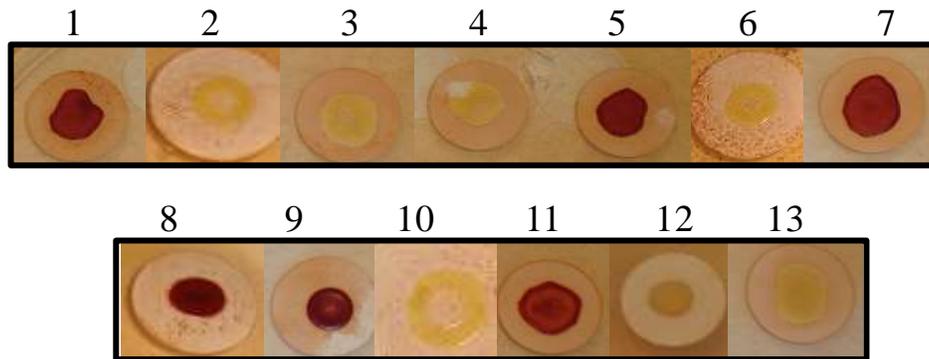


Fig. 6.6: La expresión de *arpR* en *trans* restaura la producción de alquilresorcinoles en mutantes de distintos reguladores. 1. SW136 (WT, pBBR1MCS-2), 2. SW5 (*gacA*⁻), 3. SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His), 4. SW7 (*arpR*, pBBR1MCS-2), 5. SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His), 6. SW9 (*rpoS*⁻), 7. SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His), 8. SW11 (*rsmA*⁻), 9. SW11 (*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His), 10. SW13 (*rsmZ1*⁻), 11. SW13 (*rsmZ1*⁻, pBBR-ArpR/His), 12. SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻) y 13. SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His). Se tiñeron las placas con Fast Blue a las 48 horas de inducción a enquistamiento para visualizar la producción de AR's.

La expresión de *arpR* restableció la producción de ARs en las cepas SW9 (*rpoS*⁻) y SW13 (*rsmZ1*⁻), mientras que en las cepas SW5 (*gacA*⁻), y SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻) no se observó este fenómeno. Estos resultados confirman lo observado en la sección 5.6; la regulación que ejerce RpoS sobre la producción de ARs se da a través de ArpR. También sugieren fuertemente que la regulación del sistema RsmA/RsmZ sobre la síntesis de ARs, se da a través de ArpR, dado que la expresión ectópica del gen *arpR* a partir del plásmido pBBR-ArpR/His en la mutante SW13 (*rsmZ1*⁻), en la que la proteína RsmA está libre por no estar presente su antagonista el RNA RsmZ1, restaura la producción de ARs.

El hecho de que en las mutantes SW5 y SW15 el plásmido pBBR-ArpR/His no restaure la producción de estos lípidos, confirma los resultados del capítulo anterior, que indicaban que GacA regula a *arsA* no sólo a través de ArpR, sino también sobre *arsA* por una vía adicional independiente del regulador RsmZ1. Se cuantificó la producción de ARs de cada una de las cepas y se observó que la cuantificación de estos lípidos correlaciona con los fenotipos observados de tinción de ARs (Fig. 6.7).

Sabemos que *A. vinelandii* se caracteriza por ser poliploide, llegando a tener hasta 80 copias de su cromosoma (Allison *et al.*, 1956). Por lo tanto la restauración parcial de sólo un 50% en la producción de alquilresorcinoles observada en las cepas SW7 (*arpR*⁻), SW9 (*rpoS*⁻) y SW13 (*rsmZ1*⁻) llevando el plásmido pBBR-ArpR/His podría deberse a que *arpR* está expresándose a partir de este plásmido de bajo número de copias.

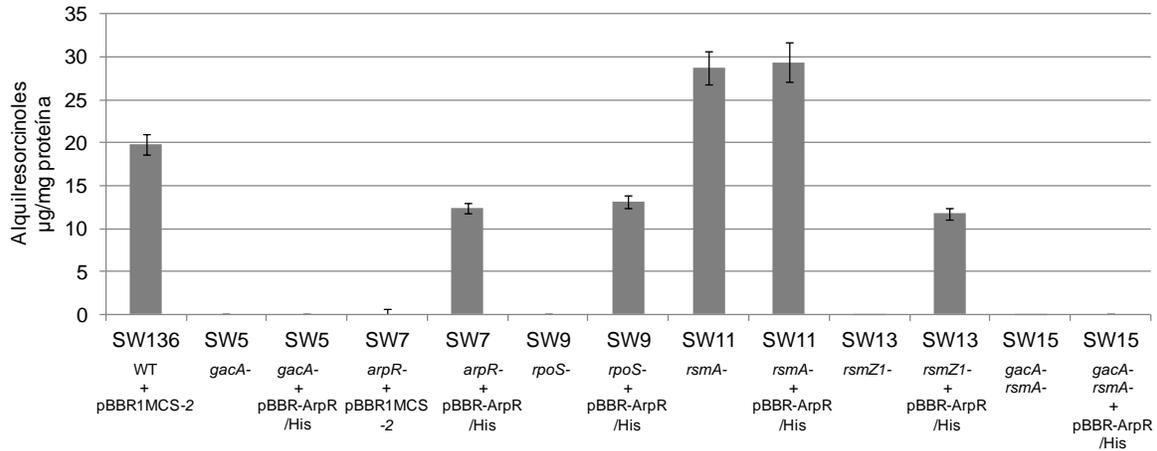


Fig. 6.7: Producción de alquilresorcinoles en cepas expresando *arpR* en trans. Los alquilresorcinoles fueron cuantificados de cultivos a 48 horas de inducción a enquistamiento. SW136 (WT, pBBR1MCS-2), SW5 (*gacA*⁻), SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His), SW7 (*arpR*⁻, pBBR1MCS-2), SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His), SW9 (*rpoS*⁻), SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His), SW11 (*rsmA*⁻), SW11 (*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His), SW13 (*rsmZ1*⁻), SW13 (*rsmZ1*⁻, pBBR-ArpR/His), SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻) y SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His). Los resultados son el promedio de dos determinaciones ± desviación estándar.

Para determinar si la ausencia de ARs en las células vegetativas se debe a la falta de ArpR, se indujo la expresión de *arpR* en cada una de las cepas mutantes con el plásmido pBBR-ArpR/His en medio de crecimiento vegetativo. En ninguna de las mutantes, ni en la cepa silvestre SW136, se observó producción de ARs (Fig. 6.8).

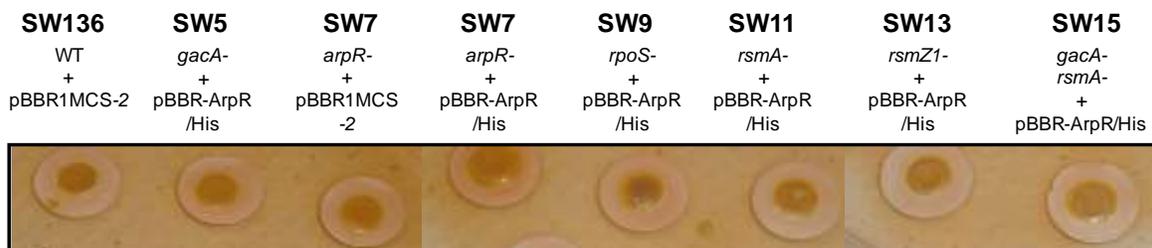


Fig. 6.8: La expresión de *arpR* en trans en células vegetativas no restaura la producción de AR's. Tinción de las colonias de las cepas silvestre y mutantes crecidas por 36 horas en medio BS. 1. SW136 (WT, pBBR1MCS-2), 2. SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His), 3. SW7 (*arpR*⁻, pBBR1MCS-2), 4. SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His), 5. SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His), 6. SW11 (*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His), 7. SW13 (*rsmZ1*⁻, pBBR-ArpR/His) y 8. SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His).

Para demostrar que la proteína ArpR está presente en estas cepas tras la inducción en crecimiento vegetativo, se realizó un Western Blot con el anticuerpo anti-Histidinas para detectar la proteína ArpR en extractos proteínicos de cada una de las cepas complementadas con el plásmido pBBR-arpR/His, crecidas por 36 horas, tanto en condiciones de crecimiento vegetativo como de enquistamiento.



Fig. 6.9: Expresión de *arpR* en *trans* en células vegetativas. Western Blot anti-Histidinas para la detección de ArpR en las cepas 1. SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His) BS, 2. SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His) BOH, 3. SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His) BS, 4. SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His) BOH. 5. SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His) BS, 6. SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His) BOH. Los extractos fueron tomados de cultivos crecidos por 36 horas en medio BS: Condición crecimiento vegetativo. BOH: Condición de enquistamiento.

El Western Blot (Fig. 6.9) demostró que en todas las cepas que llevan el plásmido pBBR-ArpR/His, se expresa la proteína, aún en condiciones de crecimiento vegetativo. El resultado anterior sugiere que para activar la expresión de los genes *ars* y, por ende, la producción de ARs, *arpR* necesita algún factor adicional (coinductor) que está presente sólo en condiciones de enquistamiento y no durante crecimiento vegetativo.

6.2 *ArpR* utiliza acetoacetyl-CoA para activar su propia expresión y la del gen *arsA*.

Dado que en las cepas que expresan *arpR* del plásmido pBBR-ArpR/His no se restableció el fenotipo de producción de ARs en condiciones de crecimiento vegetativo (Figs. 6.8 y 6.9), se consideró la posibilidad del requerimiento de un factor o elemento regulador adicional. Dado que los reguladores de la familia LysR frecuentemente requieren una molécula que funcione como coinductor o corepresor (Schell, 1993), se planteó la hipótesis de que el factor adicional requerido podría ser un metabolito coinductor que permitiera a ArpR activar la expresión de *arsA*. Dicho coinductor estaría relacionado con los cambios metabólicos que se presentan durante la transición del estado vegetativo al estado latente. Los inductores del enquistamiento y consecuentemente, de la síntesis de ARs, son moléculas relacionadas con el metabolismo de lípidos, como son el β -hidroxibutirato y el butanol (Lin y Sadoff, 1968; Sadoff, 1975). Algún compuesto relacionado con el catabolismo de estos inductores del enquistamiento podría desempeñar el papel de coinductor. También existe evidencia genética que apoya la hipótesis de que una molécula relacionada con el metabolismo de lípidos es el inductor del enquistamiento y de la síntesis de ARs. Un bloqueo en la síntesis de poli- β -hidroxibutirato provoca la síntesis de alquilresorcinoles y enquistamiento en condiciones de crecimiento vegetativo (Segura *et al.*, 2003). Se propone que el bloqueo de la síntesis de PHB produce el cambio metabólico que induce el

enquistamiento y suministraría acetyl-CoA y el poder reductor para la síntesis de ARs (Fig. 1.3).

Para identificar al posible coinductor, se realizó una búsqueda *in vitro* mediante ensayos tipo EMSA usando la proteína purificada ArpR sobre la región reguladora de *arsA* y utilizando metabolitos relacionados con el metabolismo de los inductores de enquistamiento y la síntesis de PHB. Se probaron acetyl-CoA, malonil-CoA, β -hidroxibutirato y acetoacetyl-CoA (Fig. 1.3).

La adición de 12 mM de los tres primeros metabolitos no tuvo efecto en los retardos; sin embargo, la presencia de 1 a 12 mM de acetoacetyl-CoA es capaz de aumentar la afinidad de ArpR por los fragmentos conteniendo la región reguladora de *arsA* (Fig. 7.1).

MBP-ArpR (μ M)	0	0.1	8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	8	8
ADN <i>arsA</i> marcado	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ADN <i>rpoS</i> marcado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Acetoacetyl-CoA (mM)	-	-	-	-	1	4	8	12	-	12

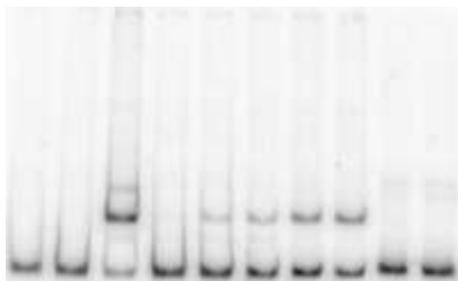


Fig. 7.1. Acetoacetyl-CoA incrementa la afinidad de ArpR por la región promotora de *arsA* *in vitro*. Se realizó un ensayo tipo EMSA con un fragmento de PCR conteniendo la región reguladora de *arsA* (*arsA*-209 /+82). Los fragmentos de ADN se mezclaron e incubaron con concentraciones crecientes de MBP-ArpR (0, 0.1 y 8 μ M) en ausencia (a) o presencia de 1, 4, 8 y 12 mM de acetoacetyl-CoA. Como control negativo, se utilizó un fragmento de la región reguladora de *rpoS*. El ADN libre y los complejos ADN-proteína ArpR se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida al 12%.

Estos ensayos tipo EMSA se realizaron para establecer una concentración de acetoacetyl-CoA para posteriores experimentos. Se realizaron ensayos en ausencia o presencia de 1 mM de acetoacetyl-CoA utilizando de 25 a 3000 nM de proteína ArpR y la región reguladora de *arsA* (-209 al +82 con respecto al sitio de inicio de la transcripción).

La figura 7.2a muestra el ensayo EMSA en ausencia de acetoacetyl-CoA. Es evidente un cambio en el patrón de bandeo del 10% del ADN desde 50 nM de proteína ArpR (Carril 3) y lográndose retardar sólo el 65% a pesar de utilizar concentraciones de hasta 3 μ M de ArpR (Carril 8). Sin embargo, utilizando las mismas concentraciones de ArpR, ahora en presencia de 1 mM de acetoacetyl-CoA (Fig. 7.2b), se observó el retardo del 10% del ADN utilizando 25 nM de ArpR y además, se logró retardar hasta el 95% del ADN utilizando 1 μ M de ArpR. Como control se utilizó la región reguladora de *rpoS*, la cual no fue retardada utilizando 3 μ M de ArpR en ausencia o presencia de acetoacetyl-CoA (1mM; fig. 7.2a y b, carriles 10). Este resultado es consistente con la hipótesis que ArpR estaría

detectando acetoacetil-CoA aumentando su afinidad por la región reguladora de *arsA*.

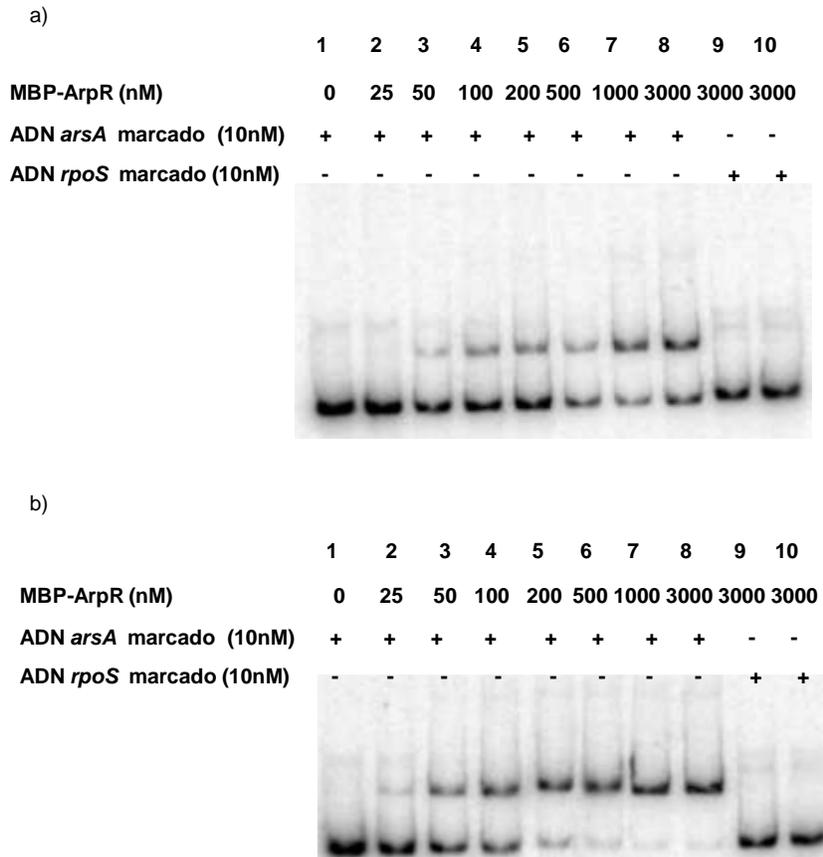


Fig. 7.2. Efecto de la adición de acetoacetil-CoA sobre la unión de ArpR a la región promotora de *arsA in vitro*. Se realizó un ensayo tipo EMSA con un fragmento de PCR conteniendo la región reguladora de *arsA* (*arsA*-209 /+82) y de *rpoS* (control negativo). Los fragmentos de ADN se mezclaron e incubaron con concentraciones de MBP-ArpR: 0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 y 3000 nM en ausencia (a) o presencia de 1mM de acetoacetil-CoA (b). El ADN libre y los complejos ADN-proteína ArpR se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida al 12%.

Para demostrar lo anterior, se calculó la constante de afinidad de ArpR por la región reguladora de *arsA* en presencia y ausencia de acetoacetil-CoA. Se determinó el porcentaje del ADN que se encuentra en forma de complejo con ArpR (ADN retardado) en ambas condiciones (presencia y ausencia de acetoacetil-CoA) a través de densitometría y se graficó en función a la concentración de ArpR; en ambas condiciones ArpR sigue el comportamiento de Michaelis-Menten, por lo que se utilizó dicha ecuación para calcular la constante de afinidad aparente (Kd). Los

valores determinados de K_d en ausencia y presencia de acetoacetyl-coA fueron de 2.3 μM y 116 nM respectivamente. Por lo tanto la adición de acetoacetyl-CoA *in vitro* afectó la afinidad de unión de ArpR por la región reguladora de *arsA*.

Anteriormente se observó que ninguna de las cepas mutantes complementadas con el plásmido pBBR-ArpR/His fue capaz de restaurar la producción de ARs bajo condiciones de crecimiento vegetativo, a pesar de haber demostrado que ArpR está siendo expresado a partir de dicho plásmido bajo estas condiciones (Fig. 6.9). Para examinar si este resultado es debido a la ausencia del coinductor (acetoacetyl-CoA), se realizó un ensayo para determinar si ArpR responde a acetoacetyl-CoA *in vivo*. Se incubaron las cepas silvestre SW136 (WT, pBBR-ArpR/His) y mutantes SW7 (*arpR*⁻, pBBR1MCS-2), SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His), SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His), SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His), SW13 (*rsmZ1*⁻, pBBR-ArpR/His), SW11 (*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His) y SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His) en placas con medio Burk Sacarosa (BS, medio para crecimiento vegetativo) en ausencia o presencia de acetoacetyl-CoA (5 mM) por 36 h y se analizó el fenotipo de producción de ARs tiñendo los lípidos con la solución Fast Blue. En la figura 7.3b se observa que la presencia de acetoacetyl-CoA logra inducir el fenotipo de producción de ARs en condiciones vegetativas en la mayoría de las cepas analizadas, excepto en las cepas SW5 (*gacA*⁻) y SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻), mientras que la expresión de *arpR* en *trans* a partir del plásmido pBBR-ArpR/His y en ausencia de acetoacetyl-CoA no es suficiente para restablecer el fenotipo (Fig. 7.3a).

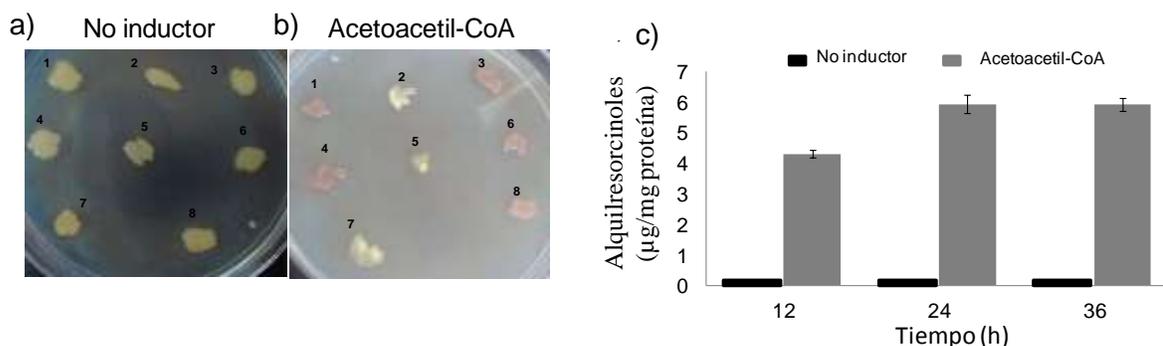


Fig. 7.3: La expresión de *arpR* en *trans* en presencia de acetoacetyl-CoA activa la producción de alquilresorcinoles en condiciones de crecimiento vegetativo. a) Tinción de AR's en ausencia de acetoacetyl-CoA y b) en presencia de acetoacetyl-CoA (5 mM). 1. SW136 (WT, pBBR-ArpR/His), 2. SW7 (*arpR*⁻, pBBR1MCS-2), 3. SW7 (*arpR*⁻, pBBR-ArpR/His), 4. SW9 (*rpoS*⁻, pBBR-ArpR/His), 5. SW5 (*gacA*⁻, pBBR-ArpR/His), 6. SW13 (*rsmZ1*⁻, pBBR-ArpR/His), 7 SW15 (*gacA*⁻/*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His) y 8. SW11 (*rsmA*⁻, pBBR-ArpR/His). c) Cuantificación de la producción de alquilresorcinoles en la cepa SW136 (WT, pBBR-ArpR/His) en ausencia y presencia de acetoacetyl-CoA a las 12, 24 y 36 horas de crecimiento vegetativo. Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar

El resultado anterior se confirmó cuantificando la producción de ARs de la cepa SW136 (WT, pBBR-ArpR/His) a distintos tiempos de crecimiento en condiciones vegetativas en ausencia o presencia de acetoacetil-CoA. Las cuantificaciones concuerdan con lo observado en placa, hay producción de ARs únicamente en presencia de acetoacetil-CoA (Fig. 7.3c).

Adicionalmente, se estudió la expresión de *arsA* y *arpR* bajo estas condiciones. Se utilizaron las cepas YRR30 y YRR50, que llevan las fusiones transcripcionales *parsA-gusA* y *parpR-gusA* en cromosoma respectivamente. Se transformaron con el plásmido pBBR-ArpR/His y se midió actividad de β -glucuronidasa de estas cepas a las 12, 24 y 36 horas de crecimiento vegetativo en ausencia y presencia de acetoacetil-CoA (5 mM). La figura 7.4 muestra los resultados de las mediciones. Como se puede observar, hay grandes diferencias entre las actividades cuantificadas en presencia y ausencia de acetoacetil-CoA. En presencia de acetoacetil-CoA se obtuvo una expresión de *arsA* hasta 25 veces mayor con respecto a la condición sin acetoacetil-CoA (Fig. 7.4a).

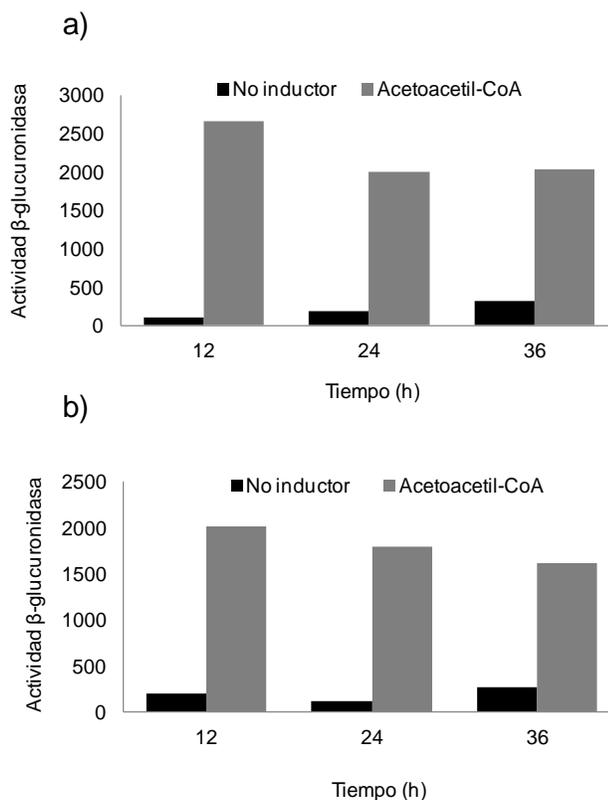


Fig. 7.4: Expresión de *arsA* (a) y *arpR* (b) en medio de crecimiento vegetativo en presencia o ausencia de acetoacetil-CoA y expresando ArpR. La expresión fue medida como actividad de β -glucuronidasa de las cepas YRR30 (con la fusión transcripcional *parsA-gusA* cromosomal y el plásmido pBBR-ArpR) y YRR50 (con la fusión transcripcional *parpR-gusA* + pBBR-ArpR/His). Las mediciones fueron tomadas a las 12, 24 y 36 horas de crecimiento en medio vegetativo en ausencia o presencia de acetoacetil-CoA (5 mM).

Al cuantificar la actividad β -glucuronidasa de la fusión *parpR-gusA*, se observó que de manera similar a la expresión de *arsA*, se obtuvo mayor expresión de *arpR* (10 veces más) en presencia de acetoacetil-CoA con respecto a la condición de ausencia (Fig. 7.4). Con estos análisis se comprobó que ArpR, en presencia del coinductor acetoacetil-CoA, fue capaz de inducir la expresión de los genes *arsA* y *arpR*, así como la síntesis de ARs, aun en condiciones de no inducción a enquistamiento. El hecho que la cepas *gacA*⁻ (SW5) y *gacA*⁻/*rsmA*⁻ (SW15) complementadas con el plásmido pBBR-ArpR/His y en presencia de acetoacetil-CoA no restauraran el fenotipo de producción de ARs en condiciones de crecimiento vegetativo, como ocurrió con la cepas SW7 (*arpR*), SW9 (*rpoS*) o SW13 (*rsmZ1*), confirma que GacA juega un papel regulador de la síntesis de ARs por una vía independiente de ArpR y su coinductor y de RsmZ1.

CAPÍTULO 6.

DISCUSIÓN

La adaptación de *Azotobacter vinelandii* a su medio ambiente involucra la interacción de complejas redes metabólicas y de regulación que le permiten sintetizar componentes del quiste como el alginato, poli- β -hidroxibutirato (PHB), y los alquilresorcinoles (ARs) durante la diferenciación. Entre los sistemas involucrados en percibir y reconocer las señales medioambientales en bacterias se encuentran los sistemas de dos componentes, los cuales transducen la información para activar la transcripción de uno o varios genes, cuyos productos provocan el reajuste metabólico a las condiciones medioambientales. En este sentido pocos son los reguladores globales caracterizados en *A. vinelandii*.

En años anteriores, se ha demostrado que el sistema de dos componentes GacS/GacA se encuentra involucrado en la regulación de la síntesis de alginato y de PHB. Esta regulación es a través del factor sigma RpoS (Castañeda *et al.*, 2000; Castañeda *et al.*, 2001) y del sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZ/RsmY recientemente descubierto en *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011; Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

La regulación ejercida por el regulador de respuesta GacA sobre la transcripción del factor sigma de fase estacionaria RpoS, se ha demostrado en una amplia gama de bacterias como *E. coli* (Segura *et al.*, 2003), *P. fluorescens* (Venturi, 2003) *Legionella pneumophila* (Hammer *et al.*, 2002) y *A. vinelandii* (Castañeda *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de haberse demostrado dicha regulación en las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046 y AEIV, se observó que esta regulación no se conserva en la cepa SW136 en la cual se han realizado algunos estudios de enquistamiento durante los últimos años (Romero, 2008; Segura *et al.*, 2009).

Puesto que la síntesis de ARs depende de la expresión específica de los genes biosintéticos de estos lípidos (el operón *arsABCD*) y ambos procesos están sincronizados con el enquistamiento en *A. vinelandii* (Segura *et al.*, 2009), en este proyecto se trató de demostrar una posible cascada de regulación en la que están involucrados reguladores globales como el factor sigma RpoS, el sistema de dos componentes GacS/GacA, el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZ/RsmY así como también, el regulador transcripcional específico de enquistamiento, ArpR. El análisis de la síntesis de ARs y de la regulación de la expresión de los genes *arsABCD* durante el enquistamiento se realizó en el fondo genético de la cepa *A. vinelandii* SW136 (Segura *et al.*, 2009), ya que es una cepa isogénica de la cepa DJ, cuyo genoma está secuenciado (Setubal *et al.*, 2009). La mutante *arsA* (OV11; Segura *et al.*, 2009) y otras mutantes afectadas en genes involucrados en la biosíntesis de ARs se encuentran en este fondo genético.

Al evaluar el efecto de la inactivación de los genes *gacA*, *rpoS*, *rsmA*, *rsmZ1* y *arpR* sobre la síntesis de ARs y sobre la transcripción de los genes *arsA* y *arpR*, se observó que los reguladores GacA, RpoS y ArpR ejercen un efecto positivo y RsmA un efecto negativo (Romero, 2008).

La inactivación de *arpR* provoca un fenotipo de no producción de ARs y la disminución de la transcripción de *arsA*. La regulación de la transcripción del

operón biosintético *arsABCD* por ArpR es directa, como lo demuestran los ensayos de movilidad electroforética (EMSA, fig. 5.3) y los experimentos de expresión heteróloga en *E. coli* de *arsA* en presencia de ArpR (Fig. 5.1).

Habiendo determinado que ArpR es el regulador transcripcional del operón *arsABCD*, se investigaron las condiciones de expresión del gen *arpR*. La transcripción de *arpR* inicia desde las primeras horas de inducción a enquistamiento (Fig. 5.4) y va incrementando gradualmente, mientras que durante crecimiento vegetativo se observa una muy baja expresión de *arpR* con un ligero incremento durante la fase estacionaria tardía. Esto ocasiona que la síntesis de ARs se lleve a cabo sólo en condiciones de enquistamiento. Como se mencionó en los antecedentes, ArpR es una proteína homóloga a proteínas de la familia LysR. Este tipo de reguladores se han descrito frecuentemente como activadores transcripcionales de su gen blanco, aunque también exhiben una autorregulación negativa, encontrándose generalmente de manera divergente a los genes blanco de regulación (Maddocks y Oyston, 2008). Sin embargo, hay proteínas de este tipo cuyos genes se encuentran localizados en alguna otra parte del cromosoma bacteriano. ArpR es uno de estos casos. Adicionalmente, la regulación que ejerce sobre su propio gen (*arpR*) es positiva, observándose una reducción del nivel de transcrito de *arpR* en la mutante *arpR* (Fig. 5.5). La inducción en *E. coli* de la transcripción de promotor *arpR* por ArpR (Fig. 5.6) y la interacción de ArpR con su propia región promotora (EMSA, fig. 5.7) demuestran esta autorregulación positiva.

Recientemente se reportó que el factor sigma RpoS se requiere para la síntesis de ARs (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011) y la inactivación de *rpoS* afecta la transcripción del operón *arsABCD* y del gen *arpR* (Fig. 2.4, Romero, 2008); sin embargo, la transcripción del operón biosintético se da a partir de un promotor que no presenta similitud con los que son dependientes de RpoS en *A. vinelandii* (Peralta-Gil *et al.*, 2002), lo que sugería que el efecto de la inactivación de *rpoS* sobre la transcripción del operón *arsABCD* se podría dar a través de ArpR.

Al analizar la región intergénica de *arpR*, por la amplificación directa de los sitios de inicio de la transcripción a través de DMTSS (fig. 5.9), se encontraron 3 posibles sitios de inicio de la transcripción denominados P1, P2 y P3. El sitio P1 se encontró a la distancia adecuada de una caja -10 (14-CTATCCT-7) que conserva cinco nucleótidos de la secuencia consenso que reconoce el factor sigma RpoS (Peralta-Gil *et al.*, 2002). La expresión de *arpR* a partir de un promotor independiente de RpoS restaura la síntesis de ARs en la mutante *rpoS* (Fig. 6.6 y 6.7 carriles 4), por lo que se confirma que la regulación que ejerce RpoS sobre *arsA* es a través del control de la transcripción de *arpR*. Dejando como perspectiva el estudio transcripcional de *arpR*, confirmar que los promotores P2 y P3 sean funcionales y si depende o no de algún otro intermediario regulado por RpoS.

En muchas especies de bacterias, GacA activa la transcripción de los genes reguladores *rpoS* y *rsmB* (*rsmZ*; Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2006). En *A. vinelandii*, el sistema de dos componentes GacS/GacA también regula la transcripción de ambos genes en las cepas de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AEIV (Castañeda *et al.*, 2000; Manzo *et al.*, 2011); sin embargo, en la cepa SW136 la regulación de GacA sobre la transcripción de *rpoS* no se conserva (Romero, 2008).

Se determinó que la regulación sobre *rsmZ1* se conserva en *A. vinelandii* SW136. Esto se estableció al cuantificar la expresión de *rsmZ1* usando una fusión transcripcional *prsmZ1-gusA* en los fondos genéticos silvestre y mutante de *gacA* (Figs. 6.1 y 6.2). Se demostró así que en la cepa *A. vinelandii* SW136, GacA activa la transcripción de *rsmZ1*, y confirma la hipótesis de que el efecto del sistema de dos componentes GacS/GacA sobre la producción de ARs es, al menos en parte, a través de la regulación que ejerce sobre la expresión de *rsmZ1*.

Dado que el sistema RsmA-RsmZ1 regula la traducción de los mensajeros blanco, es posible que el efecto del sistema de dos componentes GacS/GacA sobre *arpR* sea a nivel traduccional; en el experimento de “primer extension” de *arpR*, se determinó que en la mutante *gacA*⁻ (SW5) se sigue observando la presencia de transcritos de *arpR* a partir del promotor P1 (dato no mostrado). Los transcritos de *arpR* en esta mutante SW5 (*gacA*⁻), cuantificados a través de qRT-PCR, disminuyeron hasta un 60% (Fig. 2.4b; Romero, 2008). De regular GacA la transcripción de *arpR* se esperaría en esta mutante un efecto más fuerte en su expresión. Esta disminución podría deberse mas bien al efecto negativo de RsmA sobre la estabilidad del mensajero de *arpR*, como sucede para otros blancos de RsmA (Hernández-Eligio *et al.*, 2012), ya que la falta de GacA afecta negativamente la expresión de *rsmZ1*, lo que ocasionaría una mayor actividad de RsmA. La cantidad de mensajeros de *arpR* en la mutante *rsmZ1* también está disminuida un 60% (Fig. 2.4), lo que podría explicarse de manera similar.

En concordancia con esta idea, el análisis de expresión en las fusiones transcripcionales y traduccionales de *arpR* (figura 6.3b) muestra que el efecto de los reguladores GacA, RsmZ1 y RsmA se da a nivel post-transcripcional, mientras que el de RpoS sobre *arpR* es a nivel transcripcional.

Este mismo tipo de análisis comparando la expresión de fusiones transcripcionales y traduccionales pero de *arsA* en las mutantes, permitió determinar que los reguladores GacA, RsmZ1, RsmA, RpoS y ArpR en todos los casos ejercen su regulación sobre el operón biosintético a nivel transcripcional, pues se obtuvo el mismo efecto para ambos tipos de fusiones (Fig. 6.3a). Este resultado es coherente con un modelo en el que estos reguladores afectan la expresión de *arsA* a través del activador ArpR, pues al controlar la expresión de éste, ya sea transcripcional o traduccionalmente, el efecto sobre *arsA* es siempre transcripcional. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de un efecto post-transcripcional adicional de GacA, RsmZ1 y RsmA sobre la expresión de *arsA*. Estos datos son una fuerte evidencia para sugerir que el sistema RsmA/RsmZ1 en *A. vinelandii* tiene como blancos los transcritos de *arpR*. Dicha interacción de RsmA con los transcritos de *arpR*, y posiblemente de *arsA* deberá ser confirmada a través de experimentos *in vitro* tipo EMSA.

Una confirmación adicional de que los reguladores analizados controlan la expresión del operón biosintético mediante la regulación de su activador ArpR, se obtuvo al expresar ArpR *in trans* en las distintas mutantes a partir de un promotor no dependiente de estos reguladores, pues además de la complementación de la mutante *arpR*⁻, se obtuvo la supresión de los fenotipos de las mutantes *rpoS*⁻ y *rsmZ1*⁻. La no supresión del fenotipo de la mutante *gacA*⁻ (Fig. 6.6 y 6.7), a pesar de la supresión del fenotipo de la mutante *rsmZ1*⁻ y de la demostración de que GacA activa la expresión de *rsmZ1* (Fig. 6.1 y 6.2), sugiere que GacA, además de

regular a ArpR a través del regulador RsmZ1, tiene un papel regulador adicional e independiente de estos dos reguladores.

El análisis de una doble mutante *gacA⁻rsmA⁻* (SW15) confirma que GacA regula la expresión de *arpR* a través del sistema RsmA/RsmZ1. Aunque la mutación *rsmA* no suprimió el fenotipo de no producción de ARs de la mutante *gacA* (Fig.6.4), como se esperaba si GacA regulara la producción de estos lípidos únicamente a través del sistema RsmA/RsmZ1, pero sí restableció por completo la expresión de *arpR* (Fig. 6.5). Dado que la inactivación de *rsmA* no restableció la expresión de *arsA*, (lo que explica la no supresión del fenotipo de no producción de ARs), se confirma que el regulador GacA ejerce un efecto adicional sobre la expresión de *arsA* independiente de RsmA/RsmZ1 y de ArpR.

En general, los reguladores transcripcionales del tipo LysR actúan como activadores o, induciendo la transcripción de sus genes blanco una vez que interactúan con moléculas coinductoras (Van Keulen *et al.*, 1998, Maddocks y Oyston, 2008).

Algunos ejemplos de este tipo de reguladores cuyos coinductores ya han sido reportados son: CatM en *Acinetobacter calcoaceticus*, involucrado en el catabolismo de catecol, utiliza como coinductor el intermediario cis, cis-muconato (Ezeika *et al.*, 2006); CysB en *Salmonella entérica* regula la biosíntesis de cisteína y utiliza N-acetilserina como coinductor (Van der Ploeg *et al.*, 1997); en *Streptococcus spp.* el regulador transcripcional que controla la síntesis y transporte de los aminoácidos metionina y cisteína es MetR que necesita homocisteína para la óptima expresión de sus genes blanco (Kovaleva, 2007). El regulador OxyR en *E. coli* detecta los cambios redox de la bacteria y activa la expresión de genes involucrados en la resistencia a estrés oxidativo (Farr y Kogoma, 1991). Incluso hay reguladores que responden a más de un coinductor, como es el caso de BenM homólogo a CatM involucrado en degradar componentes aromáticos. BenM en respuesta a cis, cis-muconato o benzoato activa la transcripción del operón *ben*. Sin embargo, la unión de ambos coinductores causa un incremento sinérgico en la transcripción de sus genes blanco (Bundy *et al.*, 2002)

Normalmente, las moléculas coinductoras son intermediarios o metabolitos relacionados con el proceso celular en el que participan las enzimas codificadas por sus genes blanco (Schell, 1993).

Gama-Castro y colaboradores (2001) reportaron en *A. vinelandii* la inactivación de *aldA*, codifica para una aldehído deshidrogenasa, provocó la inhabilidad de formar quistes maduros en butanol. Adicionalmente, Segura *et al.*, (2003) reportaron que mutantes en los genes de biosíntesis de PHB presentan síntesis de ARs y formación de quistes maduros en condiciones de crecimiento vegetativo. Ambas son evidencias genéticas que sugerían que el coinductor de ArpR podría ser algún producto del catabolismo del butanol utilizado en el medio Burk Butanol (BOH) para inducir enquistamiento o algún intermediario relacionado con el metabolismo de PHB. La incapacidad de mutantes en *aldA* para formar quistes maduros con butanol como inductor, pero no en β -hidroxibutirato, soporta la hipótesis, de que el butanol, no es un inductor de enquistamiento, sino que éste tiene que ser metabolizado a algún metabolito relacionado con β -hidroxibutirato (Castro *et al.*, 2001). En este trabajo se identificó mediante ensayos *in vitro* que el

acetoacetyl-CoA provoca un aumento de la afinidad de ArpR por la región reguladora de *arsA* (Fig. 7.1 y 7.2). Los ensayos de expresión de *arpR* a partir del plásmido pBBR-ArpR/His mostraron el restablecimiento de la síntesis de ARs en las mutantes en *arpR*⁻, *rpoS*⁻ y *rsmZ1*⁻ bajo condiciones de inducción a enquistamiento (Fig. 6.6 y 6.7), pero no en crecimiento vegetativo (Fig. 6.8), a pesar de que ArpR se expresó (Fig. 6.9). Sin embargo, la adición de acetoacetyl-CoA en un cultivo vegetativo induce la síntesis de estos lípidos, lo que permite concluir que la presencia del regulador ArpR y del coinductor acetoacetyl-CoA son suficientes para activar la síntesis de alquilresorcinoles (Fig. 7.3) así como la óptima expresión del operón *arsABCD* y del gen *arpR* (Fig. 7.4), aun bajo condiciones de crecimiento vegetativo.

En el modelo mostrado en la figura 7.5 se incorporan los descubrimientos de este trabajo en contexto con los conocimientos previos sobre la síntesis de alquilresorcinoles. Anteriormente se identificó por “primer extension” arriba de *arsA* un inicio de transcripción, con su correspondiente promotor, sobre el cual los diferentes reguladores controlarían la expresión (Fig. 2.3). Sin embargo, el promotor identificado aparentemente es dependiente de sigma 70. No se encontró secuencia consenso de un promotor dependiente de RpoS, de modo que la regulación por este factor sigma se da a través de la activación de la transcripción de ArpR, cuyo gen sí presenta una caja -10 típica de aquellos promotores dependientes de RpoS (Fig. 5.8). Los experimentos de complementación *in vivo* (Fig. 6.6), ensayos tipo EMSA (Fig. 7.1 y 7.2) y cuantificación de transcritos *arsA* y *arpR* en presencia de acetoacetyl-CoA en condiciones de no inducción a enquistamiento (Fig. 7.4) sustentan fuertemente que ArpR utiliza acetoacetyl-CoA como coinductor para activar la expresión de *arsA*. Sin embargo, la restauración parcial en la síntesis de ARs en las diferentes mutantes expresando *arpR* en presencia de acetoacetyl-CoA podría deberse a la posibilidad que ArpR responda adicionalmente a otro coinductor, como sucede con el regulador BenM. Los experimentos de cuantificación de *arpR* y *arsA* por RT-qPCR (Fig. 2.4) y fusiones transcripcionales (Fig. 6.3) sugieren que GacA estaría regulando la expresión de *arsA* por dos vías, una de ellas mediante el sistema RsmA/RsmZ, siendo su blanco el ARNm de *arpR*, así como también *arsA* (Fig. 6.3) y una segunda vía, a través de algún intermediario aun no identificado, o de manera directa. Con base en los resultados obtenidos se logró plantear un modelo de regulación preliminar para activar la expresión del operón *arsABCD* (Fig. 7.5).

En este trabajo se determinó también que la concentración de acetoacetyl-CoA constituye una señal del estatus metabólico que participa en la inducción a enquistamiento, dado que funge como coinductor con ArpR. Esta señal probablemente tiene relación con la síntesis y degradación de PHB (Fig. 1.3). Estos resultados entonces estarían de acuerdo a lo reportado desde 1966 por Stevenson y Socolofsky, quienes observaron una correlación entre la cantidad de PHB acumulado en etapas previas al enquistamiento con el porcentaje de enquistamiento obtenido, y por Segura *et al.* en el 2003, quienes determinaron que bloques en la síntesis de PHB inducen la síntesis de ARs y el enquistamiento.

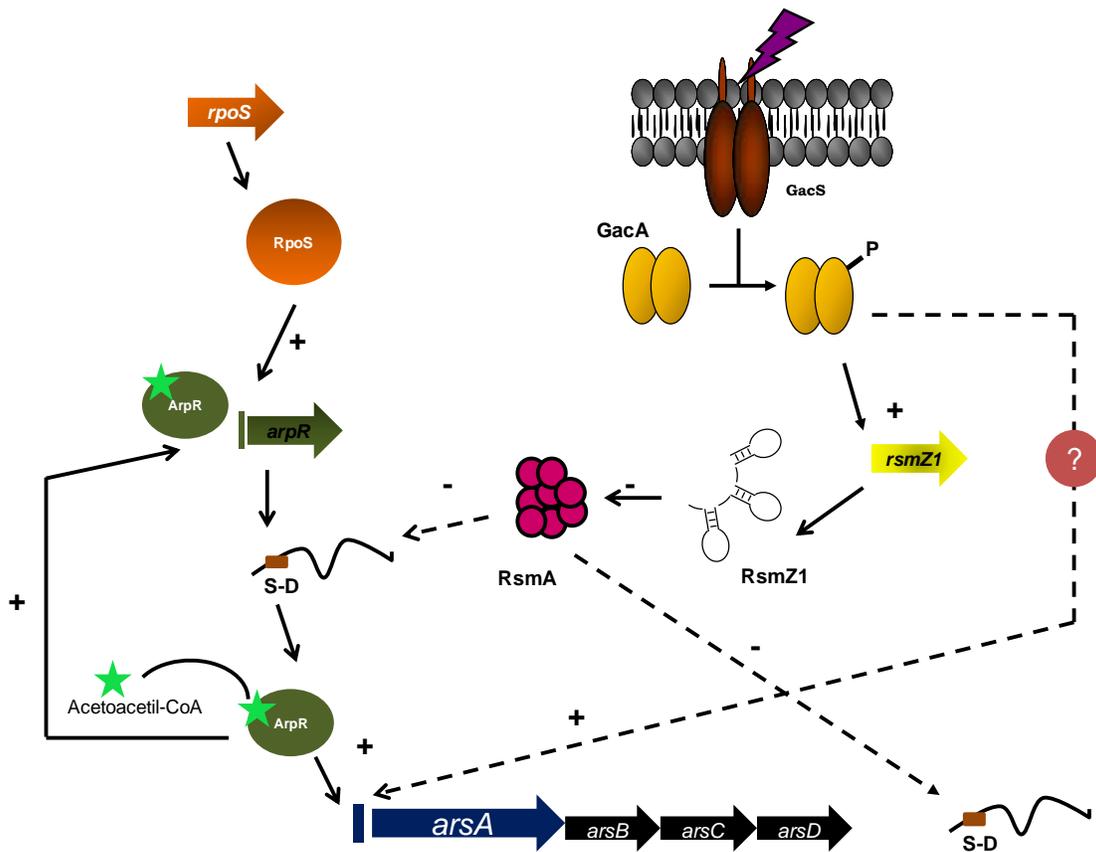


Fig. 7.5: Modelo de regulación de la expresión de los genes *ars*.

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIONES

1. El regulador transcripcional ArpR controla la producción de alquilresorcinoles activando de manera directa la expresión del operón *arsABCD*.
2. La proteína ArpR es capaz de activar la transcripción de su propio gen (*arpR*).
3. El activador ArpR utiliza como coinductor acetoacetyl-CoA, intermediario del metabolismo de PHB y del catabolismo de los inductores de enquistamiento butanol e hidroxibutirato.
4. El sistema de dos componentes GacS/GacA, el sistema de regulación postranscripcional RsmA/RsmZ1 y el factor sigma RpoS regulan la transcripción del operón *arsABCD* de manera indirecta a través del control de la expresión de ArpR.
5. El sistema RsmA/RsmZ1 controla postranscripcionalmente la expresión del gen *arpR*. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que también tenga un efecto directo sobre el operón biosintético *arsABCD*.
6. El sistema GacS/GacA controla la síntesis de alquilresorcinoles a través del sistema RsmA/RsmZ1, al controlar la expresión del ARN RsmZ1.
7. GacA también controla la síntesis de AR's a través del control de la expresión de *arsABCD* por un mecanismo independiente del regulador ArpR y del sistema RsmA/RsmZ1.

CAPÍTULO 8.

PERSPECTIVAS

1. Profundizar en el estudio del mecanismo por el cual ArpR activa la transcripción del operón *arsABCD* y del gen *arpR*, mediante la búsqueda de los posibles sitios de unión para este regulador sobre las regiones promotoras de dichos blancos.
2. Determinar mediante ensayos de retardo y protección, el mecanismo por el cual el sistema RsmA/RsmZ1 regula la traducción del gen *arpR* y posiblemente del gen *arsA*.
3. Determinar el mecanismo por el cual GacA controla la expresión de *arsA* y la síntesis de alquilresorcinoles de manera independiente del sistema RsmA/RsmZ1 y de ArpR, en *A. vinelandii*.
4. Determinar la organización transcripcional del resto de los genes *ars* y definir si su regulación involucra los sistemas y mecanismos de regulación que controlan la expresión del operón *arsABCD*.

CAPÍTULO 9.

BIBLIOGRAFÍA

Allison, M., and Burris, H. 1956. Kinetics of Fixation of Nitrogen by *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **105**: 351-364.

Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, D. S. 2000. Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Thyphimurium Invasion Genes by *csrA*. *Infect. and Immun.* **68**: 6790-6797.

Babitzke, P., and Romeo, T. 2007. CsrB sRNA Family: Sequestration of RNA-Binding Regulatory Proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 156-163.

Baker, C., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., and Babitzke, P. 2002. CsrA Regulates Glycogen Biosynthesis by Preventing Translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**: 1599-1610.

Berleman, E., and Bauer, E. 2004. Characterization of Cyst Cell Formation in the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum centenum*. *Microbiol.* **150**: 383-390.

Bertani, L., Sevo, M., Kojic, M., and Ventura, V. 2003. Role of GacA, LasI, RhII, PpK, PsrA, Vfr and CLpXP in the Regulation of the Stationary-Phase Sigma Factor *rpoS/RpoS* in *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* **180**: 264-271.

Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., and Haas, D. 1999. Global GacA-Steered Control of Cyanide and Exoprotease Production in *Pseudomonas fluorescens* Involves Specific Ribosome Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 14073-14078.

Bundy, M., Campbell A., and Neidle, E. 2002. Synergistic Transcriptional Activation by one Regulatory Protein in Response to Two Metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7693-7698.

Campos, E., Martínez, J., Lloret, L., Moreno, S., Nuñez, C., Espín, G and Soberón, G. 1996. Characterization of the Gene Coding for GDP-Mannose Dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **178**: 1793-1799.

Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín, G. 2000. The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**: 2624-2628.

Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Nuñez, C., and Espín, G. 2001. The Global Regulators GacA y σ^S Form Part of a Cascade That Controls Alginate Production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **183**: 6787-6793.

Corbell, N., and Loper, E. 1995. A Global Regulator of Secondary Metabolite Production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **172**: 6230-6236.

Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Nuñez, C., Castañeda, M., Segura, D., and Espin, G. 2011. Roles of RpoS and PsrA in Cyst Formation and Alkylresorcinols Synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol.* **157**: 1685-1693.

Cui, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A. 2001. Effects of the Two-Component System Comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* on the Production of Global Regulatory *rsmB* RNA, Extracellular Enzymes, and Harpin_{Ecc}. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**: 516-526.

Dubey, A., Baker, C., Romeo, T., and Babitzke, P. 2005. RNA Sequence and Secondary Structure Participate in High-Affinity CsrA–RNA Interaction. *RNA.* **11**: 1579–1587.

Dubuis, C., Keel, C., and Haas, D. 2007. Dialogues of Root Colonizing Biocontrol *Pseudomonads*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **119**: 311–328.

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

Ezezika, C., Collier-Hyams, S., Dale, A., Burk, C., and Neidle, L. 2006. CatM Regulation of the *benABCDE* Operon: Functional Divergence of Two LysR-Type Paralogs in *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1749–1758.

Farr, S. B., and Kogoma, T. 1991. Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561–585.

Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., and Horinouchi, S. 2006. Phenolic Lipid Synthesis by Type III Poliketide Synthases is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 6356-6361.

Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J., Linford, A., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G., and Soberón, G. 2004. Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* Gene Involved in Alginate and Lipopolysaccharide Production. *Fed. Eur. Microbiol. Soc.* **238**: 199–206.

Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., and Romeo, T. 2001. Regulatory Interactions of Csr Components: the RNA Binding Protein CsrA Activates *csrB* Transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 6017–6027.

Haas, D., and Keel, C. 2003. Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* spp. And Relevance for Biological Control of Plant Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153.

- Hammer, B., Tateda, E., and Swanson, M.** 2002. A Two-Component Regulator Induces the Transmission Phenotype of Stationary-Phase *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **44**: 107–118.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Heeb, S., and Haas, D.** 2001. Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**: 1351-1363.
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, F., and Espin, G.** 2012. RsmA Post-Transcriptionally Controls *phbR* Expression and Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol.* **158**: 1953-1963.
- Hernandez-Lucas, I., and Calva, E.** 2012. The Coming of Age of the LeuO Regulator. *Mol. Microbiol.* **85**: 1026-1028.
- Hitchins, V., and Sadoff, H.** 1970. Morphogenesis of Cysts in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **104**: 492-498.
- Hitchins, V., and Sadoff, H.** 1973. Sequential Metabolic Events During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **113**: 1373-1279.
- Jarman, T., Deavin, L., Slocombe, S., and Righelato, C** 1978. Investigation of the Effect of Environmental Conditions on the Rate of Exopolysaccharide Synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 59-64.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., and Haas, D.** 2006. Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 6026-6033.
- Kitten, T., Kinscherf, J., Mcevoy, L., and Willis, D.** 1998. A Newly Identified Regulator is Required for Virulence and Toxin Production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **28**: 917-929.
- Kovach, E., Elzer, H., Hill, S., Robertson, T., Farris, A., Roop, M., and Peterson, M.** 1995 Four New Derivatives of the Broad-Host-Range Cloning Vector pBBR1MCS, Carrying Different Antibiotic-Resistance Cassettes. *Gene.* **166**: 175-176.
- Kovaleva, G. Y., and Gelfand, M. S.** 2007. Transcriptional Regulation of the Methionine and Cysteine Transport and Metabolism in *Streptococci*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **276**: 207–215.

Kozubek, A., and Tyman, J. 1999. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-Isoprenoid Phenolic Amphiles and Their Biological Activity. *Chem. Rev.* **99**: 1-25.

Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F., and Haas D. 2008. Gac/Rsm Signal Transduction Pathway of α -Proteobacteria: from RNA Recognition to Regulation of Social Behavior. *Mol. Microbiol.* **67**: 241-253.

Lavilla, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., D efago, G., and Haas, D. 1992. Global Control in *Pseudomonas fluorescens* Mediating Antibiotic Synthesis and Suppression of Black Root of Tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 1562-1566.

Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-C ote, E., Nasser, W., and van Gijsegem, F. 2008. The GacA Global Regulator is Required for the Appropriate Expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Pathogenicity Genes During Plant Infection. *Environ. Microbiol.* **10**: 545-559.

Lenz, D., Miller, M., Zhu, J., Kulkarni, R., and Bassler, B. 2005. CsrA and Three Redundant Rsmall RNAs Regulate Quorum Sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **58**: 1186–1202.

Lin, P., and Sadoff, A. 1968. Encystment and Polymer Production by *A. vinelandii* in the Presence of β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **95**: 2336-2343.

Lin, P., and Sadoff, A. 1969. Preparation and Ultrastructure of the Outer Coats of *Azotobacter vinelandii* Cysts. *J. Bacteriol.* **98**: 1335-1341.

Lin, P., and Sadoff, A. 1978. Ultrastructure and Physiological Changes Occurring upon Germination and Outgrowth of *Azotobacter vinelandii* Cysts. *J. Bacteriol.* **135**: 641-646.

Liu, M., Yang, H., and Romeo, T. 1995. The Product of the Pleiotropic *Escherichia coli* Gene *csrA* Modulates Glycogen Biosynthesis Via Effects on mRNA Stability. *J. Bacteriol.* **177**: 2663–2672.

Liu, M., and Romeo, T. 1997. The Global Regulator CsrA of *Escherichia coli* is a Specific mRNA-Binding Protein. *J. Bacteriol.* **179**: 4639–4642.

Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L., and Randall, J. 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Maddocks, E., and Oyston, C. 2008 Structure and Function of the LysR-Type Transcriptional Regulator (LTTR) Family Proteins. *Microbiol.* **154**: 3609–3623.

Manzo, J., Cocotl-Yanez, M., Tzontecomani, T., Martinez, M., Bustillos, R., Velasquez, C., Goiz, Y., Solis, Y., Lopez, L., Fuentes, E., Nunez, C., Segura, D., Espin, G., and Castaneda, M. 2011. Post-Transcriptional Regulation of the

Alginate Boissynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 147-159

Martinez-Laguna, Y., Calva, E., and Puente, J.L. 1999. Autoactivation and Environmental Regulation of *bfpT* Expression, the Gene Coding for the Transcriptional Activator of *bfpA* in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**: 153–166.

Martinez, M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, C., Espín, G., Soberon, G., and Deretic, V. 1996. Characterization of the Genes Coding for the Putative Sigma Factor AlgU and its Regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their Roles in Alginate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**:1800-1808.

Mendoza-Vargas, A., Olvera, L., Olvera, M., Grande, G., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Jimenez-Jacinto, V., Salgado, H., Juárez, K., Contreras-Moreira, B., Huerta, A., Collado-Vides, J., and Morett., E. 2009. Genome-Wide Identification of Transcription Start Sites, Promoters and Transcription Factor Binding Sites in *E. coli*. *Plos. One.* **7526**: 1-19

Miyanaga, A., Funa, N., Awakawa, T., and Horinouchi, S. 2008. Direct Transfer of Starter Substrates From Type I Fatty Acid Synthase to Type III Polyketide Synthases in Phenolic Lipid Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 871-876.

Navarro-Llorens, J. M., Tormo, A., and Martínez-García, E. 2010. Stationary Phase in Gram-Negative Bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* **34**: 476-495.

Núñez, C., Moreno, S., Cardenas, L., Soberon, G., and Espín, G. 2000. Inactivation of the *ampDE* Operon Increases Transcription of *algD* and Affects Morphology and Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**: 4829-4835.

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

Ovadis, M., Liu, X., Ismailov, Z., Chet, I., and Chernin, L. 2004. The Global Regulator Genes from Bstrain *Serratia plymuthica* IC1270: Cloning, Sequencing, and Functional Studies. *J. Bacteriol.* **186**: 4986-4993.

Pareja, E., Pareja-Tobes, P., Manrique, M., Pareja-Tobes, E., Bonal, J., and Tobes, R. 2006. ExtraTrain: a Database of Extragenic Regions and Transcriptional Information in Prokaryotic Organisms. *BMC. Microbiol.* **6**: 29

Parker, L., and Socolofsky, M. 1966. Central Body of the *Azotobacter* Cyst. *J. Bacteriol.* **91**: 297-303.

- Parkins, M., Ceri, H., and Storey, D.** 2001, *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a Factor in Multihost Virulence, is Also Essential for Biofilm Formation. *Mol. Microbiol.* **40**: 1215–1226.
- Peralta, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín, L., and Espín, G.** 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. *J. Bacteriol.* **184**: 5672-5677.
- Reusch, R. N., and Sadoff, H. L.** 1979. 5-*n*-Alkylresorcinols from Encysting *Azotobacter vinelandii*: Isolation and Characterization. *J. Bacteriol.* **139**: 448-453.
- Reusch, R. N., and Sadoff, H. L.** 1981. Lipid Metabolism During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **145**: 889-895.
- Reush, R. N., and Sadoff, H. L.** 1983. Novel Lipid Components of the *Azotobacter vinelandii* Cyst Membrane. *Nat.* **302**: 268-270.
- Romeo, T.** 1998. Global Regulation by the Small RNA-Binding Protein CsrA and the Non-Coding RNA Molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**: 1321-1330.
- Romero, Y.** 2006. Caracterización de Genes que Codifican para Posibles Chalcona Sintasa y Glicosil Transferasa y su Papel en la Síntesis de Lípidos Fenólicos en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1-99.
- Romero, Y.** 2008. Regulación de la Expresión Genética de *arsA* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-85.
- Sadasivan, L., and Neyra, C.** 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and Cyst Formation. *J. Bacteriol.* **163**: 716-723.
- Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* **39**: 516-539.
- Sadoff, H. L.** 2001. *Azotobacter* Cysts. *Ency. Life Sciences.* 1-5.
- Schell, M.** 1993. Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Hardwood, C. S., and Greenberg, E. P.** 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS Regulon and its Relationship to Quorum Sensing. *Mol. Microbiol.* **51**: 973-985

Segura, D., Cruz, T., and Espín, G. 2003. Encystment and Alkylresorcinol Production by *Azotobacter vinelandii* Strains Impaired in Poly- β -Hydroxybutyrate Synthesis. *Arch. Microbiol.* **179**: 437-443.

Segura, D., Guzmán, J., and Espín, G. 2003. *Azotobacter vinelandii* Mutants that Overproduce Poly- β -Hydroxybutyrate or Alginate. *Arch. Microbiol.* **63**: 159-163.

Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M., and Espín, G. 2009. Isolation and Characterization of *Azotobacter vinelandii* Mutants Impaired in Alkylresorcinol Synthesis: Alkylresorcinols are not Essential for Cysts Desiccation Resistance. *J. Bacteriol.* **191**: 3142-3148.

Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B., Ertesvåg, H., Espín, G., Rubio, L., 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, J. T., 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. The Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized to Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *J. Bacteriol.* **191**: 4534-4545.

Socolofsky, M. D., and Wyss, O. 1962. Resistance of the *Azotobacter vinelandii* Cyst. *J. Bacteriol.* **84**: 119-124.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., and Painter, P. 1996. Eubacterias Aerobicas Gram-Negativas. En: Microbiología. *Editorial Reverte. España.* 443-447

Stevenson, L. H., and Socolofsky, M. D. 1966. Cyst Formation and Polyhydroxybutyric Acid Accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91**: 304-310.

Su, C. H., Reusch, R. N., and Sadoff, H. L. 1981. Isolation and Characterization of Several Unique Lipids from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **147**: 80-90.

Su, C. H., and Sadoff, H. L. 1981. Unique Lipids in *Azotobacter vinelandii* Cysts: Synthesis Distribution, and Fate During Germination. *J. Bacteriol.* **147**: 91-96.

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

Tluscik, F., Kozubek, A., and Mejbaum, W. 1980. Alkylresorcinols in Rye (*Secale cereale* L.) Grains. VI Colorimetric Micromethod for the Determination of Alkylresorcinols with the Use of Diazonium Salt, Fast Blue B. *Act. Soc. Bot. Pol.* **50**: 645-651.

Tomenius, H., Pernestig, A.K., Jonas, K., Georgellis, D., Mollby, R., Normark, S., and Melefors, O. 2006. The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System is a Virulence Determinant in the Urinary Tract. *BMC. Microbiol.* **10**: 6-27.

Tudor, J., and Conti, F. 1977. Characterization of Bdello cysts of *Bdellovibrio* sp. *J. Bacteriol.* **131**: 314-322.

Valverde, C., Lindell, M., Wagner, H., and Haas, D. 2004. A Repeated GGA Motif is Critical for the Activity and Stability of the Riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **279**: 25066-25074.

Van der Ploeg, J., Iwanicka-Nowicka, R., Kertesz, M., Leisinger, T., and Hryniewicz, M. 1997. Involvement of CysB and Cbl Regulatory Proteins in Expression of the *tauABCD* Operon and Other Sulfate Starvation-Inducible Genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 7671–7678.

Van Keulen, G., Girbal, L., Van den Bergh, E., Dijkhuizen, L. and Meijer, W. 1998. The LysR-type Transcriptional Regulator CbbR Controlling Autotrophic CO₂ Fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH Sensor. *J. Bacteriol.* **180**: 1411–1417.

Vela, G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in Dry Soil. *Appl. Microbiol.* **28**: 77-79.

Venturi, V. 2003. Control of *rpoS* Transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: Why so Different?. *Mol. Microbiol.* **49**: 1-9.

Vite, O. 2003. Identificación y Caracterización de Genes Involucrados en la Síntesis de Lípidos Alquilresorcinoles en *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.* 1-52.

Wei, B., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, j., PruB, B., Babitzke, P., and Romeo, T. 2001. Positive Regulation of Motility and *flhDC* Expression by the RNA-Binding Protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**: 245-256.

Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. 2003. A Novel sRNA Component of the Carbon Storage Regulatory System of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**: 657–670.

Whistler, A., Corbell, A., Sarniguet, A., Ream, W., and Loper, E. 1998. The Two-Component Regulators GacS and GacA Influence accumulation of the Stationary-Phase Sigma Factor sigma S and the Stress Response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **180**: 6635-6641.

Winogradski, S. 1983. Sur la Morphologie et l'Écologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur. Paris.* **60**: 351-400.

Wyss, O., Smith, D. D., Pope, L. M., and Olson, K. E. 1969. Endogenous Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **100**: 475–479.

CAPÍTULO 10.

APÉNDICE

15. 1 Cuantificación de proteína por método de Lowry.

Solución reactiva, preparación de 100 ml.

Reactivo	Stock	Proporciones
Na_2CO_3^*	2%	98
tartrato de Na y K	2%	1
CuSO_4	1%	1

*La solución stock fue preparada en NaOH al 0.1 N

15.2 Determinación de actividad β -glucuronidasa.

Solución amortiguadora Z 50 ml.

Reactivo	Stock	ml del stock*
K_2HPO_4	0.5 M	3
KH_2PO_4	0.5 M	2
EDTA	0.25 M	0.2
DTT	0.25 M	1

*Aforar con H_2O a 50 ml.

15.3 Cuantificación de alquilresorcinoles.

Solución azul rápido B-Propanol 100 ml.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Ácido acético	1 ml	5%
Azul rápido B	0.016 g	0.08%
H ₂ O	Aforar a 20 ml	
Propanol*	80 ml	

* la cantidad de propanol es simple 4 partes con respecto a la solución ácido-azul rápido

Solución reveladora de placas 50 ml.

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	2.5 ml
Azul rápido B	0.25 g
H ₂ O	47.5 ml

15.4 Electroforesis de proteína en gel de acrilamida al 12%.

Buffer tratamiento 2X para 10 ml.

Reactivo	Volumen
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
2-mercaptoetanol	1 ml
H ₂ O	a 10 ml

Solución amortiguadora Tank 1X para 1 litro.

Reactivo	Cantidad
Tris Base	12 g
Glicina	57.6 g
SDS 10%	40 ml
H ₂ O	Aforar 1L

Mezcla para gel de acrilamida al 12%.

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida al 30% y Bis acrilamida 2.7%	3.99 ml	1.99 ml
Tris-Cl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8	-	1.25 ml
SDS 10%	0.10 ml	0.050 ml
H ₂ O	3.34 ml	1.67 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.050 ml	0.025 ml
TEMED	0.005 ml	0.002 ml
Volumen final	10 ml	5 ml

Solución para teñir el gel de acrilamida.

Reactivo	Volumen
Azul de coomassie R-250 al 1%	31.25 ml
Metanol	125 ml
Ácido acético	25 ml
H ₂ O	Aforar 250 ml

Solución para desteñir gel de acrilamida.

Reactivo	Volumen
Metanol	250 ml
Ácido acético	50 ml
H ₂ O	Aforar 500 ml

Buffer de carga.

Reactivo	Volumen
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
2-mercaptoetanol	1.0 ml
H ₂ O	Aforar a 10.0 ml

15.5 Western Blot.

Buffer de Transferencia para 1 litro.

Reactivo	Cantidad
Tris	3.025 g
Glicina	14.35 g
Metanol	200 ml
H ₂ O	aforar 1 L

Buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

Reactivo	Cantidad
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ PO ₄	7.2 g
KH ₂ PO ₄	1.2 g
H ₂ O	1 L

Se ajusta el pH a 7.4 con HCl.
Se esteriliza en autoclave.