



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Estudio de la función del dominio putativo de degradación de c-di-GMP  
de la proteína MucG involucrada en la síntesis de alginato en  
*Azotobacter vinelandii***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

CARLOS LEONEL AHUMADA MANUEL

Tutor principal:

Dra. CINTHIA E. NÚÑEZ LÓPEZ

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Clarita Olvera Carranza  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Carlos F. Peña Malacara  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca Morelos, Octubre 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Cinthia E. Núñez López.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de becario 298169, así como apoyo de proyectos PAPIIT-UNAM (IN208514) y de CONACYT-CB (240095) para la realización de este trabajo de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

**El agradecimiento más grande es para mi madre, Gloria Manuel Velázquez, quien me enseñó a leer mientras nos recostábamos en un catre en sus momentos de descanso. Desde entonces mi inspiró a estudiar y le estoy eternamente agradecido por todo el apoyo que he recibido de su parte hasta el día de hoy. Gracias por ser mi gran amiga, te quiero mucho mamá.**

**A mis hermanos por tanta confianza y apoyo durante mis estudios, gracias por recorrer este camino junto conmigo.**

**A la Dra. Cinthia Núñez por ser mi tutora y amiga, gracias por compartir su conocimiento y experiencia para la realización de esta tesis.**

**A la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. Daniel Segura por sus discusiones y aportaciones durante los seminarios del grupo.**

**A Maritere Uriostegui por estar conmigo en las buenas y en las malas, gracias por ayudarme en cualquier tarea por mínima que fuera.**

**A Doña Josefina Guzmán Aparicio por soportarme en mis primeros días en el laboratorio y enseñarme a trabajar siguiendo las reglas al pie de la letra, sin duda alguna es una de las mejores personas que he conocido en mi vida. Somos buenos amigos!!**

**A Quiroz Roche Elva por recibirme con tanta alegría en el grupo de la Dra. Cinthia Núñez. Elva siempre me ayudó con cualquier inconveniente y me seguirá ayudando!! Elva es casi tan buena como July, pero yo creo lo contrario.**

**Gracias a todos los miembros del laboratorio por brindarme su amistad y soportar tantos gritos. Julieta (Selma), Leydi (Paty), Dr. Miguel Angel (Dr. Vences), Dra. Sangita (Sanguita), Elva (Quiroz-Rocha 2015), Chantal (Chanty), Libertad (Adayita-Liber), Claudia (Velazquez), Adriana (Adri), Dr. Cocotl (Dr. Coctel), Adán Trejo (Super pale), M. en C Josefina Gúzman (Doña Jose), Biólogo Soledad Moreno (Doña Sol), Dr. Luis Felipe (Venga Lucho), Maria Luisa Tabche, José Luis Gama, Doña Francis, José Luis Rodriguez (el puma, no. El Pariente)**

**Gracias a todas y cada una de las personas que han contribuido en mi formación académica y personal, es una lista larga pero todos mis amigos me han enseñado algo. GRACIAS!**



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampicilina
BS	Burk-sacarosa
°C	Grado centígrado
CDD	Conserved domain database
c-di-GMP	Bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico
DGC	Diguanilato ciclasa
DO	Densidad óptica
Ex	Exina
g	Gramo
G	Guluronato
GDP	Guanosín difosfato
Gm	gentamicina
GMP	Guanosin monofosfato
GTP	Guanosin trifosfato
h	Horas
In	Intina
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
L	Litro
LB	Luria Bertani
M	Manuronato
min	Minuto
ml	Mililitro
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mM	Milimolar
µm	Micrómetro
Nal	Nalidíxico
NCBI	National center of biotechnology information
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
PEB	Protein extraction buffer
PDE	Fosfodiesterasa
pH	Potencial de hidrógeno
PHB	Polihidroxiбутirato
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PMI	Fosfomanosa isomerasa
PMP	Peso molecular promedio
rpm	Revoluciones por minuto
Sm	Streptomycin

Sp	Espectinomicina
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 <i>A. vinelandii</i> .....	4
2.2 Alginato.....	4
2.3 Biosíntesis del alginato.....	5
2.4 Factores que afectan el PM del alginato.....	7
2.4.1 Oxígeno.....	7
2.4.2 Las alginato liasas.....	9
2.4.2.1 Roles biológicos de las Alginato liasas.....	11
2.5 c-di-GMP.....	11
2.5.1 Dominio PAS: Un dominio sensor que regula la actividad enzimática de DGC y PDE.....	13
2.5.2 Proteínas involucradas en la síntesis y degradación de c-di-GMP en <i>A. vinelandii</i> .....	16
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 General.....	22
4.2 Particulares.....	22
5. MATERIALES Y METODOS.....	23
5.1 Microorganismos.....	23
5.2 Condiciones de cultivo.....	25
5.3 Preinóculos.....	26
5.4 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .....	27
5.5 Transformación de <i>A. vinelandii</i> .....	27
5.6 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	28
5.7 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	28
5.8 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .....	28
5.9 Electroporación de <i>E. coli</i> .....	28
5.10 Conjugación de cepas AEIV y <i>E. coli</i> S17-1.....	29
5.11 Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	29
5.12 Reacción de ligación.....	29
5.13 Reacción de PCR.....	30



5.14 Cuantificación específica de alginato por el método del carbazol .....	31
5.15 Determinación del PM del alginato .....	32
5.16 Proteoma de las cepas AEIV y GG9 .....	32
5.17 Determinación de la actividad alginato liasa .....	33
5.18 Determinación del porcentaje de acetilación del alginato .....	34
5.19 Determinación de proteínas por el método de Bradford .....	34
5.20 Determinación de proteínas por el método de Lowry .....	35
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
6.1. Análisis del dominio PDE de la proteína MucG .....	36
6.2 Generación de la mutante <i>mucG<sup>AAA</sup></i> a partir del gen silvestre <i>mucG<sup>EAL</sup></i> .....	36
6.3 Generación de la mutante CLAM02 <i>mucG<sup>ΔEAL</sup></i> .....	46
6.4 Caracterización de las mutantes CLAM01 ( <i>mucG<sup>AAA</sup></i> ) y CLAM02 ( <i>mucG<sup>ΔEAL</sup></i> ) ...	51
6.5 Determinación del PM en cultivos con diferentes VTO .....	56
6.6 Determinación del grado de acetilación de los alginatos producidos por la mutante <i>mucG</i> GG9. ....	58
6.7 Determinación de la actividad liasa intracelular en la mutante <i>mucG::Tn5</i> GG9. ....	60
6.8 Proteoma de las cepas AEIV y GG9 ( <i>mucG::Tn5</i> ) .....	61
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>10. APÉNDICE .....</b>	<b>73</b>
10.1 Proteoma de las cepas JG501 y AEIV .....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Quiste de <i>A. vinelandii</i> . .....	5
Figura 2. Estructura del alginato. ....	5
Figura 3. Ruta de biosíntesis del precursor del alginato, ácido GDP-Manurónico.....	6
Figura 4. Representación esquemática del sistema de excreción del alginato. ....	8
Figura 5. Reacción de $\beta$ -eliminación (izquierda) y epimerización (derecha) de AlgE7 .....	10
Figura 6. Residuos conservados del sitio activo de los dominios de fosfodiesterasa. ....	13
Figura 7. Estructura química del $\gamma$ -di-GMP.....	14
Figura 8. Estructura tridimensional del dominio PAS.....	15
Figura 9. Representación esquemática de mecanismo de regulación de FixL.....	17
Figura 10. Distribución de pesos moleculares de los alginatos producidos por distintas cepas de <i>A. vinelandii</i> . ....	20
Figura 11. Representación esquemática de los dominios de la proteína MucG.....	20
Figura 12. Alineamiento de la secuencia consenso obtenida de la página web Conserved Domain Database, fosfodiesterasa DosC y la proteína MucG. ....	36
Figura 13. Secuencia nucleotídica del gen <i>mucG</i> . ....	37
Figura 14. Esquema del plásmido pJET- <i>mucG</i> con los sitios de corte por las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo.....	38
Figura 15. Electroforesis de DNA en gel de agarosa del plásmido pJET- <i>mucG</i> digerido con <i>Xba</i> I y <i>Pvu</i> I.....	38
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones parciales <i>Pvu</i> I del plásmido pLA01 39	
Figura 17. Electroforesis el gel de agarosa del fragmento parcialmente digerido con <i>Pvu</i> I derivado del pJET- <i>mucG</i> y digerido con <i>Xba</i> I.....	39
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos extraídos de 3 candidatas pLA01.....	40
Figura 19. Mapa del plásmido pLA01. ....	40
Figura 20. Mapa del plásmido pLA02.. ....	41

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del fragmento río abajo de <i>mucG</i> , utilizando los oligonucleótidos ispA1 – R y xseB1AhBm – F.....	42
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos derivados de 5 candidatas en la búsqueda del plásmido pLA03. ....	43
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos de 6 candidatas pLA03Sp digeridos con la enzima <i>PvuI</i> . ....	43
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos de 2 candidatas pLA0201 digeridos con la enzima <i>SphI</i> .....	43
Figura 25. Mapa del plásmido pLA0201.....	44
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de colonias de las candidatas CLAM01 ( <i>mucG<sup>AAA</sup></i> ) empleando los oligos mucG5? – F y mucG1 – R .....	45
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de colonia de las candidatas mucG <sup>EAL</sup> -Sp, CLAM01 y de la cepa silvestre AEIV.....	45
Figura 28. Modelamiento del dominio de diguanilato ciclasa de la proteína MucG con I-TASSER. ....	46
Figura 29. Alineamiento elaborado con I-TASSER.....	47
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de plásmido de 10 candidatas pLA0200 digeridos con la enzima de restricción <i>SacII</i> . ....	47
Figura 31. Mapa del plásmido pLA0200.....	48
Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para generar el plásmido pLA0202.....	49
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos de candidatas pLA0202 digeridos con la enzima <i>BglII</i> .....	49
Figura 34. Mapa del plásmido pLA0202.....	49
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos de 5 candidatas pLA0203 digeridos con la enzima <i>PvuI</i> .....	50
Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de colonias de 4 candidatas MucG <sup>EAL</sup> .....	51
Figura 37. Cuantificación de alginato en medio BS sólido a las 48 h de cultivo. ....	52
Figura 38. Cuantificación de alginato en medio BS líquido a las 48 h de cultivo.....	52

Figura 39. Distribución de pesos moleculares de los alginatos producidos por las cepas CLAM01, CLAM02, CLAM03, GG9 y AEIV..... 53

Figura 40. Pesos moleculares promedios de los alginatos producidos por las cepas AEIV y GG9 en diferentes volúmenes de llenado..... 57

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las liasas AlyA de <i>A. vinelandii</i> .....	11
Tabla 2. Diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas de <i>A. vinelandii</i> .....	18
Tabla 3. Producción específica de alginato por cepas de <i>A. vinelandii</i> .....	19
Tabla 4. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados .....	23
Tabla 5. Composición del medio de cultivo de <i>A. vinelandii</i> .....	26
Tabla 6. Composición del medio LB de <i>E. coli</i> . .....	26
Tabla 7. PMP de los alginatos producidos por las cepas AEIV, GG9, CLAM01, CLAM02 y CLAM03.....	54
Tabla 8. Determinación de g de acetilos por g de alginato .....	59
Tabla 9. Expresión relativa de proteínas de <i>A. vinelandii</i> en la mutante GG9 con respecto a la parental AEIV.....	61
Tabla 10. Expresión relativa de proteínas de <i>A. vinelandii</i> en la mutante JG501 con respecto a la parental AEIV. ....	73

## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria del suelo que produce el exopolisacárido, alginato durante su crecimiento vegetativo y en condiciones de enquistamiento. El alginato es un polisacárido lineal compuesto de residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y su epímero en C-5 el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidos por enlaces 1,4, además, se encuentra acetilado en las posiciones O-2/O-3 del manuronato. El proceso de biosíntesis de alginato se puede dividir en 4 etapas: i) la generación del monómero GDP-ácido manurónico; ii) polimerización y transferencia a través de la membrana citoplásmica; iii) transferencia del polímero a través del periplasma y modificación; iv) exportación a través de la membrana externa. Alg44 es una proteína de membrana interna que junto con Alg8 forman el complejo que polimeriza los residuos de ácido manurónico y da lugar al alginato. Alg44 tiene un dominio que une al bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP), un segundo mensajero que se ha descrito como esencial para la biosíntesis de alginato en *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, se ha descrito que el peso molecular del alginato es determinado por la actividad del complejo Alg8-Alg44 y por la actividad de las alginato liasas que degradan el polímero. El peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* es fuertemente influenciado por las diferentes condiciones de aireación o la tensión de oxígeno disuelto (TOD). La cepa mutante GG9 (*mucG::miniTn5*) es una cepa sobreproductora de alginato y de alto peso molecular con respecto a la cepa parental, AEIV. El gen afectado en esta mutante (Avin07910), llamado *mucG*, codifica para una proteína con dominios putativos para la síntesis (GGDEF) y degradación (EAL) de c-di-GMP; también posee un dominio PAS, el cual detecta los niveles de oxígeno. Por lo anterior, planteamos la hipótesis de que la proteína MucG afecta de manera negativa la actividad del complejo Alg8-Alg44 por medio de la reducción de las pozas de c-di-GMP a través de su dominio de fosfodiesterasa (EAL), el cual degrada a este segundo mensajero. Además, esta actividad estaría siendo controlada por el dominio PAS de MucG que puede detectar los niveles de oxígeno. En el presente trabajo se construyeron las mutantes que expresan a MucG sin actividad fosfodiesterasa ( $MucG^{AAA}$ ), mediante la sustitución por alaninas de residuos importantes para la actividad catalítica ( $EAL \rightarrow AAA$ ) y una segunda mutante donde se eliminó por completo el dominio de degradación de c-di-GMP (EAL) de MucG ( $MucG^{\Delta EAL}$ ). Estas mutantes mostraron el mismo fenotipo de la mutante GG9, con respecto a la producción específica de alginato y su PM, indicando que el dominio de fosfodiesterasa de MucG afecta negativamente la producción de alginato y su PM. Así mismo se investigó la posible funcionalidad del dominio PAS de MucG con respecto a la detección de diferentes niveles de oxígeno y modulando así la actividad del dominio de fosfodiesterasa de MucG. Para esto, se determinó el PM del alginato producido por las cepas AEIV y GG9 (*mucG::miniTn5*) en diferentes condiciones de oxígeno. Se encontró que el PM del alginato producido por la cepa AEIV respondió a los niveles de oxígeno, aumentando el peso molecular de 600 kDa hasta 970 kDa cuando se disminuyó la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) al aumentar el volumen de llenado del matraz Erlenmeyer. Por otro lado, el PM del alginato obtenido de la mutante GG9 fue superior a los 1100 kDa independientemente de la VTO utilizada. Estos resultados indican que MucG contribuye al control del PM del alginato producido en respuesta al oxígeno, posiblemente por medio de su dominio PAS. Por último, un análisis proteómico indicó que MucG afecta la expresión de genes involucrados en otros procesos celulares como motilidad, competencia y división celular.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria de vida libre que produce dos polímeros, el alginato y el PHB. Estos polímeros participan en un proceso de diferenciación que sufre esta bacteria para la formación de células resistentes a la desecación, llamadas quistes (Segura *et. al.*, 2014).

El alginato es un polisacárido lineal compuesto de porciones variables de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y su epímero en C-5 el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidos por medio de sus carbonos anoméricos (C-1) y (C-4) a través de un enlace  $\beta$ -1,4. El alginato bacteriano se encuentra acetilado en las posiciones O-2/O-3 del manuronato además presenta una gran diversidad de pesos moleculares (Hay *et. al.*, 2013). El peso molecular (PM), el contenido y la distribución de los residuos M y G, así como el grado de acetilación del alginato determinan sus propiedades fisicoquímicas. Un mayor PM resulta en un incremento en la viscosidad, mientras que un mayor contenido de bloques G favorece la formación de geles rígidos en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Estas distintas familias de polímeros juegan un papel importante en la estructuración de los quistes resistentes a la desecación que forma *A. vinelandii* (Segura *et. al.*, 2014).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas el alginato posee aplicación industrial importante. En el área biomédica los geles de alginato se emplean para la liberación controlada de fármacos de bajo PM o como biomaterial para la microencapsulación de células en ingeniería de tejidos (Hernández *et. al.*, 2010). Actualmente el alginato se extrae de algas marinas cafés. Sin embargo la composición del polímero varía de acuerdo a las condiciones ambientales limitando su uso en diversos campos, principalmente en el área médica y farmacéutica (Hernández *et. al.*, 2010). En *A. vinelandii* el estudio de la genética y la regulación de la síntesis de alginato es motivado por el rol de este polímero durante el enquistamiento y también por el potencial que representa *A. vinelandii* para la producción de alginatos de composición definida. Además, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *A. vinelandii* hace de esta bacteria un modelo ideal de estudio, tanto para el campo científico como para el tecnológico (Setubal *et. al.*, 2009).

El proceso de biosíntesis de alginato se puede dividir en 4 etapas: i) la generación del monómero GDP-ácido manurónico; ii) polimerización y transferencia a través de la membrana citoplásmica; iii) transferencia del polímero a través del periplasma y modificación; iv) exportación a través de la membrana externa (Hay *et. al.*, 2013). Por mucho, la etapa mejor estudiada es la generación del monómero GDP-ácido manurónico. En contraste, el proceso de polimerización y transferencia a través de la membrana interna es la etapa más pobremente estudiada. En este proceso el ácido GDP-manurónico se polimeriza y se exporta a través de la membrana interna por Alg8, una glicosil-transferasa, cuya actividad está regulada post-traduccionalmente por Alg44. Alg44, también llamada la alginato co-polimerasa, posee un dominio PilZ el cual se caracteriza por unir c-di-GMP (Whitney y Howell, 2013). En *P. aeruginosa* se demostró que el c-di-GMP es esencial para la síntesis de alginato al requerirse para la activación de la alginato polimerasa Alg8. Así mismo en *P. aeruginosa* se describió una proteína de membrana

interna, llamada MucR, que regula positivamente la biosíntesis de alginato por medio de la generación de pozas de c-di-GMP en la cercanía de Alg44 (Hay *et. al.*, 2009).

Se ha propuesto que el PM del alginato producido por *A. vinelandii* es el resultado de dos actividades: la alginato polimerasa llevada a cabo por Alg8 y Alg44, y la actividad de las alginato liasas (Galindo *et. al.*, 2007). Aun cuando *A. vinelandii* posee 5 alginato liasas (AlgL, AlgE7, AlyA1, AlyA2 y AlyA3) solo AlgL se ha demostrado contribuye a una disminución en el PM del alginato sintetizado en fase estacionaria (Trujillo-Roldán *et. al.*, 2003). Así mismo se ha demostrado que el PM varía dependiendo de las concentraciones de oxígeno en el medio; en algunos casos un aumento en el PM del alginato sintetizado correlaciona con un aumento en la expresión de *Alg8* (Galindo *et. al.*, 2007).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *A. vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria Gram-negativa de vida libre fijadora de nitrógeno perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, con una morfología pleomórfica, que varía desde formas bacilares hasta una forma cocoide. Las dimensiones celulares varían entre 1.6–2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3–5  $\mu\text{m}$  de longitud. El tamaño de *A. vinelandii* se ha relacionado con el número de copias de su cromosoma, del cual se han registrado hasta 80 copias. Su motilidad es por medio de flagelos peritricos (Kennedy *et. al.*, 2005). Es una bacteria aerobia estricta, capaz de fijar el nitrógeno en esas condiciones debido a una proteína FeSII que brinda una “protección conformacional” a la nitrogenasa del daño por oxígeno, además de poseer una velocidad de consumo de oxígeno muy elevada manteniendo los niveles de oxígeno bajos en el citoplasma (Kennedy *et. al.*, 2005). Otra característica sobresaliente de *A. vinelandii* es la producción de dos polímeros de importancia industrial: el poliéster intracelular PHB y el polisacárido extracelular alginato (figura 1) (Segura *et. al.*, 2014).

*A. vinelandii* presenta dos fases en su ciclo de vida, una fase vegetativa y una fase de vida latente, el quiste (figura 1). Cuando se inicia el proceso de diferenciación, las células pierden sus flagelos y se presenta una última división celular donde se generan dos células esféricas de tamaño menor, sus paredes se engrosan y forman 2 capas, la intina y la exina, constituidas principalmente de alginato (13 y 32% respectivamente) y lipoproteínas. Una vez que termina este proceso, se presenta la formación de quistes maduros, que son células de 1.5  $\mu\text{m}$  de largo y 2.0  $\mu\text{m}$  de ancho, constituidos por un cuerpo central o basal, que en su interior contiene gránulos de un polímero de reserva, el polihidroxibutirato (PHB) (Segura *et. al.*, 2014)

Cuando las condiciones son favorables se inicia el proceso de germinación, proceso durante el cual la intina y exina se rompen, iniciando todos los procesos relacionados con la fase vegetativa. La germinación dura entre 8 y 12 h (Segura *et. al.*, 2014).

### 2.2 Alginato

El alginato es un polisacárido lineal compuesto de residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y su epímero en C-5 el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. El alginato bacteriano se encuentra acetilado en las posiciones O-2/O-3 del manuronato (figura 2) (Hay *et. al.*, 2013).

Los ordenamientos aleatorios de estos monómeros resultan en alginatos con diferentes propiedades físicas y químicas, además presentan una diversidad de pesos moleculares (Hay *et. al.*, 2013). El PM, el contenido y la distribución de los residuos M y G, así como el grado de acetilación del alginato determinan sus propiedades fisicoquímicas. Un mayor PM resulta en un incremento en la viscosidad, mientras que un mayor contenido de bloques G favorece la formación de geles rígidos en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ . Estas distintas

familias de polímeros juegan un papel importante en la estructuración de los quistes resistentes a la desecación que forma *A. vinelandii* (Segura *et. al.*, 2014).



Figura 1. Quiste de *A. vinelandii*. En las capas externas, intina (in) y exina (ex) se encuentra el alginato y en el interior del quiste se encuentra el PHB (phb) (Segura *et. al.*, 2014).

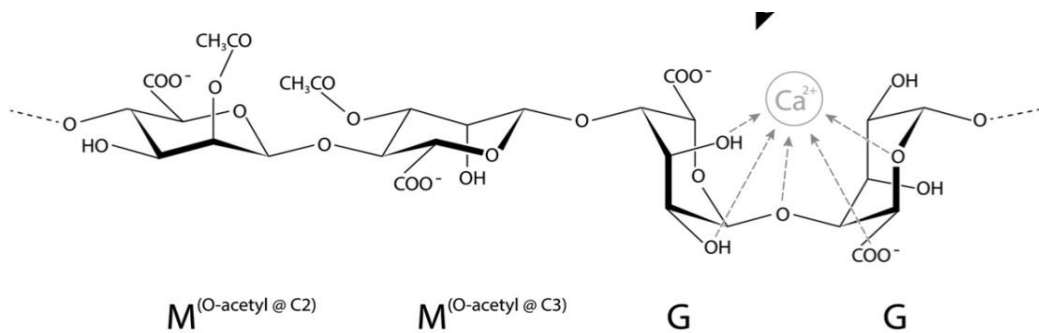


Figura 2. Estructura del alginato (Hay *et. al.*, 2013).

### 2.3 Biosíntesis del alginato

La bioquímica y la genética de la síntesis de alginato ha sido estudiada ampliamente en *Pseudomonas aeruginosa* y en *A. vinelandii*, y se encuentra conservada en ambas bacterias. El estudio de la síntesis de alginato en *P. aeruginosa* está motivado por el rol que este polisacárido tiene en la patogénesis de esta bacteria al constituir un factor de virulencia en las infecciones de pulmones de pacientes con fibrosis quística. La biosíntesis de alginato se divide en 4 etapas (Hay *et. al.*, 2013):

1. Generación del monómero GDP-ácido manurónico
2. Polimerización y transferencia a través de la membrana citoplasmática
3. Transferencia del polímero a través del periplasma y modificación
4. Exportación a través de la membrana externa

## Etapa 1. Generación del monómero GDP-ácido manurónico

El monómero se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato con la intervención de 3 enzimas. Primero la enzima bifuncional AlgA (PMI-GMP) cataliza la conversión de fructosa-6-fosfato en manosa-6-fosfato con su actividad de isomerasa (PMI). Una mutasa, AlgC convierte la manosa-6-fosfato en manosa-1-fosfato. La manosa-1-fosfato es convertida en GDP-manosa, con la hidrólisis de GTP, con la actividad GDP-manosa pirofosforilasa de la fosfomanosa-isomerasa (PMI-GMP). Por último, AlgD cataliza la conversión de GDP-manosa a ácido GDP-manurónico (figura 3) (Hay *et. al.*, 2013).



Figura 3. Ruta de biosíntesis del precursor del alginato, ácido GDP-Manurónico (Elaborado a partir de Hay *et. al.*, 2013).

## Etapa 2. Polimerización y transferencia a través de la membrana citoplasmática

Esta etapa es la más pobremente entendida del proceso de biosíntesis. Alg8 es una glicosiltransferasa de clase II que cataliza la transferencia de residuos de azúcar de un donador activado a una molécula aceptora, la cual puede ser una cadena de carbohidrato en crecimiento. Una segunda proteína, Alg44, es requerida para la polimerización del alginato, formando el complejo polimerasa Alg8-Alg44 necesario para la producción de alginato. El alginato es sintetizado por este complejo como una cadena de polimanuronato que en etapas posteriores sufre otras modificaciones para conformar el alginato bacteriano característico. Alg44 posee un dominio PilZ en su extremo N-terminal citosólico, este dominio se caracteriza por unir una molécula reguladora llamada c-di-GMP, sugiriendo que el proceso de biosíntesis de alginato está regulado de manera post-traduccional por esta molécula (figura 4) (Hay *et. al.*, 2013 y Whitney y Howell, 2013).

## Etapa 3. Transferencia del polímero a través del periplasma y modificación

La modificación del alginato ocurre en el periplasma. Tres enzimas participan en la modificación de la cadena de alginato creciente, una epimerasa, transacetilasas y una liasa. El complejo de acetilación está formado por las enzimas AlgI, AlgV (AlgJ en *P. aeruginosa*), AlgF y AlgX (Baker *et. al.*, 2014). La acetilación se lleva a cabo en las posiciones O-2 y/o O-3 de los residuos de manuronato. Esta acetilación evita la epimerización de los residuos de manuronato a guluronato por la epimerasa AlgG y se cree que previene la degradación de la cadena de alginato por la liasa AlgL (Hay *et. al.*, 2013).

*A. vinelandii* posee 8 epimerasas, una periplásmica, AlgG y 7 extracelulares, AlgE1 – AlgE7. Estas epimerasas extracelulares son dependientes de calcio y poseen diferentes especificidades hacia los diferentes ordenamientos de residuos M y G. Además AlgE7 posee actividad alginato-liasa (Hay *et. al.*, 2013).

La alginato liasa AlgL cataliza una reacción de  $\beta$ -eliminación llevando a la degradación del alginato durante su transferencia por el periplasma, sugiriendo que AlgL podría funcionar en el control de la longitud y el PM del alginato producido (Hay *et. al.*, 2013).

Se ha propuesto que AlgG, AlgX y AlgK forman una especie de andamiaje periplásmico dirigiendo al alginato producido hacia la porina AlgJ (AlgE en *P. aeruginosa*) y al mismo tiempo protege la cadena de alginato de la liasa AlgL (figura 4) (Hay *et. al.*, 2013).

#### **Etapas 4. Exportación a través de la membrana externa**

La exportación del alginato se lleva a cabo por una proteína de membrana externa que lleva por nombre AlgJ (AlgE en *P. aeruginosa*) (figura 4) (Hay *et. al.*, 2013).

Este sistema de biosíntesis de alginato ha sido clasificado por Whitney y Howell (Whitney y Howell, 2013) dentro de los sistemas de excreción de sintasa-dependiente en bacterias gram-negativas, donde han identificado los componentes conservados claves de este proceso de biosíntesis: una polimerasa embebida a la membrana interna, un sistema de andamiaje periplásmico y una porina en la membrana externa (Whitney y Howell, 2013). Además, existe evidencia que relaciona estos sistemas de excreción con una regulación post-traducciona por la molécula c-di-GMP (Hay *et. al.*, 2009).

### **2.4 Factores que afectan el PM del alginato**

#### **2.4.1 Oxígeno**

El PM del alginato producido por *A. vinelandii* es el resultado de dos actividades: la polimerización del alginato llevada a cabo por Alg8 y Alg44, y la actividad de las alginato liasas (Galindo *et. al.*, 2007). *A. vinelandii* posee 5 alginato liasas, tres se encuentran en el espacio periplásmico (AlgL, AlyA1 y AlyA2) y las 2 restantes son extracelulares (AlyA3 y AlgE7) (Flores *et. al.*, 2013). Se ha demostrado que solo AlgL contribuye a una disminución en el PM del alginato sintetizado en fase estacionaria (Trujillo-Roldán *et. al.*, 2003).

Así mismo, se ha demostrado que el PM varía dependiendo de las concentraciones de oxígeno en el medio. En un estudio donde se varía la concentración de sacarosa y la velocidad de agitación en un cultivo continuo de *A. vinelandii*, se correlacionó un aumento en el PM del alginato sintetizado con un aumento en la expresión de *alg8* cuando la velocidad de agitación se incrementó de 300 rpm a 500 rpm (Díaz-Barrera *et. al.*, 2012). En el mismo sentido, se ha demostrado que la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) influye en el PM del alginato, relacionando un alginato de mayor PM en cultivos en lote en los cuales la VTO es baja (Díaz-Barrera *et. al.*, 2007). El PM del alginato producido

a 3.0 mmol O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> fue 7 veces mayor que el obtenido a 9 mmol O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Díaz-Barrera *et. al.*, 2007).

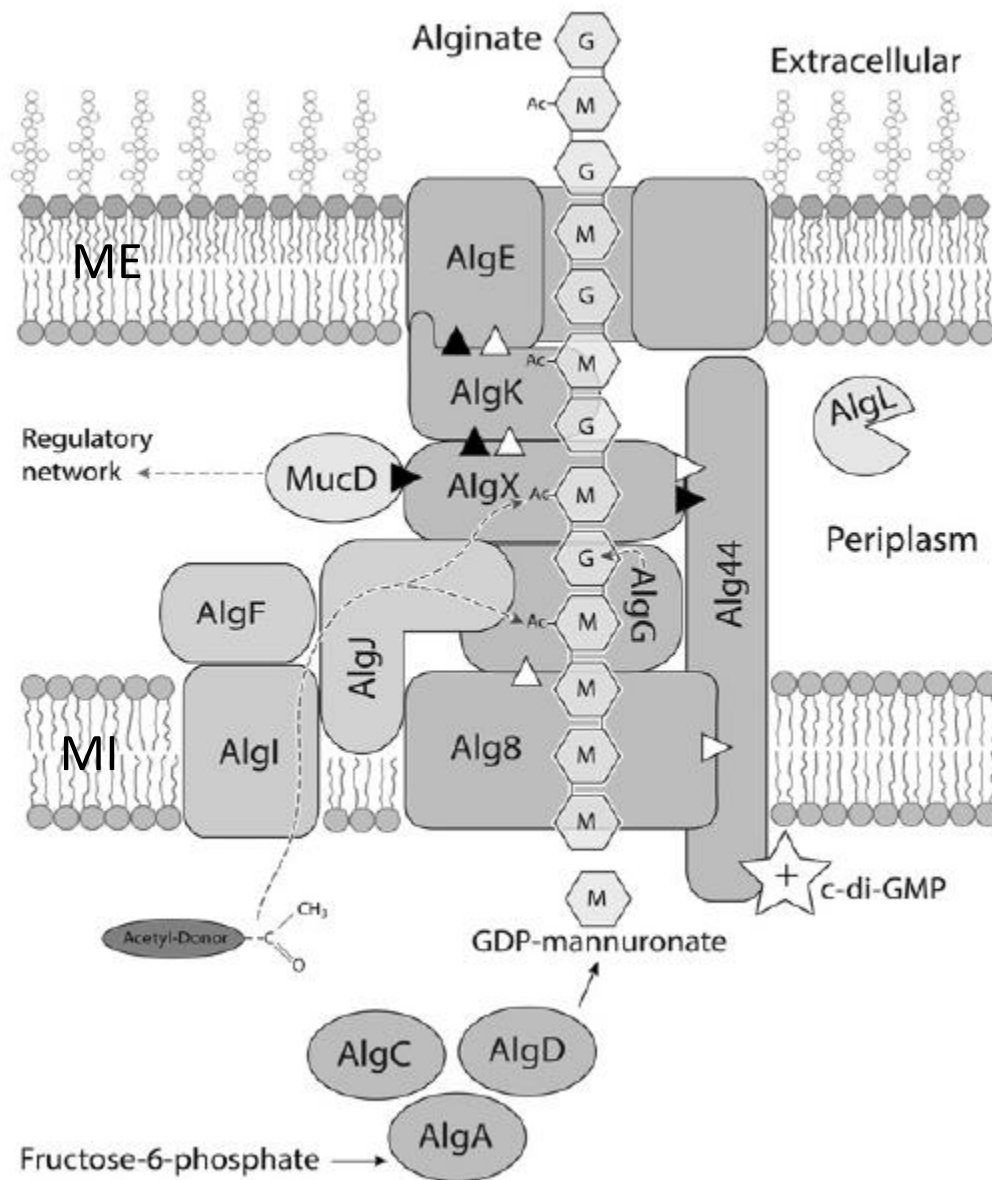


Figura 4. Representación esquemática del sistema de excreción del alginato (Hay *et. al.*, 2013).

Por otro lado, en un estudio realizado a dos tensiones de oxígeno diferentes (TOD), una limitante de oxígeno (1%) y otra no limitante (5%) se determinó el PM del alginato, la actividad de las liasas de *A. vinelandii* y la expresión de los genes *alg8* y *alg44*. Se reportó un alginato de mayor PM (1,200 kDa) a 1% de TOD, mientras que un alginato de menor PM (42 kDa) se obtuvo a 5% de TOD. Estos resultados se correlacionan con una elevada expresión de los genes *alg8* y *alg44* a 1% de TOD cuando se comparan con los niveles de expresión a 5% de TOD, además la actividad de las alginato liasas tanto

intracelulares como extracelulares se encuentra disminuida a 1% de TOD cuando se comparan con los valores obtenidos a 5% de TOD (Flores *et. al.*, 2013). En otro reporte realizado al 3% de TOD se encontró que en la fase pre-estacionaria de crecimiento, hubo una disminución del PM del alginato y una elevada actividad alginato liasa a partir de esta etapa de crecimiento en la cepa silvestre, Estos efectos no se observan en la cepa mutante en *algL*, en la que el PM de los alginato producidos a 1% de TOD se mantienen con el tiempo, lo mismo sucede a 3% y 5% de TOD (Trujillo-Roldán *et. al.*, 2004), concluyendo así que la enzima AlgL depolimeriza el alginato producido en la cepa silvestre. De manera general el peso molecular promedio (PMP) del alginato se incrementa al disminuir el oxígeno.

#### 2.4.2 Las alginato liasas

Las alginato liasas, también denominadas alginasas, catalizan la depolimerización del alginato por ruptura del enlace  $\beta$ -1,4 a través de un proceso de  $\beta$ -eliminación, generando oligosacáridos con un 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enepiranosiluronato en su extremo no reductor (Jedrzejas, 2000). Estas enzimas se han encontrado en organismos capaces de degradar el alginato y utilizarlo como fuente de carbono y energía. También en bacterias como *Pseudomonas* y *Azotobacter*, y en bacteriófagos que son específicos de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* (Wong *et. al.*, 2000).

El alginato puede contener 4 diferentes enlaces glucosídicos, M-M, M-G, G-M y G-G (Segura *et. al.*, 2014 y Hay *et. al.*, 2013). Estos enlaces son escindidos a diferentes velocidades por las alginato liasas debido a las distintas especificidades existentes entre los enlaces y la alginato liasa (Gimmestad *et. al.*, 2009). La actividad de estas liasas también se ve afectada por el grado de acetilación del alginato (Ertesvåg *et. al.*, 1998).

Dentro del grupo de genes que codifican para las proteínas necesarias para la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* se encuentra codificada una alginato liasa, AlgL (Hay *et. al.*, 2013). Esta alginato liasa fue clonada y expresada en *E. coli* por Ertesvåg *et. al.* obteniendo una proteína de 39 kDa y con las siguientes propiedades bioquímicas (Ertesvåg *et. al.*, 1998):

- 1.- pl de 5.1
- 2.- pH óptimo de 8.1 – 8.6
- 3.- Necesita de NaCl 0.35 M
- 4.- Una Km aparente de  $4.6 \cdot 10^{-4}$  M cuando se utilizó poli-manuronato como sustrato a pH de 8.1 y NaCl 0.35 M
- 5.- Su actividad no sufrió cambios por la adición de iones divalentes, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y Na<sub>2</sub>EDTA. Solo la adición de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 mM redujo la actividad a 61%

Esta alginato liasa, AlgL, puede cortar de manera eficiente los alginato ricos en bloques MM pero no aquellos con bloques GG, además es capaz de romper los enlaces donde

uno de los residuos se encuentra acetilado, pero no aquellos donde los 2 residuos están acetilados (Ertesvåg *et. al.*, 1998).

AlgE7 es otra alginato liasa encontrada en *A. vinelandii*, con la particularidad de ser una proteína bifuncional, es una epimerasa y una alginato liasa (Svanem *et. al.*, 1999). Es una proteína de 90.4 kDa cuya actividad depende fuertemente de  $\text{Ca}^{+2}$ , es inhibida por iones divalentes como  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , y altas concentraciones de NaCl inhiben fuertemente la actividad liasa de AlgE7; su pH óptimo está entre 6.9 - 7.3 (Svanem *et. al.*, 2001). Esta alginato liasa tiene una preferencia por sustratos con las secuencias G↓MM y G↓GM rompiendo el enlace donde se encuentra la flecha. Dado que una mutación en el sitio activo elimina tanto la actividad epimerasa y liasa se cree que utiliza el mismo sitio activo para ambas reacciones enzimáticas (Svanem *et. al.*, 2001) (figura 5).

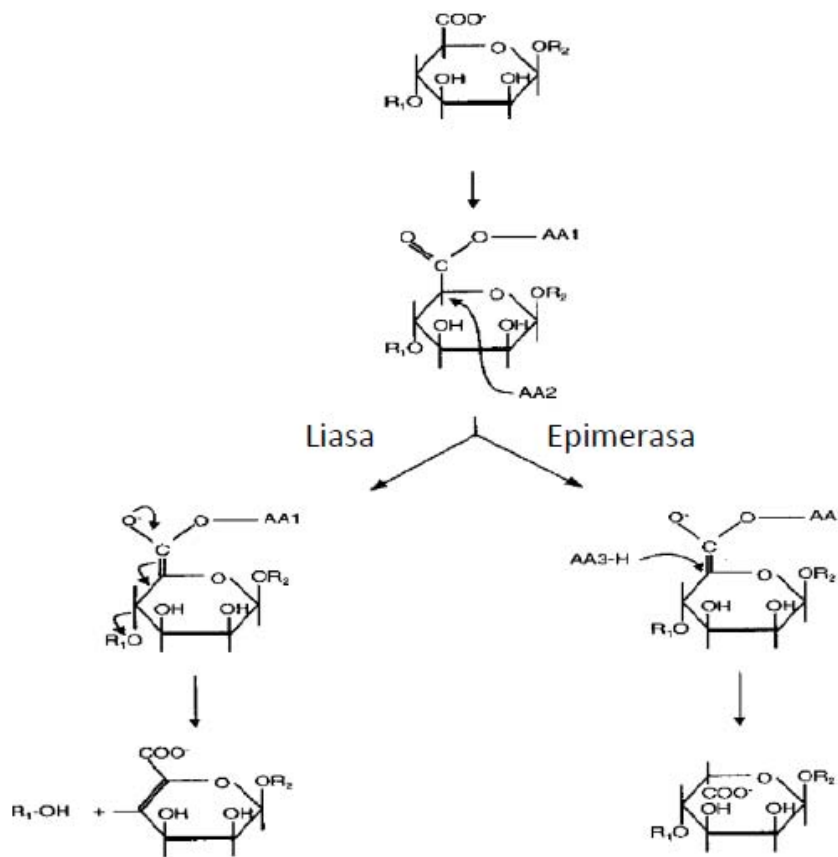


Figura 5. Reacción de β-eliminación (izquierda) y epimerización (derecha) de AlgE7 (Svanem *et. al.*, 2001).

Otras liasas fueron identificadas en *A. vinelandii* por Gimmetstad *et. al.* en el 2009 (Gimmetstad *et. al.*, 2009). La primer liasa encontrada se denominó AlyA3 y se caracteriza por poseer un extremo N-terminal con 29% de identidad a la alginato liasa AlyA de *Klebsiella pneumoniae* y 28% de identidad con las alginato liasas de *P. aeruginosa*. El extremo C-terminal contiene un módulo RTX, el cual es característico del grupo de

proteínas que son excretadas por los sistemas de secreción tipo 1, y un motivo de 9 aminoácidos que unen  $\text{Ca}^{2+}$ . El extremo N-terminal de esta AlyA3 se utilizó en una búsqueda Blast y dos genes más fueron identificados como alginato liasa y se denominaron AlyA1 y AlyA2; estas liasas no contienen el módulo RTX en su extremo C-terminal (Gimmestad *et. al.*, 2009). En la tabla 1 se muestran algunas de las propiedades de las liasas caracterizadas (Gimmestad *et. al.*, 2009).

AlyA3 es estimulada por calcio mientras que AlyA1 y AlyA2 no son afectadas por el ion. Estas tres enzimas son capaces de romper los enlaces M-M, M-G, G-M y G-G pero a diferentes velocidades. El mejor sustrato para estas liasas es un MG-alginato, es decir, son capaces de escindir los enlaces M-G y G-M. AlyA3 es capaz de romper los diferentes enlaces del alginato a una mayor velocidad que AlyA1 y AlyA2, mientras que AlyA2 no rompe los enlaces G-G y M-M (Gimmestad *et. al.*, 2009).

Tabla 1. Características de las liasas AlyA de *A. vinelandii*

Enzima	Masa molecular (kDa)	pI	pH óptimo	Fuerza iónica óptima (mM)	Identidad de la liasa al módulo de AlyA3 (%)
AlyA1	25.9	9.7	7.8	200	26
AlyA2	26.6	5.6	6.8	100	29
AlyA3	49.4	4.2	7.5	25	100

#### 2.4.2.1 Roles biológicos de las Alginato liasas.

Trujillo-Roldán *et. al.* reportó una mutante incapaz de sintetizar AlgL, observando que tanto el crecimiento celular como la síntesis de alginato son procesos que pueden llevarse a cabo aún en la ausencia de esta liasa. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la frecuencia de enquistamiento y germinación entre la cepa silvestre y la mutante *algL* (Trujillo-Roldán *et. al.*, 2003); esto contrasta con lo explorado en *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, en donde AlgL es necesaria para la viabilidad de la célula cuando ésta produce grandes cantidades de alginato, degradando las cadenas de alginato que no han sido totalmente secretadas (Bakkevig *et. al.*, 2005 y Jain y Ohman, 2005).

El papel biológico de las AlyA1, AlyA2 y AlyA3 no se ha descrito con detalle, solo se ha descrito que AlyA3 está involucrada en alguna etapa del proceso de enquistamiento, más probablemente en la etapa de germinación, porque una cepa de *A. vinelandii alyA3* es incapaz de germinar (Gimmestad *et. al.*, 2009). AlgE7 no está involucrada en la germinación de los quistes en *A. vinelandii* pero se ha reportado que podría estar involucrada en la liberación del alginato adherido a la célula (Gimmestad *et. al.*, 2009).

#### 2.5 c-di-GMP

El c-di-GMP es una molécula señalizadora, un segundo mensajero, involucrado en diversos procesos bacterianos como adaptación, expresión de factores de virulencia,



formación de biopelículas y secreción de exopolisacáridos (Römling *et. al.*, 2013). Los niveles de c-di-GMP son controlados por proteínas con actividad diguanilato ciclasa (DGC), que poseen el dominio GGDEF para la producción c-di-GMP y por las fosfodiesterasas (PDE), que poseen el dominio EAL y que degradan el c-di-GMP disminuyendo los niveles del mismo (Römling *et. al.*, 2013).

Las DGC se caracterizan por un motivo GG(D/E)EF el cual se encarga de unir GTP en el sitio activo de la enzima, también denominado sitio A. Los primeros dos residuos de glicina están involucrados en la unión del GTP, mientras que el cuarto residuo, el de ácido glutámico, se encuentra coordinando a los cationes necesarios para la formación del enlace fosfodiéster, los cuales pueden ser  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ . El tercer aminoácido es indispensable para la catálisis y también participa en la coordinación de los iones metálicos, este aminoácido puede ser un residuo de aspartato o glutamato. Este dominio funciona formando homodímeros donde cada dominio GGDEF proporciona un GTP para la reacción. También se ha demostrado una inhibición por producto para este dominio; este sitio de inhibición se caracteriza por una secuencia conservada de RxxD, donde x puede ser cualquier residuo, ubicada 5 residuos arriba de la secuencia GG(D/E)EF (Römling *et. al.*, 2013).

El dominio EAL, característico de las PDE, se caracteriza por la conservación de esta secuencia EAL que le proporciona su nombre, además se han identificado también otros aminoácidos fuertemente conservados en este dominio, los cuales se muestran en la figura 6. Los residuos que forman parte del sitio activo de la enzima se muestran en color blanco en un fondo de color rojo o azul y además, se muestran otros aminoácidos conservados en las cercanías del sitio activo (Römling *et. al.*, 2013).

Estas enzimas requieren de iones  $Mn^{+2}$  o  $Mg^{+2}$  para funcionar y su actividad es fuertemente inhibida por los iones  $Ca^{+2}$ . Estos iones son necesarios para la unión de 2 moléculas de agua necesarias para la reacción de hidrólisis. Dentro de los aminoácidos encargados de coordinar los iones se encuentran el residuo de ácido glutámico que pertenece a la secuencia EAL y dada la importancia de los iones para unir las moléculas de agua, este residuo se encuentra altamente conservado en los dominios EAL activos (Römling *et. al.*, 2013).

En algunos casos los dominios GGDEF y EAL se encuentran en la misma cadena polipeptídica, formando una proteína bifuncional. Estas proteínas normalmente poseen uno o mas dominios sensores, por ejemplo PAS o REC, los cuales regulan diferencialmente la actividad de DGC y PDE en respuesta a una señal, de tal manera que una actividad enzimática prevalece sobre la otra bajo las condiciones que desencadenan la señal (Römling *et. al.*, 2013). Además, existen proteínas bifuncionales que no poseen dominios reguladores. En este caso uno de los dominios enzimáticos se encuentra degenerado, es decir, catalíticamente inactivo, por lo cual solo son capaces de unir su sustrato. De esta manera, el dominio degenerado regula la actividad del dominio activo. (figura 7) (Römling *et. al.*, 2013).

Se ha demostrado que el c-di-GMP es esencial para la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. La co-polimerasa Alg44 contiene un dominio PilZ que une al c-di-GMP, estimulando la actividad polimerizante de Alg8. Cuando se mutan los residuos conservados del dominio PilZ de Alg44, éste pierde la capacidad de unir c-di-GMP y se pierde la capacidad de producir alginato (Merighi *et. al.*, 2007). También, se ha descrito una proteína denominada MucR, la cual sintetiza c-di-GMP en las cercanías del dominio PilZ de Alg44 (Hay *et. al.*, 2009), poniendo de manifiesto la regulación de la biosíntesis de alginato por este segundo mensajero, c-di-GMP.

### 2.5.1 Dominio PAS: Un dominio sensor que regula la actividad enzimática de DGC y PDE.

El dominio PAS se ha identificado en los tres dominios de los seres vivos, *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, y se le ha atribuido la función de monitorear cambios en luz, potencial redox, oxígeno y otros ligandos pequeños (Taylor y Zhulin, 1999).

PAS es el acrónimo formado con los nombres de las proteínas donde se identificó por primera vez.

P (PER, Period Clock protein de *Drosophila*)

A (ARNT, Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)

S (SIM, Single-minded protein de *Drosophila*)

Protein	Residue	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Conserved	Activity
cd01948	17QP	34EALLR	53AE	88VN	121EITE	151DDFGTGYSS	172KIDRSF	208EGVE	228QG			Activity
RocR_Paer	161QP	178EVLAR	197ME	233FN	265EITE	295DDFGAGYSS	319KLDRTF	352EGVE	372QG			Yes
Tbd1265	509QP	523EALVR	545AE	583VN	616EITE	646DDFGTGYSS	667KIDQSF	703EGIE	723QG			Yes
PdeA1_Gxyl	QP	EALSR	AE	VN	EITE	DDFGTGYSS	KIDRSF	EGVE	QG			Yes
DOS_Ecoli	QP	EALAR	AE	VN	EITE	DDFGTGFSG	KIDKSF	EGVE	QG			Yes
BifA_Paer	QP	EALLR	AE	VN	EVTE	DDFGTGYSS	KIDKSF	EGVE	QG			Yes
VieA_Vcho	QP	EALVR	IE	VN	EMTE	DDFGTGYAS	KIDRSF	EGVE	QG			Yes
YciR_Ecoli	QP	EALVR	AE	VN	ELTE	DDFGTGYSS	KLDQVF	EGVE	QG			Yes
HmsP_Ypest	QA	EALLR	AE	VN	EITE	DDFGIGYSS	KLDKSF	EGVE	QG			Yes
BlrP1_Kpne	QA	EALIR	AA	IN	EVTE	DDFGAGYSG	KVDAEL	EGVE	QG			Yes
YahA_Ecoli	QP	EVLVR	AE	IN	ELTE	DDFGTGYAT	KIDKSF	EGVE	QG			Yes
YhjH_Ecoli	QP	ELLTV	--	VN	ELVE	DDFGTGMAN	KIAREL	EGVE	QG			Yes
YkuI_Bsub	QA	EVLGR	PE	MN	EITE	DNIGKESSN	KIDLQA	EDIE	QG			Yes?
YcgF_Ecoli	HP	EAIVQ	QR	IN	EFTE	DHFGAGFAG	KISQEL	MGVA	QG			No
CsrD_Ecoli	KP	ELMCR	AE	IQ	ELAE	NQAGLTLVS	KLHPGL	TGVR	QG			No
CdgR_Ecoli	LP	ELITH	LT	PQ	LINE	GNLGAGNST	MLDKSF	GGID	QG			No
Lpg1057_Lp	QP	EVLRL	AE	IN	EITE	DNFGSGYSF	KLKQTL	GGVE	QG			No?
FimX_Paer	QA	EVLRL	AK	VH	QISE	SQFGCSLNP	KIDGSF	PFVE	QG			No
LapD_Pflu	QP	KVLSR	LE	LN	EIGE	QRFGGRFSM	KIDGSY	ERVE	QG			No
ToxR_Paer	HG	KLSLR	--	IP	AIDE	QRIDTDARQ	GLDARL	LNVD	HG			No

Figura 6. Residuos conservados del sitio activo de los dominios de fosfodiesterasa. Los aminoácidos en letras blancas y fondo de color azul o rojo pertenecen al sitio activo. Otros aminoácidos conservados en las cercanías del sitio activo se muestran con letra de color en fondo blanco. El código cd01948 pertenece a la secuencia consenso del dominio EAL de conserved domain database (CDD) (Römling *et. al.*, 2013).

El dominio PAS se identificó en organismos eucarióticos como una región de aproximadamente 270 aminoácidos el cual contenía 2 secuencias repetidas conservadas

de 50 aminoácidos que se llamaron PAS-A y PAS-B (Taylor y Zhulin, 1999). Posteriormente se identificaron secuencias conservadas dentro de este dominio y se nombraron S1-box y S2-box (Zhulin *et. al.*, 1997). Estas secuencias se encuentran separadas por una región variable en secuencia y longitud, y se propuso redefinir las secuencias PAS-A y PAS-B por estas nuevas secuencias (Zhulin *et. al.*, 1997). Además, con S1-box y S2-box es posible hacer una predicción estructural para el dominio PAS, hojas  $\beta$  para la S1-box y S2-box, y una  $\alpha$  hélice en la secuencia central (Zhulin *et. al.*, 1997). Por otro lado, Ponting y Aravind reportan una región de 40 – 45 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio PAS a la que llaman motivo PAC (PAC motif, en inglés). Así, la secuencia del dominio PAS (anteriormente definido por las secuencias S1-box y S2-box) se define como el dominio PAS más un motivo PAC (Ponting y Aravind, 1997). Dada la existencia de múltiples proteínas que comparten los elementos estructurales del dominio PAS, proteínas con S1/S2, PAS-A/PAS-B, dominios LOV y proteínas con dominio PAS/motivo PAC, se ha propuesto el término “PAS fold” para incluir a todas estas proteínas (Hefti *et. al.*, 2004).

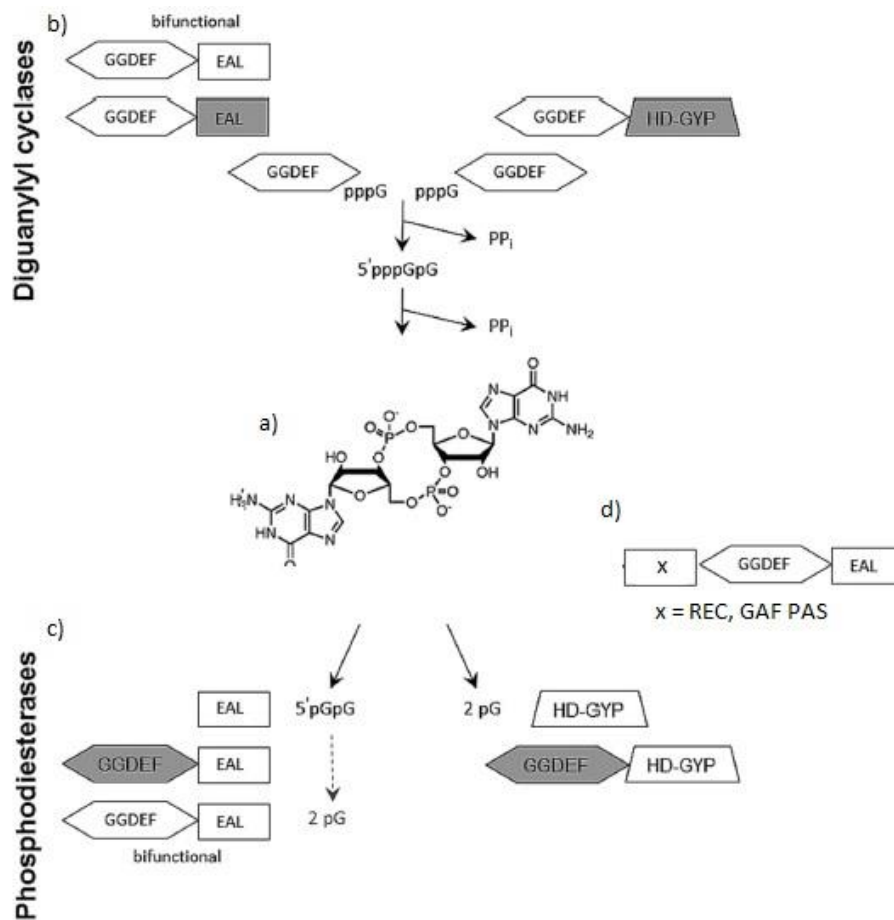


Figura 7. a) Estructura química del c-di-GMP. b) Síntesis de c-di-GMP por las diguanilato ciclasas a través de su dominio GGDEF. c) Degradación de c-di-GMP por las fosfodiesterasas a través de su dominio EAL. d) Proteínas multidominio con ambos dominios de diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa regulados por el dominio sensor o regulador X (Römling *et. al.*, 2013).

Este dominio se encuentra predominantemente en proteínas que participan en la transducción de señales, aun cuando estas proteínas contengan dominios en el periplasma, el dominio PAS se encuentra en el citosol (Taylor y Zhulin, 1999). En bacterias se encuentran principalmente dentro de los sistemas de dos componentes y en organismos eucarióticos en factores transcripcionales, proteínas quinasas, etc. (Taylor y Zhulin, 1999). Se caracteriza por poseer un hueco donde se unen algunos ligandos, desde un grupo hemo hasta una guanidina (Galperin, 2004).

La estructura tridimensional del dominio PAS se describe de acuerdo a la figura 8. La tapa N-terminal (morada, residuos 1 a 28) incluye las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; el PAS core (naranja, residuos 29 a 69) incluye 3 hebras  $\beta$  y las hélices  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ ; en el conector helicoidal (verde, residuos 70 a 87) se encuentra la hélice  $\alpha_5$  que conecta dos hebras  $\beta$  y por último se encuentra el andamio- $\beta$  (azul, residuos 88 a 125) compuesto de otras 3 hebras  $\beta$ . El core del dominio PAS es hidrofóbico (Taylor y Zhulin, 1999).

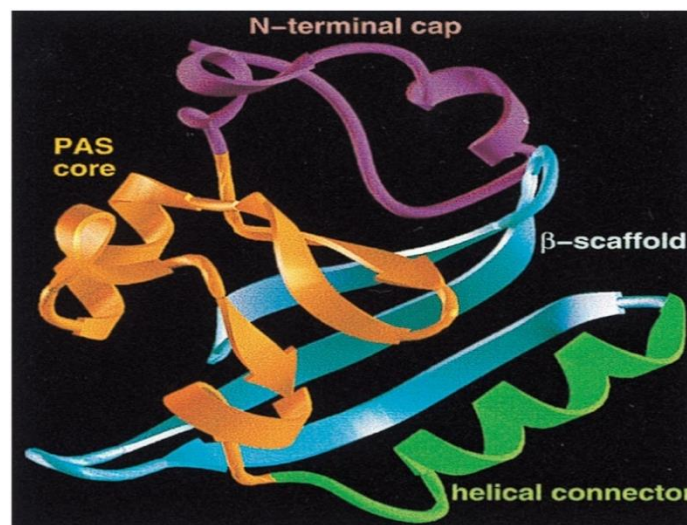


Figura 8. Estructura tridimensional del dominio PAS. Ver el texto para la descripción (Taylor y Zhulin, 1999)

El dominio PAS necesita de cofactores para detectar las señales: FMN para la luz, FAD para el potencial redox y un grupo hemo para los gases diatómicos. Por otro lado, otras señales como voltaje, xenobióticos y disponibilidad de nitrógeno no requieren de cofactores (Guilles-Gonzalez y Gonzalez, 2004).

Se han descrito distintos tipos de proteínas con dominio PAS en la literatura, proteínas de organismos eucarióticos y bacterias (Taylor y Zhulin, 1999; Guilles-Gonzalez y Gonzalez, 2004; Rodgers, 1999). Dentro de las primeras proteínas descritas con dominios PAS está FixL, la cual pertenece al sistema de dos componentes (FixL/FixJ) cuya función es la activación de los genes para la fijación de nitrógeno en los nódulos formados por especies de *Rhizobium* (Guilles-Gonzalez y Gonzalez, 2004; Rodgers, 1999). El mecanismo de regulación de este sistema de dos componentes se ilustra en la figura 9. La cinasa histidínica fosforila a su regulador de respuesta, FixJ, en respuesta a los niveles de

oxígeno. La actividad de quinasa de FixL es inhibida por el oxígeno. El dominio PAS de FixL enlaza al oxígeno a través del cofactor hemo-hierro y una histidina, denominada proximal (Guilles-Gonzalez y Gonzalez, 2004; Rodgers, 1999). Cuando FixL une al oxígeno el hierro se encuentra en un estado de bajo spin y la actividad quinasa de FixL es inhibida, FixJ no es fosforilado y no es capaz de ejercer su función de activador transcripcional. Cuando el oxígeno no está unido a FixL, el hierro se encuentra en un estado de spin alto y FixL fosforila a FixJ, el cual en su estado fosforilado lleva a cabo la activación de los genes para la fijación de nitrógeno. Durante esta transición de alto spin a bajo spin los anillos de porfirina que forman el hemo sufren un movimiento de 0.4 amstrong hacia afuera del plano donde se encontraba, dicho movimiento se ha propuesto como el inductor de un cambio conformacional en la proteína, responsable del cambio de actividad de ésta (Guilles-Gonzalez *et. al.*, 1995). Por otro lado, se ha reportado una proteína de *E. coli* en la cual la unión del oxígeno al dominio PAS desplaza a un aminoácido, con lo cual se induce el cambio conformacional que controla la actividad de la enzima (Delgado-Nixon *et. al.*, 2000).

También se han descrito proteínas con actividad enzimática bajo el control del dominio PAS que controlan los niveles de segundos mensajeros. El primer ejemplo descrito es una fosfodiesterasa de *Acetobacter xylinum* (Chang *et. al.*, 2001), cuya función es linealizar el c-di-GMP. El c-di-GMP es un regulador alostérico de la sintasa de celulosa en *A. xylinum*, por lo cual, la producción de celulosa por la bacteria dependen de la cantidad de c-di-GMP. La actividad fosfodiesterasa de AxPDEA1 es reducida cuando la concentración de oxígeno es elevada y es más activa en condiciones anaerobias. Los autores indican que estas diferencias de actividad en las diferentes condiciones de oxígeno son consistentes con los resultados observados en cultivos de *A. xylinum* sin agitación y aireación, donde una película de celulosa es observada en la superficie de los cultivos. Al ser la superficie el lugar donde las bacterias entran en contacto con el oxígeno, la actividad fosfodiesterasa de estas es reducida, los niveles de c-di-GMP se mantienen y funciona como activador alostérico de la sintasa de celulosa (Chang *et. al.*, 2001).

DosP es otra proteína con actividad fosfodiesterasa que ha sido descrita en *E. coli*, cuyo gen se transcribe en forma de operón junto con el que codifica la diguanilato ciclasa, DosC. La actividad de estas proteínas DosC y DosP está controlada por los dominios de globina (GCS) y Dominio PAS, respectivamente. Ambos detectan oxígeno y modulan las actividades de las respectivas enzimas en función de los niveles de oxígeno (Tuckerman *et. al.*, 2009).

### **2.5.2 Proteínas involucradas en la síntesis y degradación de c-di-GMP en *A. vinelandii***

La secuenciación y análisis de genomas ha permitido encontrar genes que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo del c-di-GMP en una amplia variedad de microorganismos principalmente bacterias. Estos genes no se han encontrado en plantas y mamíferos por lo cual se desconoce el rol de c-di-GMP en estos organismos eucarióticos (Römling *et. al.*, 2013).

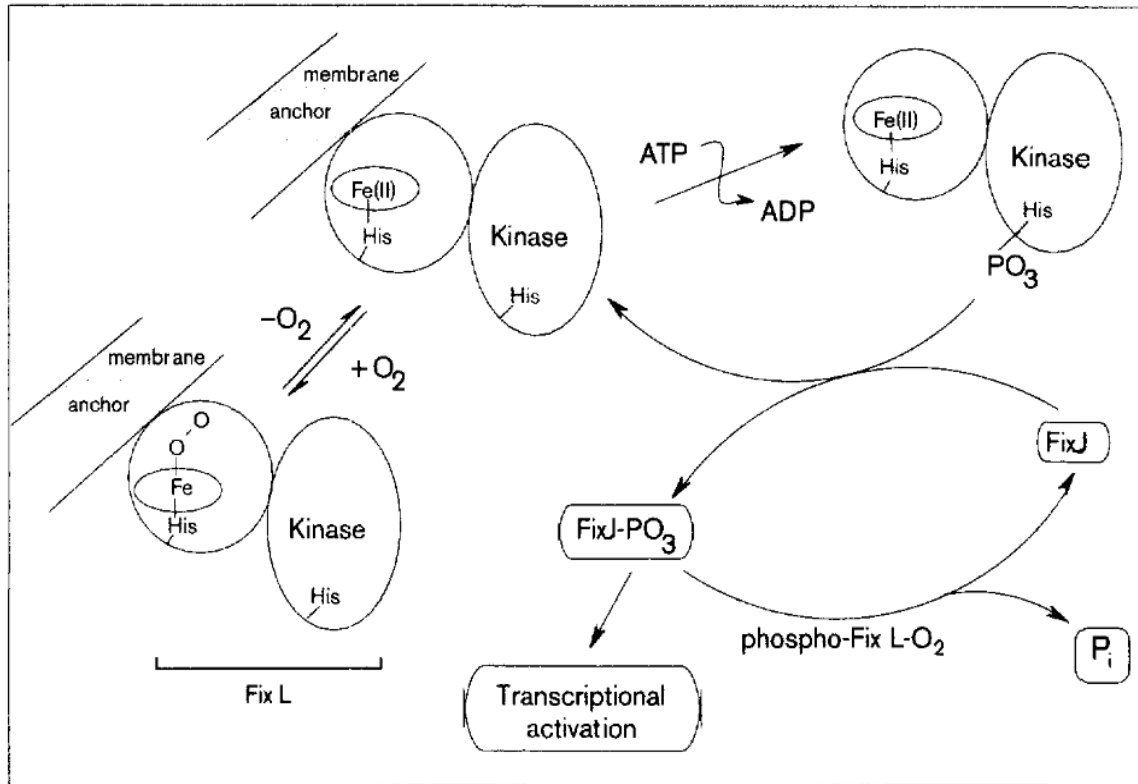


Figura 9. Representación esquemática de mecanismo de regulación de FixL. Ver el texto para la descripción (Rodgers, 1999).

La cantidad de DGCs y PDEs es muy diversa, se han anotado microorganismos que poseen muy pocas de estas proteínas, un ejemplo es *Lactobacillus salivarius* que posee sólo una DGC y una PDE en su genoma. Por otro lado, se encuentran las bacterias con una gran cantidad de DGCs y PDEs en su genoma, por ejemplo *Shewanella sediminis* con un total de 93 enzimas relacionadas con el metabolismo de c-di-GMP (52 DGC, 20 PDE y 21 enzimas bifuncionales). Además existen casos peculiares, como el de *Corynebacterium glutamicum* el cual posee una sola proteína bifuncional con actividad de DGC y PDE, además de poseer dos dominios sensores que podrían estar controlando las actividades de estos dominios enzimáticos en respuesta a una señal. Sin embargo, existen aún casos más extraños donde el microorganismo posee solo una de estas proteínas como es el caso de *Staphylococcus aureus* que posee una sola DGC (Römling *et. al.*, 2013).

Se ha reportado que el genoma de *A. vinelandii* tiene 5 365 318 pb (Setubal *et. al.*, 2009) y a través de una búsqueda de DGC y PDE en su genoma se encontraron un total de 26 proteínas. De las cuales 13 son DGC, 10 son bifuncionales y 3 poseen solo el dominio de PDE (tabla 2).

La mayoría de estas proteínas poseen dominios adicionales, dominios sensores, los cuales regulan la actividad del dominio enzimático en respuesta a una señal. Ninguna de estas proteínas se ha caracterizado hasta el día de hoy, por lo que se desconoce el efecto de estas proteínas en el metabolismo de *A. vinelandii*.

Tabla 2. Diguamilato ciclasas y fosfodiesterasas de *A. vinelandii*

Gen	Dominio	Dominio adicionales
Avin00370	GGDEF	-
Avin00420	GGDEF	GS_EcDosC-like_GGDEF
Avin04950	GGDEF	-
Avin05790	GGDEF	7TMR-DISMED2 7TMR-DISM_7TM
Avin08240	GGDEF	Cache_1
Avin22780	GGDEF	PAS
Avin29300	GGDEF	REC
Avin33420	GGDEF	-
Avin38420	GGDEF	Cation_ATPase_C
Avin39460	GGDEF	-
Avin44470	GGDEF	CHASE
Avin48220	GGDEF	PAS
Avin48930	GGDEF	-
Avin00530	GGDEF-EAL	-
Avin07910	GGDEF-EAL	PAS Tar HAMP
Avin11600	GGDEF-EAL	PAS
Avin25190	GGDEF-EAL	PAS GAF_2
Avin26340	GGDEF-EAL	HAMP PAS Atos
Avin28640	GGDEF-EAL	-
Avin37830	GGDEF-EAL	PRK11829
Avin49060	GGDEF-EAL	PAS
Avin49140	GGDEF-EAL	MHYT
Avin51660	GGDEF-EAL	CBS-pair
Avin34930	EAL	-
Avin25160	HD-GYP	REC
Avin50640	HD-GYP	REC

### 2.6 En *A. vinelandii* la proteína señalizadora de membrana interna MucG regula de manera negativa la producción y el PM del alginato.

En un banco de mutantes generadas por mutagénesis al azar se identificó una mutante llamada GG9 que mostró una producción específica de alginato 1.8 veces mayor con respecto a la cepa parental AEIV, en medio BS líquido (tabla 3). Así mismo, el PM del alginato sintetizado por la mutante GG9 se incrementó 2.5 veces (figura 10). La caracterización genotípica demostró que el miniTn5 se insertó en la hebra negativa a 51 pb corriente arriba de un gen que codifica para una proteína hipotética (Avin07920) cuyo codón de término se sobrepone con el codón de inicio del gen Avin07910, aparentemente formando un operón. Esto sugiere que la expresión de este operón se ve afectada por el

miniTn5. El gen Avin07910 codifica una proteína a la que hemos llamado MucG (figura 11). Un análisis de MucG reveló que se trata de una proteína multidominio de membrana interna la cual posee tanto el dominio GGDEF para la síntesis de c-di-GMP como el dominio EAL para su degradación. Ambos dominios están muy conservados y poseen los residuos involucrados en la catálisis sugiriendo que son activos. Además MucG posee un dominio PAS involucrado en la detección de oxígeno. Una caracterización más profunda de la mutante *mucG::miniTn5* logró establecer que el fenotipo observado en la mutante GG9 se debía a la ausencia de MucG ya que una mutante *mucG::miniTn5* reconstruida por genética reversa (cepa GG9R) o una mutante *mucG::Km* (cepa JGA501) exhibieron un incremento tanto en la producción específica como en el PM del alginato sintetizado. Resultados de fusiones transcripcionales con genes reporteros así como ensayos de qRT-PCR demostraron que la expresión del gen *algD* se incrementó al menos 5 veces mientras que la expresión del gen *alg8* y *algL* se incrementó solo 2.6 veces con respecto a la cepa silvestre AEIV (datos no publicados).

Tabla 3. Producción específica de alginato por cepas de *A. vinelandii*

Cepa	Genotipo	Alginato <sup>a</sup>
E	Silvestre	1560 ± 18
GG9	<i>mucG</i> -miniTn5	2800 ± 187
GG9R	<i>mucG</i> -miniTn5 reconstruida	2900 ± 305
JGA501	<i>mucG::Km</i>	2690 ± 311

<sup>a</sup> µg de alginato mg de proteína<sup>-1</sup>. El tiempo de cultivo fue de 48 h en medio líquido BS. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Se muestra la media de los tres experimentos independientes.



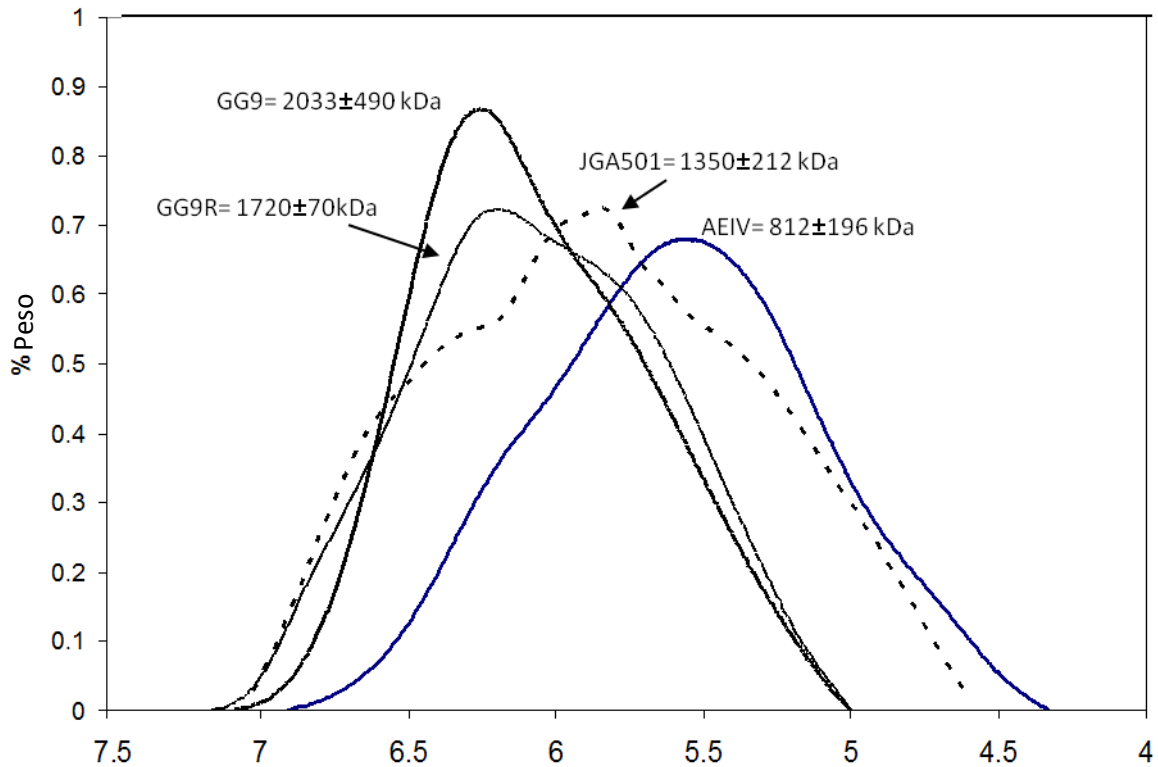


Figura 10. Distribución de pesos moleculares de los alginatos producidos por distintas cepas de *A. vinelandii*. Se indica además el PMP del alginato producido (datos no publicados)

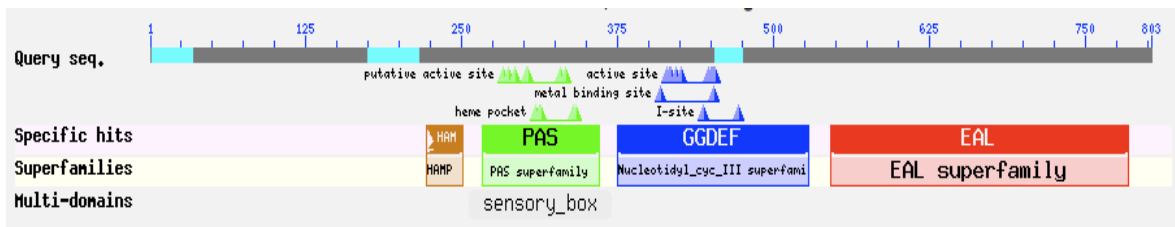


Figura 11. Representación esquemática de los dominios de la proteína MucG. Imagen tomada de la página web NCBI

Estos resultados nos indican que la proteína MucG afecta negativamente el proceso de biosíntesis de alginato, así como también el PM del alginato producido. Una de las posibilidades para explicar estos resultados es un efecto a nivel transcripcional de MucG, sobre los genes biosintéticos *alg*, mediada por c-di-GMP. Por otro lado, el proceso de biosíntesis de alginato se ha clasificado dentro de los sistemas de secreción de exopolisacárido que dependen de una sintasa y se ha propuesto que estos sistemas están regulados a nivel post-traducciona por el c-di-GMP (Whitney y Howell, 2013).

Debido a que la ausencia de MucG aumenta la producción de alginato es posible que la actividad fosfodiesterasa del dominio EAL de MucG reduzca los niveles de c-di-GMP de tal manera que afecta la actividad del complejo de polimerización Alg8-Alg44. No descartamos que el dominio GGDEF de MucG sea un dominio activo, dado que tiene conservados los aminoácidos del sitio catalítico; muy probablemente este dominio se active en otras condiciones como ya se ha descrito para otras proteínas bifuncionales.

### **3. HIPÓTESIS**

MucG tiene un efecto negativo en la síntesis de alginato y en su PM, debido a su actividad fosfodiesterasa (del dominio EAL) lo cual afecta negativamente la actividad del complejo alginato polimerasa Alg8-Alg44. En MucG el dominio PAS modula las actividades de DGC y PDE en respuesta al oxígeno, lo que afecta el PM del alginato sintetizado.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

Estudiar el papel de la proteína señalizadora MucG en la producción de alginato y en la determinación de su PM.

#### **4.2 Particulares**

1. Estudiar la función del dominio de fosfodiesterasa EAL de la proteína MucG en la producción de alginato y en su PM.
2. Determinar si la proteína MucG controla el PM del alginato en respuesta al oxígeno.
3. Investigar el efecto de la proteína MucG sobre la actividad alginato-liasas.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Microorganismos

Se trabajó con las cepas que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	Descripción o secuencia	Referencia
Cepas		
<i>A. vinelandii</i>		
AEIV	Cepa silvestre. Na <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
GG9	<i>mucG</i> ::Tn5 derivada de la AEIV. Fenotipo hipermucoide Sp <sup>r</sup>	Banco de mutantes del laboratorio
JG501	porta la mutación <i>mucG</i> ::Km, fenotipo hipermucoide. Km <sup>r</sup>	Banco de mutantes del laboratorio
AealgU	porta una mutación <i>algU</i> ::Km No produce alginato. Km <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
CLAM01	Porta la mutación <i>mucG</i> <sup>AAA</sup> -Sp (E575A y L577A) Fenotipo hipermucoide. Sp <sup>r</sup>	Construida en este trabajo
CLAM02	Porta la mutación <i>mucG</i> DEAL-Sp. mediante un cambio del codón que codifica para la H532 (CAC) por un codón de paro (TGA). Fenotipo hipermucoide. Sp <sup>r</sup>	Construida en este trabajo
CLAM03	Porta la inserción casete de Sp entre los genes <i>mucG</i> y <i>xseB1</i> ( <i>mucG</i> <sup>EAL</sup> ) Cepa control Sp <sup>r</sup>	Construida en este trabajo
<i>E. coli</i> TOP 10	Sm <sup>r</sup> . Cepa para clonación	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	Sp <sup>r</sup> . Cepa para conjugación	Simon <i>et. al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> DH5α	Na <sup>r</sup> . Cepa para conjugación y transformación	Hanahan, 1983
Plásmidos		
pJET- <i>mucG</i>	Ap <sup>r</sup> , fragmento de 3.2 kb, portador del gen <i>mucG</i> completo, en el plásmido pJET.	Colección del laboratorio
pLA01	Ap <sup>r</sup> , eliminación del fragmento <i>Xba</i> I – <i>Pvu</i> II de 1.5 kb, derivado del pJET- <i>mucG</i> .	Construido en este trabajo

pLA02	Ap <sup>r</sup> , derivado del pLA01. Porta mutación mucGAAA	Construido en este trabajo
pJG103	Ap <sup>r</sup> , derivado del pLA01. Porta inserción del casete de Sp en el sitio de corte <i>AhdI</i> río abajo de <i>mucG</i> .	Construido en este trabajo
pJG105	Ap <sup>r</sup> , derivado del pLA02. Porta inserción del casete de Sp en el sitio de corte <i>AhdI</i> río abajo de <i>mucG</i> .	Construido en este trabajo
pJQ200	Gm <sup>r</sup> . Origen de transferencia del vector RP4, <i>sacB</i> para selección positiva de dobles recombinantes, <i>lacZ</i> para identificación de clonas.	Quandt y Hynes, 1993
pJQ02	Inserción del fragmento <i>BglII</i> de pLA02 en el sitio <i>BamHI</i> del plásmido pJQ200	Construido en este trabajo
pLA03	Apr <sup>r</sup> . Porta un fragmento de 700 pb de los genes <i>xseB-1</i> y <i>ispA-1</i> en plásmido pJET.	Construido en este trabajo
pLA03Sp	Ap <sup>r</sup> y Sp <sup>r</sup> . Derivado del pLA03.; porta casete de Sp en el sitio de corte <i>BamHI</i> junto al sitio de corte <i>AhdI</i> .	Construido en este trabajo
pLA0200	Ap <sup>r</sup> y Sp <sup>r</sup> . Derivado de los plásmidos pLA02 y pLA03Sp. Porta una extensión de 700 pb río debajo de <i>mucG</i> .	Construido en este trabajo
pLA0201	Ap <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> . Derivado del pLA0200. Porta un casete de Sp en el sitio de corte <i>BamHI</i>	Construido en este trabajo
pLA0202	Ap <sup>r</sup> , derivado del pLA0200. Porta el gen <i>mucG</i> trunco en la región del dominio EAL.	Construido en este trabajo
pLA0203	Ap <sup>r</sup> . Derivado del pLA0202. Porta inserción de un casete de Sp <sup>r</sup> en el sitio de corte <i>BamHI</i> del plásmido pLA0202.	Construido en este trabajo

---

Oligonucleótidos (5' -> 3')

---

AAA-F	GCCCAGGTCGACGACCAGGGCCGTCGCGAGGTCATGGCGGCCGCGCTGCGCTGGCACTC GCCGACCCGCGGACTGGT
AAA-R	ACCAGTCCGCGGGTCGGCGAGTGCCAGCGCAGCGCGGCCGCCATGACCTGCGGACGGCC CTGGTCGTGACCTGGGC

mucG1-R	CCGTTCTCTTCGAGGATG
GG9-RT – F	CAACCGCCACTATCTGGTC
mucG1 – R	CCGTTCTCTTCGAGGATG
ispA1 – R	CGAAGGCCAGCGCCTGCAGGCCGTC
xseB1AhBm – F	GGACCGTTCGTCCGGATCCAGGGTCTGCCGGCGTTC
XseBAh – F	GGACCGTTCGTCCGGATC
G-DEAL	CTCGCCGAGCGGTCAGCTGTAGACGGC
mucG5? – F	TGCGCAAATCCCTGCCACTG
SpFlank – F	GCCCTACACAAATTGGGAG
xseB1 – RT – R	GATCTGCACCTTCTGTTCGG
SpFlank – R	CGTTTCCACGGTGTGCGTCA
RpoS – 5	GAT TTG TCG CAG AGT ATC G
RpoS – 6	GAC AGC GAT CGA GGC CGT TC

## 5.2 Condiciones de cultivo

Las cepas de *A. vinelandii* se preservaron en cajas de medio Burk-Sacarosa (BS) con el respectivo antibiótico. La concentración del antibiótico utilizado fue de 1 µg/ml de Km, 1 µg/ml de Gm, 50 µg/ml de Sp y 30 µg/ml de Nal. Se realizaron resiembras periódicas para la obtención de cajas frescas antes de cada experimento y se mantuvieron a 4 °C. La composición del medio se muestra en la tabla 5.

Para la preparación del medio sólido se agregó agar al 1.5% y este se esterilizó junto con el agua a utilizar. Todas las soluciones se esterilizan a 120 °C durante 21 min excepto el FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, el cual es filtrado para evitar una rápida oxidación del hierro.

Ambos medios, sólido y líquido, se incubaron a 30 °C durante 48 h. El medio líquido se incubó con una agitación de 200 rpm con un diámetro orbital de 2.5 cm.

El medio de competencia de *A. vinelandii* (CM) contiene todas las sales de la tabla 5 a la concentración indicada, con excepción de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo de *A. vinelandii*

Reactivo	Concentración en g/L
Sacarosa	20
Amortiguador fosfatos (pH=7.2)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.073
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.183
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.160
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0002
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.005

El medio para cruzas *A. vinelandii*/*E. coli* está compuesto por 250 ml de medio BS, 70 ml de medio LB y se agregó glucosa a una concentración final de 0.2%. Se utilizaron 3.2 ml de glucosa 20% por cada 320 ml de medio para cruzas.

El medio Burk-Glucosa contiene como fuente de carbono glucosa, 20 g/L, en lugar de sacarosa, los demás componentes son los mismos que se indican en la tabla 5 a la misma concentración

*E. coli* se cultivó en medio Luria (LB) con el antibiótico correspondiente. La concentración del antibiótico utilizado para los diferentes antibióticos fue de 200 µg/ml de Ap, 10 µg/ml de Gm, 15 µg/ml de Nal, 100 µg/ml de Sp y 10 µg/ml de Sm. La composición del medio LB se muestra en la siguiente tabla 6.

Tabla 6. Composición del medio LB de *E. coli*.

Reactivo	Concentración en g/L
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
Agua destilada	1000 ml

Las cajas de LB se incubaron a 37 °C y en caso de medio líquido se agitó a 200 rpm.

### 5.3 Preinóculos

Los preinóculos se prepararon transfiriendo una asada de una caja fresca a 25 ml de medio BS líquido en un matraz de 125 ml. Se incubó a 30 °C durante 18 h con agitación

de 200 rpm. Estos se utilizaron para inocular matraces de 250 ml con 50 ml de BS líquido, para cuantificar la producción de alginato por el método de carbazol que se explica más adelante. Estos matraces se incubaron en las mismas condiciones que los preinóculos. Se cuantificó la cantidad de proteína de los preinóculos a las 18 h con la finalidad de inocular los matraces de 250 ml con la misma cantidad de proteína (350 µg/ml; esta cantidad de proteína corresponde, aproximadamente, a una inoculación al 2 % v/v cuando se utiliza la cepa silvestre AEIV). Estos matraces se utilizaron para realizar los experimentos.

Para el experimento de determinación del PM se utilizaron preinóculos en matraces de 250 ml con un volumen de 50 ml de BS. La proteína se cuantificó a las 18 h para inocular todos los matraces con la misma cantidad de proteína. Se utilizó 1 ml para el cultivo de 50 ml, 2 ml para el de 100 ml y 4 ml para el cultivo de 200 ml, todos estos correspondientes a la cepa silvestre AEIV, para los cultivos de la cepa mutante se determinó el volumen necesario para inocular los matraces con la misma concentración de proteína que la cepa silvestre. Estos matraces se incubaron durante 48 h a 30 °C a 200 rpm.

#### **5.4 Preparación de células competentes de *A. vinelandii***

Se cultivó la cepa AEIV 2 veces en cajas con medio de competencia (CM) incubando la caja a 30 °C durante 48 h. Todas las células se recolectaron y se utilizaron para inocular 50 ml de CM líquido y se incubó a 30 °C por 48 h a 200 rpm. Después de los dos días de incubación se recuperaron las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 min y fueron lavadas con sulfato de magnesio 10 mM para dejarlas libres de alginato. Estas células se resuspendieron en 1 ml de CM líquido 32 mM Mg<sup>+2</sup>. La competencia se mantiene durante 15 días cuando se guardan en refrigeración.

Además de la metodología descrita en el párrafo anterior se utilizó una metodología diferente para la preparación de células competentes de *A. vinelandii*. De acuerdo a Page y Sadoff, 1976, la máxima competencia de *A. vinelandii* se encuentra en las 6 y 12 horas de cultivo, por lo cual, se realizó un cultivo de la cepa AEIV en cajas con medio CM incubando la caja a 30 °C durante 24 o 48 h. Después de las 48 h se realizó un segundo pase en medio CM y se incubó a 30 °C pero en esta ocasión el tiempo de incubación fue de aproximadamente 15 h. Posteriormente se recogió todo el tapete de células con un asa estéril y se lavaron las células en varias ocasiones en sulfato de magnesio 10 mM con la finalidad de obtener una pastilla celular libre de alginato. Dado que el tiempo de incubación es poco, fue necesario recuperar el cultivo a partir de 4 cajas. Las células libres de alginato obtenidas de estas 4 cajas se resuspendieron en 350 µl de CM 16 mM de Mg<sup>+2</sup>. Estas células competentes se utilizaron siempre después de su preparación.

#### **5.5 Transformación de *A. vinelandii***

Se transformó *A. vinelandii* con ~5 µg de plásmido lineal, mezclando las células competentes (100 µl) con el ADN en un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril. Se colocó la mezcla, células – ADN, sobre medio CM sólido y se extendió con la punta de la micropipeta hasta cubrir una superficie de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>. Se incubó esta caja



24 h a 30 °C y posteriormente recolectaron las células en medio BS, en ocasiones se empleó NaCl 0.9 %, y por último se plateo un volumen entre 50 µl – 100 µl en medio de selección para obtener la mutante, esta caja se incubó a las mismas condiciones anteriormente descritas.

### **5.6 Preparación de células competentes de *E. coli***

La preparación de células competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) se inició con el pase de una colonia aislada en placa a una segunda placa, esta se cultivó por un tiempo de 16 – 20 h a 37 °C. De esta caja se inoculó 5 ml de LB líquido con antibiótico estreptomina y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa. Posteriormente se inoculó 100 ml de LB con 1 ml del cultivo previo, y se incubó por aproximadamente 3 h a 37 °C y 200 rpm hasta que la D.O. a 650 nm alcanzó el rango 0.4 – 0.5. Se transfirió el cultivo a tubos de propileno previamente enfriados y se dejó reposar 10 min en hielo. Estos tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron las células en 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y se dejó reposar 15 min en hielo. Se centrifugó por segunda ocasión a las mismas condiciones descritas anteriormente y se resuspendió suavemente la pastilla celular empleando 2 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y 14% de glicerol por cada 50 ml de cultivo original. Por último se alicuotó 0.4 ml por tubo Eppendorf de 1 ml y se almacenaron a -70 °C.

### **5.7 Transformación de células competentes de *E. coli***

Se mezcló 100 ng de ADN con 0.2 ml de células competentes y se dejaron en hielo durante 30 min. Se dio un choque térmico de 2 min a 42 °C y se incubó la mezcla a 37 °C y 200 rpm en 1 ml de LB líquido sin antibiótico durante 1 h. Por último se plateó un volumen de 50 µl de este cultivo en el medio de selección. De manera simultánea se corrió el control negativo, el cual consistió en someter a todo el proceso células competentes sin mezclarlas con ADN.

### **5.8 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli***

Para la preparación de células electrocompetentes de la cepa *E. coli* S17-1 se recogieron células de un cultivo líquido a una DO entre 0.5 – 0.8 centrifugando a 4 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se lavaron las células con un volumen de NaCl 0.89%, se resuspendieron en 20 ml de agua helada con glicerol al 10% y se centrifugaron de nuevo con las condiciones anteriormente mencionadas. La pastilla celular se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10% previamente enfriado y se alicuotó 90 µl de esta suspensión en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -70 °C.

### **5.9 Electroporación de *E. coli***

Para realizar la electroporación las celdas a utilizar se colocaron en hielo y las células se descongelaron lentamente en hielo. En tubos Eppendorf de 1.5 µl se mezclaron 40 µl de la suspensión celular con un volumen que contenía de 20 a 80 ng de plásmido en agua. Se transfirió la mezcla de células y ADN a las celdas evitando la formación de burbujas y se le dio un pulso 1.8 Kv en un *E. coli* Pulser™ Transformation Apparatus de marca Bio-

Rad. Inmediatamente se adicionó 1 ml de medio SOC a la celda, se transfirió a un tubo para la incubación a 37 °C a 200 rpm para la recuperación de las células. Al cabo del tiempo de recuperación se plateó un volumen de 50 µl en medio LB con el antibiótico correspondiente para la selección de electrotransformantes.

### **5.10 Conjugación de cepas AEIV y *E. coli* S17-1**

Para la realización de la conjugación se utilizó medio Burk-Glucosa (BG). Se inocularon 50 ml de medio BS con la cepa de *A. vinelandii* en cuestión y se incubaron durante 2 días a 30 °C y 200 rpm. Al día siguiente se cultivó la cepa de *E. coli* (S17-1), con el antibiótico correspondiente, y se incubó toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Una vez listos los cultivos se recogieron células de *A. vinelandii* y S17-1 por centrifugación a 3 000 rpm a 4°C. Las células de *A. vinelandii* se lavaron con un volumen de MgSO<sub>4</sub> y la cepa S17-1 con NaCl 0.89%. Se mezclaron las células en una proporción 1:1 y se extendió la solución de células en medio para la cruce *A. vinelandii*/*E. coli*. Se secó en la campana y se incubó a 30 °C durante 24 h. Al cabo de las 24 h se levantó el tapete de células y se lavó con NaCl 0.89%. Por último se resuspendieron las células en 700 µl de BS y se platearon de 100 a 200 µl en medio de selección.

El medio de selección consistió en medio BG con el antibiótico Gm a concentraciones de 0.5 y 1 µg/ml.

### **5.11 Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción utilizadas fueron: *Bam*HI, *Xba*I, *Pvu*I, *Bgl*II, *Sal*I, *Sac*II, *Ahd*I, *Sph*I, *Pst*I, *Not*I y *Cla*I, y se siguieron las instrucciones del fabricante (Fermentas).

Se realizaron diluciones 1:10 de la enzima así como del buffer correspondiente y el volumen de reacción fue variable; la cantidad de ADN utilizado varió entre 20 – 50 µg. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C durante 1 h 30 min y en ocasiones se dejó toda la noche sin observarse efecto estrella por parte de alguna de las enzimas utilizadas.

Para las digestiones parciales se hizo una dilución 1:40 de la enzima *Pvu*I y 1:30 de la enzima *Ahd*I, y se realizaron 6 ensayos con volumen de reacción de 25 µl para *Ahd*I y 30 µl para *Pvu*I. La cantidad de ADN se mantuvo constante durante los 6 ensayos y solo se varió la cantidad de la enzima utilizada, desde 1 µl hasta 6 µl. Estas reacciones se incubaron de 3 – 10 min, con el objetivo de no permitir una digestión completa del ADN en todos sus sitios de restricción.

### **5.12 Reacción de ligación**

Para las reacciones de ligación se utilizó la T4 ADN ligasa (Fermentas). En las reacciones de ligación de vector-fragmento, se utilizaron 50 ng del vector desfosforilado y 250 ng del fragmento a ligar.

La desfosforilación del vector se realizó con la fosfatasa alcalina de camarón (Roche). La desfosforilación del vector se llevó a cabo por la mezcla de ~50 ng de vector lineal con la fosfatasa alcalina en su buffer de reacción y posterior incubación a 37 °C por 10 min. Se inactivó la enzima a 65 °C durante 15 min.

Para las ligaciones con extremos cohesivos (sticky-end) se empleó un volumen final de 20 µl con 1 µl de T4 ADN ligasa. Esta mezcla de reacción se incubó a 22 °C durante 5 min y en ocasiones se dejó toda la noche.

Para las ligaciones en las que se involucraron extremos romos fue necesario rellenar los extremos cohesivos existentes, para ello se adicionó la ADN blunting enzyme (Fermentas) previo a la ligación. La mezcla de ADN con ADN blunting enzyme se incubó a 70 °C durante 5 min y se pasó a hielo. Por último, se adicionó el fragmento de ADN con extremos romos a ligar así como la T4 ADN ligasa y se incubó a 22 °C por 5 min y en ocasiones se dejó toda la noche.

Para la inserción de los oligonucleótidos AAA – F y AAA – R se realizó una mezcla de 100 pmol de cada uno en el buffer de reacción tango y se calentaron a 95 °C durante 5 min. Posteriormente se dejó enfriar la mezcla de oligonucleótidos hasta alcanzar la temperatura ambiente, de esta manera se permitió el apareamiento de los oligonucleótidos y se realizaron las digestiones con las enzimas *SaI* y *SacI*. Por último se ligó el vector (banda de 4.7 kb) desfosforilado con esta mezcla de oligos digeridos por *SaI* y *SacI* utilizando las condiciones previamente descritas.

El producto de estas ligaciones se utilizó para transformar *E. coli*.

### **5.13 Reacción de PCR**

Se utilizaron las enzimas de alta fidelidad KAPA Taq ADN polymerase de biosystems y la enzima Phusion High-Fidelity ADN Polymerase (Thermo Scientific). Estas enzimas fueron utilizadas siguiendo los parámetros establecidos dentro de los protocolos de cada una de estas enzimas.

Para realizar los PCR de colonia se utilizó la *Taq* ADN Polymerase (recombinante) de Thermo Scientific. El ADN molde para la reacción de PCR se obtuvo por lisado celular, una asada de una caja fresca se resuspendió en 20 µl de agua miliQ y se incubó a 95 °C durante 20 min, posteriormente se centrifugó 10 min a 13000 rpm para separar los restos celulares del sobrenadante. Se tomaron 2 µl de este sobrenadante para una reacción de PCR de 25 µl de volumen de reacción. Los demás componentes se utilizaron de acuerdo a los parámetros establecidos en el protocolo de la *Taq* ADN Polymerase (recombinante) de Thermo Scientific.

El fragmento de 700 pb para la construcción del plásmido pJET700 se amplificó con los oligonucleótidos ispA1 – R y xseB1AhBm – F utilizando la enzima de alta fidelidad KAPA Taq ADN polymerase y como templado el ADN cromosomal de la cepa AEIV.

El plásmido pLA0202 se obtuvo mediante reacción de PCR. Para ello se diseñó un oligonucleótido (G-DEAL) de 27 pb con un codón de paro (TGA) de la traducción

localizado en el centro del mismo para poder permitir el apareamiento del oligonucleótido. Se utilizó como templado el plásmido pLA0200, linearizado con la enzima de restricción *SphI*, y la enzima de alta fidelidad Phusion High-Fidelity ADN Polymerase de Thermo Scientific.

#### **5.14 Cuantificación específica de alginato por el método del carbazol**

Se incubaron los matraces de 250 ml con un volumen de 50 ml de BS durante 48 h a 30 °C y 200 rpm, se inocularon como se describió en la sección 5.3. Después de las 48 h se tomaron 3 ml del cultivo y se vertieron en un tubo Eppendorf de 5 ml, posteriormente se adicionaron 250 µl de EDTA 0.1 M y 250 µl de NaCl 1M para separar por completo el alginato de las células. Se centrifugó a 10,000 rpm y se separó el sobrenadante del paquete celular, el cual se conservó para cuantificar la cantidad de proteína por el método de Lowry. El sobrenadante se pasó a un tubo falcón de 15 ml y se precipitó el alginato adicionando 2 volúmenes de isopropanol. Una vez precipitado el alginato se centrifugó a 7,000 rpm para separar todo el sobrenadante; y decantado el sobrenadante los tubos se dejaron reposar dentro de la campana de extracción hasta llegar a total sequedad. Una vez seco el alginato se resuspendió en un volumen conocido y se sometió a la reacción del carbazol descrita previamente (Knutson y Jeanes, 1968).

La curva estándar para la cuantificación se realizó de la siguiente manera. De una solución de 1 mg/ml de alginato se tomaron volúmenes de 5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl y 120 µl, estos se llevaron a un volumen final de 200 µl en tubos Eppendorf de 1.5 ml. De esta manera tenemos una curva que va desde los 5 µg de alginato hasta los 120 µg de alginato. Para las muestras fue necesario resuspender el alginato en un volumen suficiente de agua, hasta observar una solución transparente y tomar una alícuota que no pase de los 200 µl, por ejemplo, tomar un volumen de 100 µl de la muestra problema y llevar a un volumen final de 200 µl con agua tal y como se hizo con la curva estándar. Se introdujeron todos los tubos Eppendorf en hielo y se adicionó lentamente y con mucho cuidado 1 ml de la solución ácido sulfúrico-boratos fría. Por último se adicionaron 200 µl del reactivo carbazol con el cuidado de no mezclar mucho los reactivos. Una vez adicionados todos los reactivos se mezclan vigorosamente con un vortex por 5 segundos y se introdujeron en un baño a 55 °C durante 30 min en un termoblock.

Al cabo de los 30 min los tubos se sacaron del baño a 55 °C, se pasaron por el vortex nuevamente y se dejaron enfriar. La absorbancia se midió a 530 nm y se reportó la producción específica de alginato en unidades de mg de alginato/ mg de proteína o µg de alginato/mg de proteína.

La solución de ácido sulfúrico-boratos se preparó de la siguiente manera. Se vertieron 24.7 g de ácido bórico en 30 ml de agua con poca agitación y se calentó suavemente (<90 °C), el ácido bórico no se disolvió en el agua hasta que se añadieron 10.09 g de KOH. Aquí se tuvo mucho cuidado porque la solución se calentó mucho, pero es el punto en donde se disolvieron todos los boratos. Por último se llevó la solución a un volumen final de 45 ml. Esta solución se enfrió un poco sin permitir la precipitación de los boratos. Por último se mezclaron cuidadosamente 975 ml de ácido sulfúrico concentrado con 25 ml de esta solución de boratos, esto se hizo lentamente porque la solución de boratos estaba caliente, por lo tanto se recomienda que el ácido sulfúrico este frío.

El carbazol se disuelve en etanol absoluto. La cantidad requerida en este ensayo es de 0.1 g de carbazol en 100 ml de etanol absoluto.

### **5.15 Determinación del PM del alginato**

El PM del alginato se determinó por cromatografía de permeación en gel utilizando unas columnas Ultrahydrogel (UG 500 y 2000, Waters), utilizando un HPLC con un detector denominado refractómetro diferencial (Waters, 410) tal y como se describió previamente (Peña *et. al.*, 1997).

Para este experimento se utilizaron 15 ml de cultivo, se lavaron las células con 1.5 ml de EDTA y 1.5 ml de NaCl como se mencionó en el apartado anterior. El alginato precipitado con isopropanol se pasó a tubos Eppendorf de 2 ml para liofilizarlos, una vez secos se pesaron alrededor de 6 mg para disolverlos en 2 ml de agua miliQ con el objetivo de tener una solución de alginato a 3 mg/ml. Esta solución se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  y se utilizó para inyectar el HPLC.

Las condiciones de corrida fueron las siguientes. La fase móvil es  $\text{NaNO}_3$  0.1 M con un flujo de 0.9 ml/min y una temperatura de 39 °C. Se inyectaron 100  $\mu\text{l}$  de las muestras y se elaboró una curva estándar utilizando pullulanos de *Aureobasidium pullulans*.

### **5.16 Proteoma de las cepas AEIV y GG9**

La preparación de las muestras para el análisis proteómico se llevó a cabo de la siguiente manera. Se inoculó un matraz de 500 ml a partir de un preinóculo de 18 h; el volumen de llenado del matraz fue de 200 ml de BS para la cepa GG9 el cual se inoculó con 6 ml del preinóculo. Para la cepa silvestre se utilizó 100 ml y se inoculó con 3 ml del preinóculo. Este se dejó incubar durante 24 horas a 30 °C y a 200 rpm.

Después de las 24 horas se obtuvieron las pastillas celulares de todo el contenido del matraz, por centrifugación a 2,500 rpm y se lavaron con un buffer de fosfatos 10 mM y pH de 7.4, este buffer se filtró a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  antes de utilizarse. Se realizaron varios lavados para retirar el alginato por completo de las células. Una vez obtenida la pastilla celular se mantuvo a -20 °C por un tiempo de 24 horas. Posteriormente se resuspendió en 2 ml de buffer de fosfatos 10 mM, pH 7.4 y se sonicó. La sonicación se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 5 ml y sumergidos en hielo para evitar el calentamiento del extracto. Se dieron 5 pulsos de 20 segundos a potencia de 8 dejando transcurrir 20 segundos entre cada pulso para evitar el calentamiento de la muestra y evitar la oxidación de las proteínas. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 min a 13,000 rpm a 4 °C, se tomó el sobrenadante con mucho cuidado de no tomar restos celulares y se ultracentrifugó a 40,000 rpm a 4 °C por una hora, de esta manera en el sobrenadante permanece la fracción soluble del extracto proteico. Se cuantificó la cantidad de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford y se precipitó con acetona fría el volumen correspondiente a 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada extracto proteico durante toda la noche. Por último se dejaron secar las muestras para retirar la acetona a temperatura ambiente y una vez secas se enviaron para su análisis por Orbitrap a la

Plataforma de Proteómica del Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal (IRCM), Canadá. Este experimento se realizó por triplicado.

Para analizar los datos obtenidos del orbitrap se utilizó el proteome software Scaffold versión 4.0. En este software se realizó un análisis estadístico t-student con el cual se identificaron a las proteínas que mostraron un cambio de expresión al comparar los proteomas de las cepas GG9 y AEIV.

### **5.17 Determinación de la actividad alginato liasa**

Se determinó la actividad liasa intracelular y extracelular por un ensayo espectrofotométrico reportado anteriormente (Flores *et. al.* 2013). Se utilizaron 0.25 ml del extracto problema y 0.25 ml de una solución de alginato (Sigma-Aldrich A2158) 2 mg/ml, en un buffer de Tris-HCl 50 mM y pH 7.2. Se monitoreó el incremento de absorbancia a 235 nm durante 20 min, tomando lecturas cada min, a 29 °C. La actividad específica se define como el cambio de absorbancia por min por mg de proteína.

Para la obtención de los extractos se cultivaron las cepas en medio BS líquido durante 48 h. Se adicionó 1ml de EDTA 0.1 M y 1ml de NaCl por cada 10 ml de caldo de cultivo y se centrifugó a 11,000 rpm a 4 °C por 10 min. Se separó el paquete celular del sobrenadante y se utilizaron para hacer los extractos intracelulares y extracelulares, respectivamente.

Para obtener el extracto proteico intracelular se siguió el protocolo previamente reportado (Franklin y Ohman, 2002). En breve, las células se lavaron con NaCl 0.9% y se resuspendieron en 700 µl de buffer de extracción periplásmica (PEB, por sus siglas en inglés), el cual contiene sacarosa al 20% y Tris-HCl 30 mM a pH 8. Se agregaron 50 µl de lisozima, y se incubó a temperatura ambiente 10 min. Se adicionó 20 µl de EDTA (100 mM en buffer PEB) y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Se separó el resto celular por centrifugación a 13,000 rpm a 4 °C durante 25 min. El extracto obtenido se cuantificó por el método de Bradford.

Para la obtención del extracto proteico extracelular se siguió un protocolo reportado anteriormente (Flores *et. al.* 2013). Se separó el alginato del sobrenadante por precipitación con CaCl<sub>2</sub>, se adicionaron 3 ml de CaCl<sub>2</sub> por cada 10 ml de sobrenadante. Esta mezcla se mantuvo a 4 °C por un tiempo mínimo de 4 h. Posteriormente se ultracentrifugó a 40,000 rpm a 4°C por 10 min. Por último este extracto se pasó por tubos Amicon de 0.5 ml con un filtro de 10K para la eliminación de los restos de Ca<sup>+2</sup> y se cuantificó la proteína por el método de Bradford.

Ambos extractos se pasaron por tubos Amicon con el objetivo de realizar un intercambio de buffer. Se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por 10 min en 3 ocasiones y se rellenaban con un buffer de Tris-HCl 50 mM a pH 7.2 y NaCl 350 mM.

Se utilizaron para este ensayo las cepas AEIV, GG9 y AEalgU, y una alginato liasa comercial de Sigma-Aldrich como control positivo (en Tris-HCl 20 mM, pH 7.2), realizando

ensayos a diferentes concentraciones. El blanco utilizado fue el extracto proteico más el buffer sin alginato.

### **5.18 Determinación del porcentaje de acetilación del alginato**

Para la determinación de los grupos acetilo (Cheetham y Punrucckvong, 1985), se precipitó el alginato con isopropanol, en una relación de 1 volumen de sobrenadante, libre de células, con 3 volúmenes de isopropanol. Esta mezcla se mantuvo en el cuarto frío a 4 °C por un tiempo mínimo de 4 h. Para recuperar el alginato se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min. Se pasó el alginato a un tubo Eppendorf de 2 ml, previamente llevado a peso constante, y se secó en un concentrador plus (vacufuge plus) a 65 °C por un periodo de 2 a 3 h. Posteriormente se determinó la cantidad de alginato obtenido y se utilizaron de 5 a 10 mg para la determinación de acetilos. Se llevó a cabo una reacción de hidrólisis con NaOH 1 M a 80 °C durante 2 h en un termomixer a 700 rpm. Posteriormente se neutralizó la sosa con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 M, se centrifugó la mezcla para evitar sólidos suspendidos y cargar la muestra en el HPLC.

En el HPLC se utilizó una columna de intercambio iónico (Aminex HPX-87H, 300 mm x 7.8 mm), con un detector de arreglo de diodos, una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 mM la cual debe de filtrarse por una membrana de 0.22 µm, una temperatura de 50 °C, un volumen de inyección de 40 µl, flujo de 0.65 ml/min con lecturas a 210 nm y un tiempo de corrida de 17 min con la lectura de los acetilos alrededor de los 13 min. Se cargó acetato de amonio a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva estándar, las concentraciones utilizadas fueron, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM y 10 mM.

El porcentaje de acetilación se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acetilación} = \frac{\text{gr de acetilos}}{\text{gr de alginato}}$$

### **5.19 Determinación de proteínas por el método de Bradford**

Se tomaron 10 µl de los extractos intracelulares y se adicionaron 790 µl de agua miliQ. De los extractos extracelulares se tomaron 50 µl y se añadió 750 µl de agua miliQ. El volumen final fue de 800 µl y se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio – Rad protein assay dye reagent concentrate), las muestras se dejaron reposar 20 min. Al mismo tiempo se elaboró una curva patrón con albúmina a distintas concentraciones; se utilizaron concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32 µg/µl. Posteriormente se tomaron lecturas a 595 nm utilizando un nanodrop. Los valores de la cantidad de proteína de los extractos se obtuvieron por interpolación en la curva patrón (Bradford, 1976).

## 5.20 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Se utilizó esta metodología cuando se requirió determinar la proteína directamente de células. Después de obtener el paquete celular tal y como se describió en la sección 5.15, este se resuspendió en un volumen de 3 ml, se tomaron 50  $\mu$ l y se llevaron a un volumen final de 200  $\mu$ l con agua. Posteriormente se adicionó 1 ml de solución reactiva, la cual está compuesta por un 98% v/v de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1 M, 1% v/v de tartrato de sodio y potasio al 2% y 1% v/v de  $\text{CuSO}_4$  al 1%, se dejó reposar por 10 min y al cabo de este tiempo se adicionaron 100  $\mu$ l del reactivo de Folin-Ciocalteu, adquirido de Sigma-Aldrich, diluido con 1 volumen de agua y se dejaron reposar por 30 min. De la misma manera se realizó una curva estándar con una solución de albúmina de 1 mg/ml de concentración. Las concentraciones utilizadas para la curva patrón fueron 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml y 400  $\mu$ g/ml todas ellas en un volumen final de 200  $\mu$ l. Al término de los 30 min se midió la absorbancia a 625 nm y con la ayuda de la curva patrón se determinó la concentración de proteína en las muestras (Lowry *et. al.*, 1951).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis del dominio PDE de la proteína MucG

Un análisis de la proteína MucG nos indicó que el dominio PDE tiene un alto grado de conservación con otros dominios PDE ya caracterizados ( $E= 6.01 \times 10^{-91}$ ), de acuerdo a la predicción de dominios conservados (CDD) del NCBI. Además el alineamiento de la proteína MucG con otros dominios ya caracterizados como el de DosC (una PDE de *E. coli*) nos permitió identificar que los residuos conservados en la vecindad también están presentes (figura 12).

```
1 -----EEALREALENGESLSLYFQPIVDLRTGKVLGY 31
505 ISYDLGK-NRDYLLSTAHNAMDYIRKNGGNGWQFFSPAMNEMVKERLVLGAALKEAISNNQLKLVYQPQIFAETGELYGI 583
496 IANCDGQgDATDLLKQADLALYAAKDAGRNRRLAVYSHPLGEAAEHRLQLEHELRRALDLREFTLHYQAQVD-DQGRPQVM 574

* * * * *
32 EALLRWQHFDGGLISPDEFPLPLAERLGLIAELDRWVLEKALALAEWLNPDL---PLSVNLSPASLLDPSFLEALL-ALK 107
584 EALARWHDPLHGHVPPSRFIPLAEEIGE IENIGRWVIAEACRQLAEWRSQNIHIpALSVNLSALHFRSNQLPNQVSDAMH 663
575 EALLRWHSPTRGLVLPGEFIPVLEESGMIIEATRWFVREACRQARRWAGQGHAL-RIAVNLSPLDFRQADLAGSLLAILE 653

* * * * *
108 QGGLPPSRLVLEITESALDE-DLRLLEALARLRS LGFRALDDFGTGYSSL SLLSRLPPDYIKIDRSFIKD-LSDPESRA 185
664 AWGIDGHQLTVEITESMMEHDTEIFKRIQILRDMGVGLSVDDFGTGFSGLSRLVSLPVTEIKIDKSFVDRCLTEKRILA 743
654 EERPPTGSLELEITETALLDAGDDVQQTILARLKAAGMPLLLDDFGTGHASLAYLQQFPFDGIKIDRFVAGLPESEHVA 733

*
186 LLRALIALARSLGIKVVAEVETEEQLELLKELGIDYVQGYLFSKP----- 231
744 LLEAITSIGQSLNLTVVAEGVETKEQFEMLRKIHCRCVIQGYFFSRPLPAEE IPGWMSSVLPLKI 807
734 LVRGILTARHLGLHVVAEGVSNERQAFLRLNGCPSLQGYHYCRPQPAED[5] IRESSSSLQPWGH 802
```

Figura 12. Alineamiento de la secuencia consenso obtenida de la página web Conserved Domain Database (secuencia enumerada del 1 al 231; primer renglón), fosfodiesterasa DosC (residuos del 505 al 807; segundo renglón) y la proteína MucG (residuos del 496 al 802; tercer renglón). Con asterisco se muestran los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados previamente (Römling *et. al.*, 2013). Alineamiento hecho con Blast, Constraint Based Protein Multiple Alignment Tool, con acceso en el siguiente link: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link\\_loc=BlastHomeLink](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlastHomeLink)

En la figura 13 se muestra la secuencia nucleotídica del gen *mucG* así como su secuencia deducida de aminoácidos. Este fragmento fue obtenido por PCR con los oligonucleótidos mucG\_Sp-F y mucG-R y esta clonado en el vector pJET1.2/Blunt (Fermentas). A este plásmido se le denomina pJET-*mucG* (colección del laboratorio).

### 6.2 Generación de la mutante *mucG*<sup>AAA</sup> a partir del gen silvestre *mucG*<sup>EAL</sup>

Para investigar si el dominio PDE de la proteína MucG estaba involucrado en el efecto negativo sobre la síntesis de alginato y el PM, se procedió a construir una mutación en este dominio. Se realizó la mutación EAL-AAA, para obtenerlo se mutaron dos residuos del sitio activo EAL, el residuo glutámico (E575) y la leucina (L577) e hicimos cambios por alaninas (EAL→AAA) tal y como se ha reportado previamente para otras proteínas con actividad PDE (Roy, 2012). Para lograrlo construimos el plásmido pLA0201 tal y como se describe en a continuación.



En la figura 15 se observan los patrones de restricción generados al digerir el plásmido pJET-*mucG* con la enzimas *XbaI* y *PvuI* por separado, así como la digestión doble *XbaI*-*PvuI*.

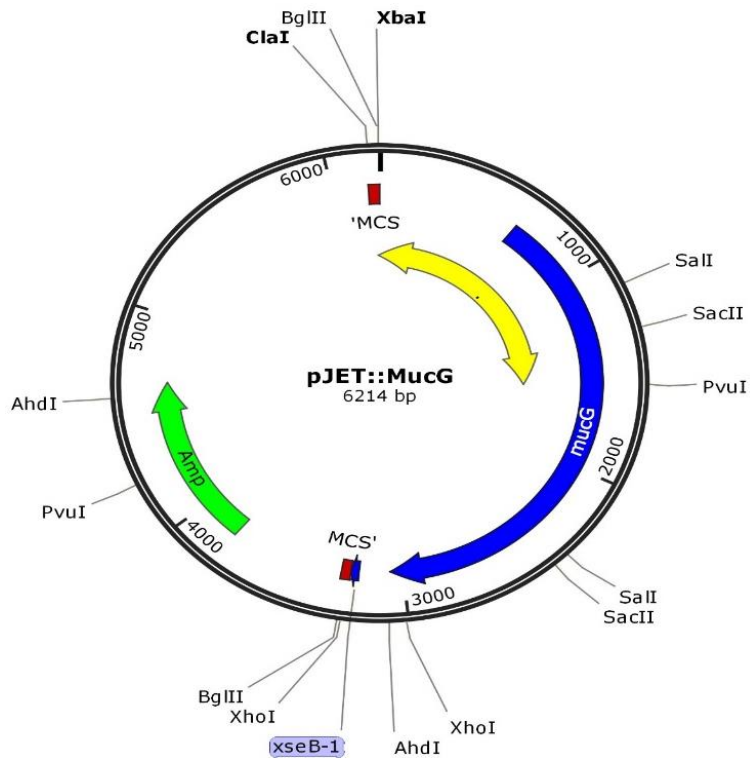


Figura 14. Esquema del plásmido pJET-*mucG* con los sitios de corte por las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo. El gen *mucG*, de 3.2 kb, se muestra en color azul. La resistencia a ampicilina se indica en color verde y en amarillo se muestra el segmento de 1.5 kb del plásmido que es eliminado.

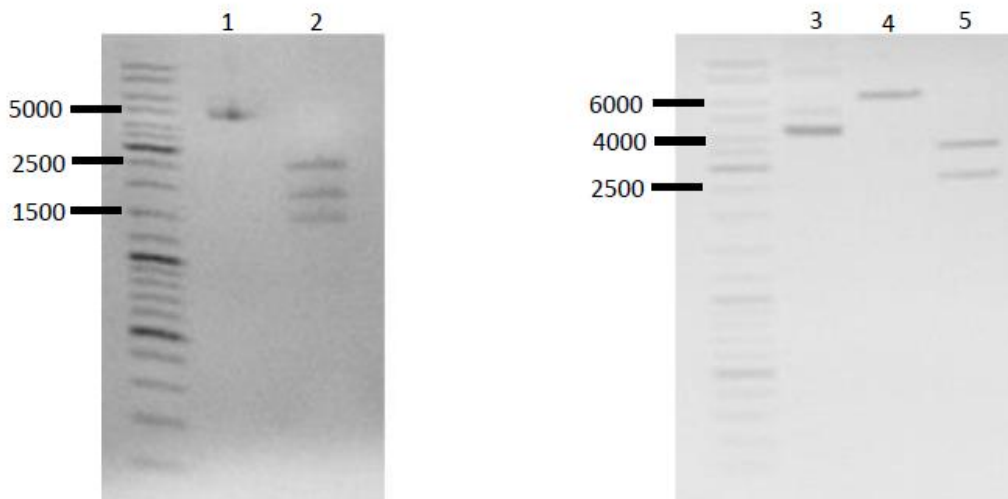


Figura 15. Electroforesis de DNA en gel de agarosa del plásmido pJET-*mucG* digerido con *XbaI* y *PvuI*. El corte con la enzima *XbaI* solo lineariza el plásmido de 6.2 kb (carril 4); el corte con *PvuI* genera dos fragmentos de 3.5 kb y 2.7 kb (carril 5). La doble digestión *XbaI* – *PvuI* genera 3 bandas con tamaños de 2.7 kb, 2 kb y 1.5 kb (carril 2). Los carriles 1 y 3 son el plásmido sin digerir.

En la figura 16 se muestra el patrón de digestión parcial del plásmido pJET-*mucG* con la enzima *PvuI*. La banda de 6.2 kb obtenida de las digestiones parciales se purificó y posteriormente se digirió con la enzima *XbaI*. Debido a los dos sitios de corte *PvuI* se generan dos patrones de bandas al cortar con *XbaI*, uno de 4.7 kb y 1.5 kb, y otro de 4.2 kb y 2 kb (figura 17).

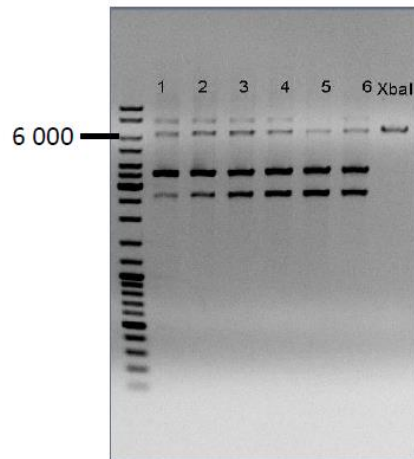


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones parciales *PvuI* del plásmido pLA01, con cantidades crecientes de la enzima *PvuI* (carriles 1-6). El plásmido linearizado con *XbaI* (6.2 kb) sirve como control.

La banda de 4.7 kb (figura 17) se purificó, sus extremos cohesivos *XbaI*-*PvuI* fueron rellenados y posteriormente se religó el fragmento con la enzima T4 ligasa tal y como se describe en Materiales y Métodos. La reacción de ligación se transformó en *E. coli* Top10 y se seleccionaron transformantes Ap<sup>r</sup>. Se purificó el plásmido de estas candidatas y una de estas clonas se verificó por patrón de restricción con la enzima *BglII* (figura 18). El plásmido resultante se denominó pLA01 (figura 19).

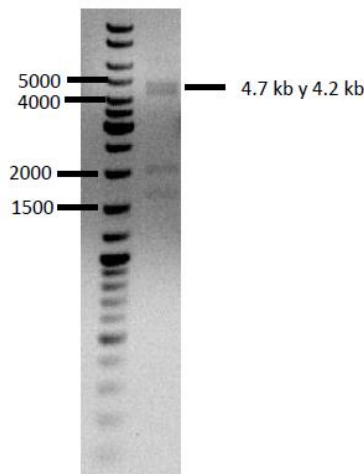


Figura 17. Electroforesis el gel de agarosa del fragmento parcialmente digerido con *PvuI* derivado del pJET-*mucG* y digerido con *XbaI*. Se purificó la banda de 4.7 kb.

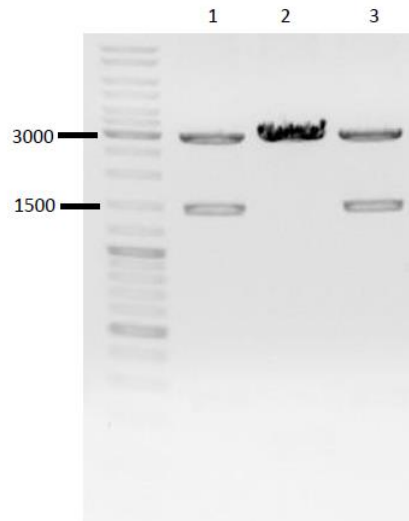


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos extraídos de 3 candidatas pLA01. Los plásmidos 1 y 3 presentan el patrón esperado con *Bg*III: 2 bandas, una de 3 kb y otra de 1.7 kb. Al plásmido resultante se le denominó pLA01.

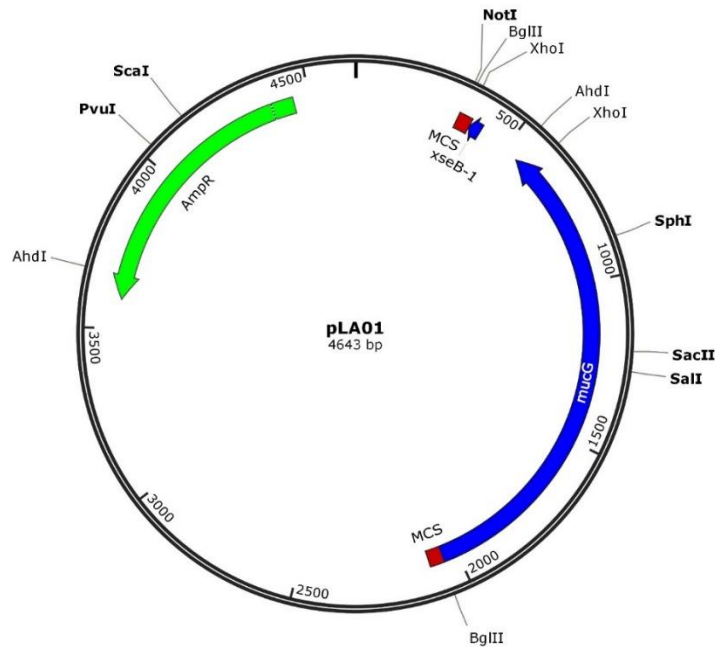


Figura 19. Mapa del plásmido pLA01. El fragmento del 1.6 kb del extremo 3' del gen *mucG* (azul) se encuentra flanqueado por los sitios *Bg*III del sitio múltiple de clonación del vector. La mutación *mucG*<sup>AAA</sup> se realizó reemplazando el fragmento *Sall-SacII* silvestre por un fragmento mutado.

Para generar las mutaciones E575A (GAG→GCG) y L577A (CTG→GCG) se diseñaron dos oligonucleótidos perfectamente complementarios de 77 pares de bases correspondientes a un fragmento *Sall-SacII* que codifica el motivo EAL de la proteína MucG y que lleva las mutaciones en los codones correspondientes. Estos oligonucleótidos se alinearon generando un DNA de doble cadena tal y como se describe en Materiales y

Métodos. Una vez obtenido este fragmento se digirió con las enzimas *SacII-SaI*. Este fragmento se clonó en el vector pLA01 digerido también con las enzimas *SacII-SaI* previamente defosforilado. Se transformó *E. coli* Top10 con esta reacción de ligación y se seleccionaron transformantes  $Ap^r$ . Se extrajo el DNA de plásmido de estas candidatas y se verificó la correcta incorporación de las mutaciones mediante secuenciación utilizando el oligonucleótido mucG-R1. Al plásmido resultante se le denominó pLA02 (figura 20).

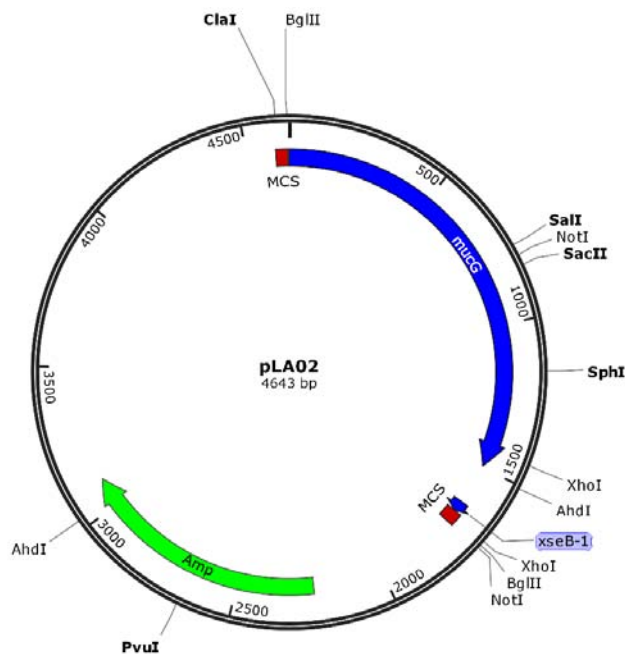


Figura 20. Mapa del plásmido pLA02. Nótese el sitio de restricción *NotI* entre los sitios *SalI* y *SacII* que se genera al introducir la mutación AAA en el plásmido pLA01.

Con el fin de poder tener un buen marcador de selección para *A. vinelandii* en los plásmidos arriba descritos, se procedió a ligar en ellos un cartucho de resistencia a Sp tal y como se describe a continuación. Un análisis de la secuencia del *locus mucG* permitió identificar un sitio de corte de la enzima de restricción *AhdI* inmediatamente después del codón de término de *mucG* y antes de la región promotora del gen *xseB-1*, gen localizado río abajo de *mucG*. Este sitio se utilizó para insertar un casete de resistencia a Sp en los plásmidos pLA01 (control) y pLA02, el cual servirá como marcador de selección en *A. vinelandii*. Se realizaron digestiones parciales con *AhdI* de ambos plásmidos (*AhdI* posee un segundo sitio de corte en el vector), se rellenaron extremos con la enzima Klenow y se ligó en este sitio el casete de Sp escindido con la enzima *SmaI*. Se transformó *E. coli* Top10 y se seleccionaron transformantes  $Ap^r$ ,  $Sp^r$ . La orientación del casete de Sp se investigó por patrón de restricción. Se identificaron aquellas clonas en las que el casete de Sp se ligó en el mismo sentido de la transcripción de *mucG*. Los plásmidos resultantes, con inserciones no polares del casete de Sp y derivados de los plásmidos pLA01 y pLA02 se denominaron pJG103 y pJG105, respectivamente. El plásmido pJG103 porta el alelo silvestre (denominado *mucG<sup>EAL</sup>*), mientras que el plásmido pJG105 porta el alelo con la mutación en el dominio EAL (denominado *mucG<sup>AAA</sup>*).

El plásmido pJG105 (*mucG*<sup>AAA</sup>-Sp) se linearizó con la enzima *ClaI* y se utilizó para transformar células competentes de *A. vinelandii* de la cepa AEIV, seleccionándose dobles recombinantes Sp<sup>r</sup>. Después de transformar este plásmido en diversas ocasiones no se obtuvieron las dobles recombinantes *mucG*<sup>AAA</sup>. Es probable que esto se haya debido a que el fragmento de recombinación ríó abajo del gen *mucG* en el plásmido pJG105 es de tan solo 150 pb, por lo que decidimos aumentar este extremo a 700 pb y así facilitar el evento de doble recombinación homóloga. Por tal razón se procedió a construir el plásmido que se describe a continuación.

Se diseñaron los oligonucleótidos ispA1 – R y xseB1AhBm – F para amplificar un fragmento de 700 pb del cromosoma de la cepa AEIV, que corresponde al extremo 3' del gen *mucG* y que contiene al gen *xseB-1*. Este fragmento se ligó en el plásmido pJET1.2 (Fermentas); este plásmido se nombró pLA03. Además introdujimos un sitio de corte de restricción de la enzima *BamHI* en uno de los oligos utilizados, ríó abajo del sitio *AhdI* anteriormente mencionado, este sitio se utilizó para insertar un casete de espectinomicina. En la figura 21 se muestra el gradiente que se realizó para encontrar las condiciones en las cuales funcionan los oligonucleótidos, ispA1 – R y xseB1AhBm – F.

Como se puede apreciar en el gel de la figura 21, en todas las temperaturas se amplificó la banda de 700 pb esperada. Se purificó esta banda de un gel de agarosa al 1% y se ligó en el plásmido pJET1.2, la orientación del inserto se determinó con un patrón de digestión con la enzima *PstI*. En la figura 22 se observa el patrón esperado de 3 bandas con pesos de 3000 pb, 380 pb y 260 pb. Se extrajo el plásmido de la candidata 4 y se mandó a secuenciar para comprobar la amplificación del fragmento correcto.

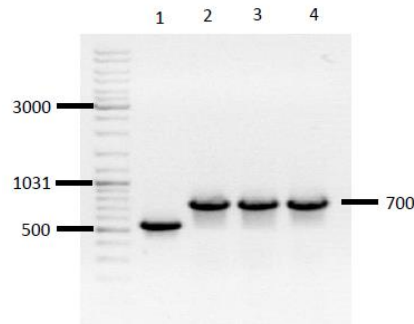


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del fragmento ríó abajo de *mucG*, utilizando los oligonucleótidos ispA1 – R y xseB1AhBm – F. Carril 1, control interno de reacción. Del carril 2 al 4 temperaturas de 58 °C, 60 °C y 62 °C, respectivamente.

Una vez corroborada la secuencia del plásmido pLA03 se introdujo el casete de Sp en el sitio *BamHI* de este, el plásmido obtenido se llamó pLA03Sp. La correcta inserción del casete se determinó con un patrón de restricción de la enzima *PvuI*, las bandas esperadas eran de 3258 pb y 2516 pb. En la figura 23 se observa que las candidatas 4 y 5 poseen el patrón correcto. Se seleccionó la candidata 4 para los experimento posteriores.

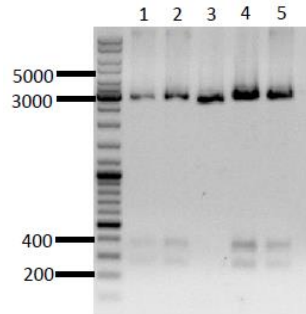


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos derivados de 5 candidatas en la búsqueda del plásmido pLA03. Los plásmidos se escindieron con la enzima *PstI*.

Posteriormente se digirieron los plásmidos pLA02 y pLA03Sp con la enzima *AhdI*. Se purificaron de gel las bandas de 3 kb y 4 kb obtenidas de las digestiones de los plásmidos pLA02 y pLA03Sp, respectivamente y se ligaron para obtener el plásmido pLA0201. La búsqueda de esta construcción se llevó a cabo por medio de un patrón de restricción con la enzima *SphI*, el patrón correcto es de dos bandas con pesos de 6616 pb y 652 pb. En la figura 24 se observa el patrón de restricción de las 2 candidatas obtenidas, la candidata 2 muestra el patrón correcto. El mapa del plásmido pLA0201 construido se muestra en la figura 25.

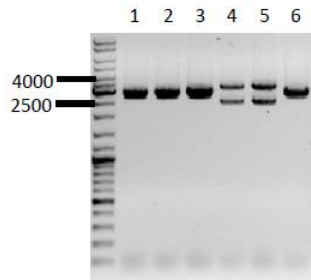


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos de 6 candidatas pLA03Sp digeridos con la enzima *PvuI* (Carriles 1-6). Primer carril, marcador de peso molecular.

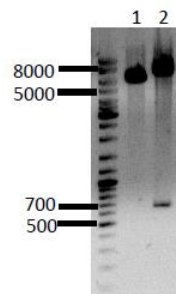


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos de 2 candidatas pLA0201 digeridos con la enzima *SphI* (Carriles 1-2). Primer carril, marcador de peso molecular.



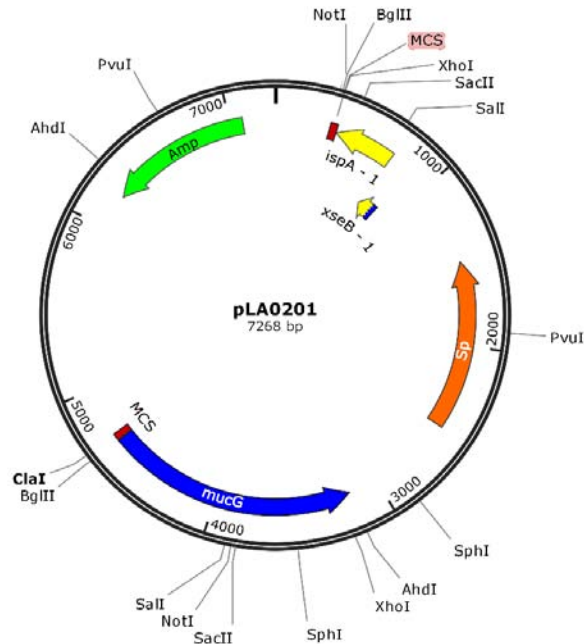


Figura 25. Mapa del plásmido pLA0201. En amarillo se muestra el fragmento de 700 pb que se añadió por subclonación. En naranja se muestra el casete de Sp.

Los plásmidos pLA0201 y pJG103 se linearizaron con la enzima *ClaI* y se utilizaron para transformar la cepa silvestre a *A. vinelandii* AEIV. Las candidatas obtenidas de esta transformación se verificaron por PCR con oligonucleótidos que nos permitieron identificar el evento de doble recombinación en el *locus mucG* (recuérdese que el genoma de *A. vinelandii* posee varios genes con dominios homólogos al PDE de *mucG*).

Para comprobar la inserción de la mutación *mucG*<sup>AAA</sup> en el *locus* correcto se realizó un PCR de colonia con los oligonucleótidos mucG5? – F y mucG1 – R los cuales amplifican un fragmento de 2,000 pb que al ser digerido con la enzima de restricción *NotI* se escinde debido a la mutación *mucG*<sup>AAA</sup> generada. En la figura 26 se observa en los carriles 2 y 3 el patrón de restricción del fragmento mutado: 4 bandas de 1060 pb, 345 pb, 289 pb y 240 pb. Por otro lado, en el carril 4 el patrón de restricción es silvestre, 3 bandas de 1300 pb, 289, pb y 345 pb. Las candidatas de los carriles 2 y 3 corresponden a la mutante *mucG*<sup>AAA</sup> la cual se nombró CLAM01.

Para verificar que el efecto de la mutación *mucG*<sup>AAA</sup> no se debiera a un efecto en la transcripción del gen *xseB-1* se construyó una cepa control con la inserción del casete de Sp en el mismo sitio que la mutante CLAM01, es decir justo después del gen *mucG*, pero manteniendo este gen silvestre, a partir del plásmido pJG103. Para comprobar la inserción del casete de Sp en el *locus* correcto se realizó un PCR con los oligos SpFlank-F y xseB1-RT-R los cuales amplifican una banda de 565 pb sólo si el casete de Sp se encuentra en el *locus* correcto. En la figura 27 se muestra la banda de 565 pb en 4 candidatas, se seleccionó la candidata 1 como la cepa control de los experimentos futuros. Esta cepa se denominó CLAM03 (*mucG*<sup>EAL</sup>).

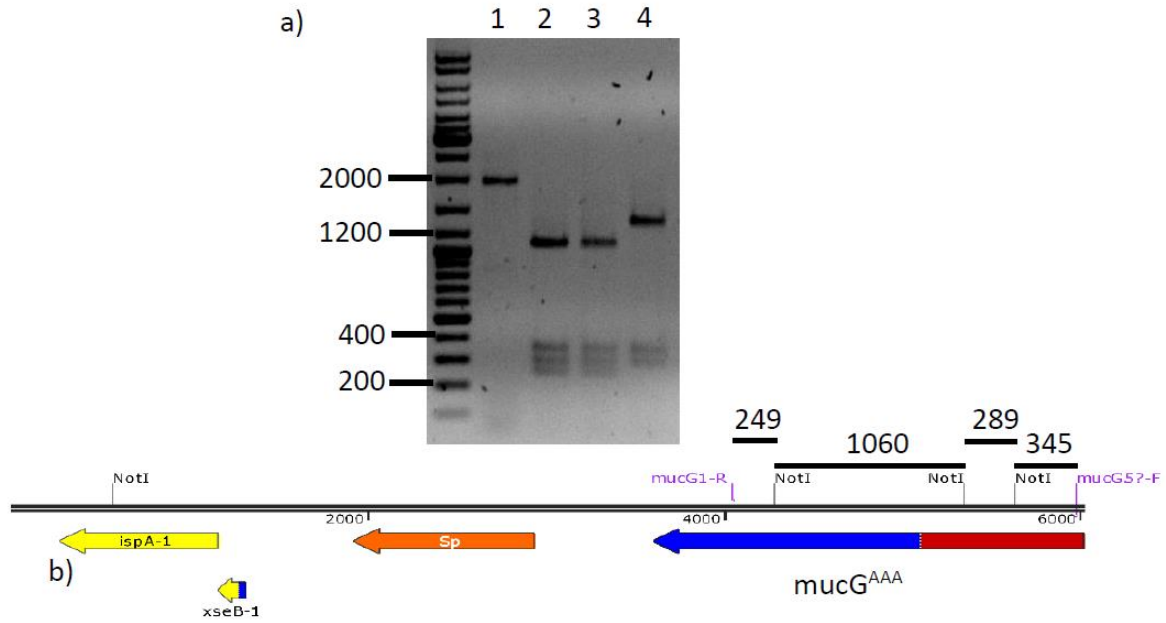


Figura 26. a) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de colonias de las candidatas CLAM01 (*mucG<sup>AAA</sup>*) empleando los oligos mucG57-F y mucG1-R (carriles 1-4). Los fragmentos de PCR fueron previamente digeridos con la enzima *NotI* para evidenciar la mutación *mucG<sup>AAA</sup>*. Carril 1, Marcador de Peso Molecular. b) Esquema del *locus mucG* después del evento de doble recombinación homóloga, en él se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR del inciso a); también se indican los fragmentos *NotI* del producto de PCR.

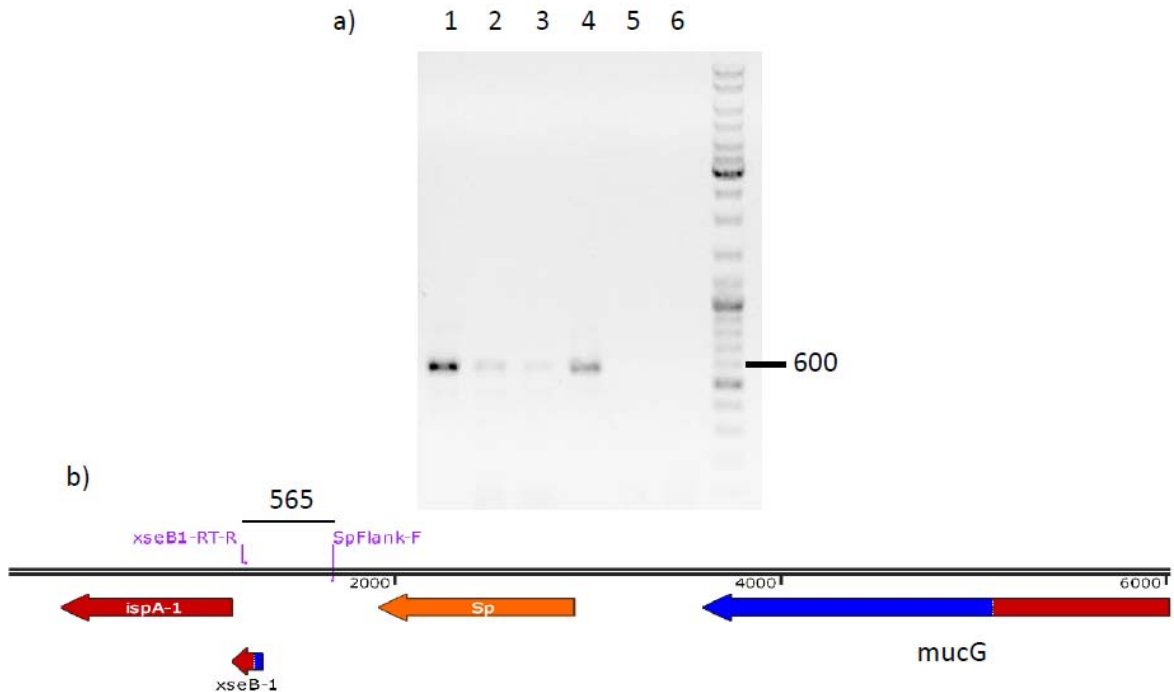


Figura 27. a) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de colonia de las candidatas *mucG<sup>EAL-Sp</sup>*, CLAM01 (carriles 1-4) y de la cepa silvestre AEIV (carril 5). Control negativo Carril 6. b) Esquema del *locus mucG<sup>EAL-Sp</sup>* después del evento de doble recombinación homóloga, en él se muestran las regiones de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR del inciso a).

### 6.3 Generación de la mutante CLAM02 *mucG*<sup>ΔEAL</sup>

Otra estrategia que se abordó para probar la hipótesis de que el dominio EAL de la proteína MucG es el responsable del efecto negativo sobre la síntesis de alginato y su PM, fue la construcción de una mutante que expresara la proteína MucG sin su dominio fosfodiesterasa EAL (*mucG*<sup>ΔEAL</sup>). Para tal fin, se introdujo un codón de paro (TGA) de la traducción en gen *mucG* antes del dominio EAL. Para tratar de que esta modificación no afectara la integridad del dominio de diguanilato ciclasa, se utilizó el servidor online I-TASSER (del inglés, Iterative Threading ASSEmbly Refinement), el cual predice la estructura y función de una secuencia primaria de proteína empleando algoritmos complejos que le permiten comparar la secuencia primaria alimentada con las proteínas existentes en la base de datos PDB (del inglés, Protein Data Bank).

En la figura 28 se observa el modelamiento del dominio de DGC de MucG en I-TASSER, el cual nos permitió identificar los residuos de aminoácidos que se encuentran entre ambos dominios (GGDEF y EAL) sobre los cuales podemos incorporar el codón de paro de la traducción, probablemente sin afectar el plegamiento del dominio GGDEF. Se cambió el codón H532 (CAC) por un codón de paro, TGA (figura 29). Para lograrlo se utilizó el plásmido pLA0200 como molde en una reacción de PCR inverso utilizando los oligonucleótidos XseBAh – F y G-DEAL tal y como se describe a continuación.



Figura 28. Modelamiento del dominio de diguanilato ciclasa de la proteína MucG con I-TASSER, con acceso en el siguiente link: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.

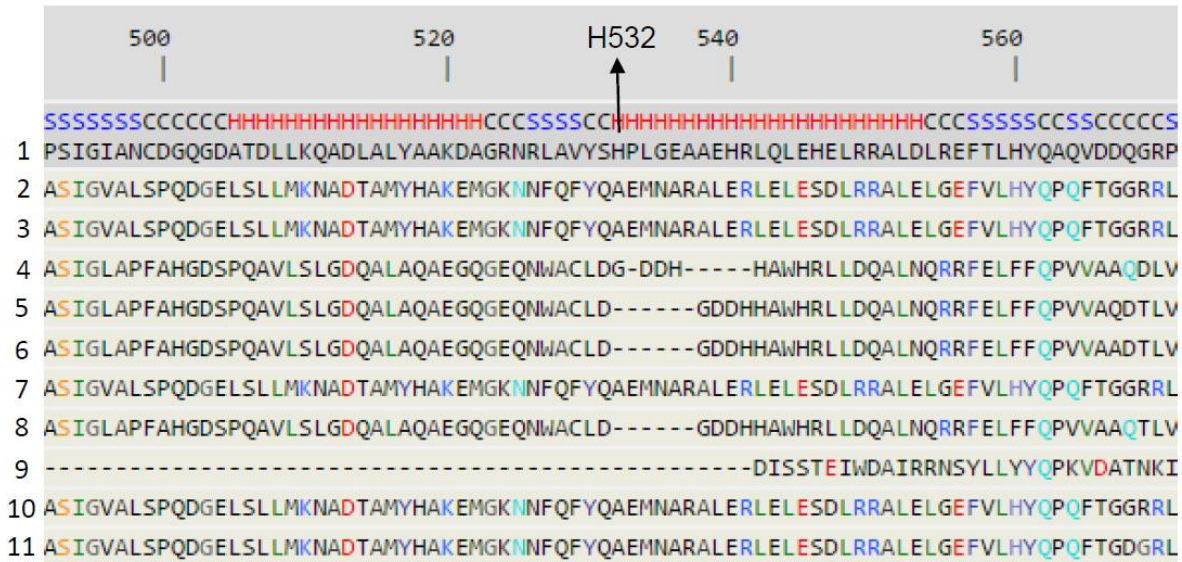


Figura 29. Alineamiento elaborado con I-TASSER. En el renglón 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína MucG del aminoácido 492 hasta 571. Los renglones 2 al 11 son proteínas bifuncionales GGDEF-EAL seleccionadas por I-TASSER, excepto el renglón 9, la cual posee solo el dominio de fosfodiesterasa. Con una flecha se señala el residuo H532 cuyo codón se cambió por un codón de paro TGA.

Para realizar la reacción de PCR inverso fue necesario en primera instancia la construcción del plásmido pLA0200, un derivado del pLA0201 sin el casete de Sp. Para este fin, el plásmido pLA0201 se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI, lo cual libera el casete de Sp, y se purificó la banda de 5.3 kb a partir de un gel de agarosa al 1%. Posteriormente este fragmento *Bam*HI se ligó y mediante un patrón de restricción con la enzima *Sac*II se logró identificar el plásmido pLA0200 (figura 30). El mapa del plásmido pLA0200 se muestra en la figura 31.

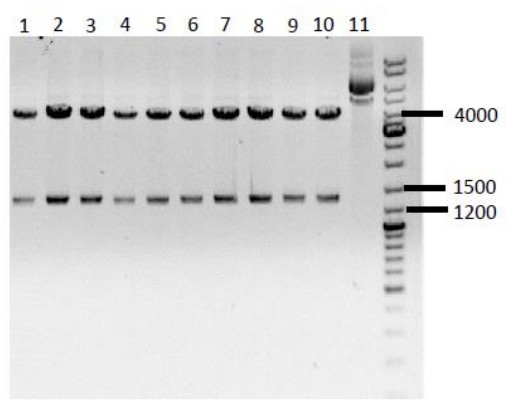


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de plásmido de 10 candidatas pLA0200 (carriles 1 al 10) digeridos con la enzima de restricción *Sac*II. Los pesos de las bandas esperadas son de 1325 pb y 3887 pb. El carril 11 muestra el plásmido superenrollado de la candidata 1.

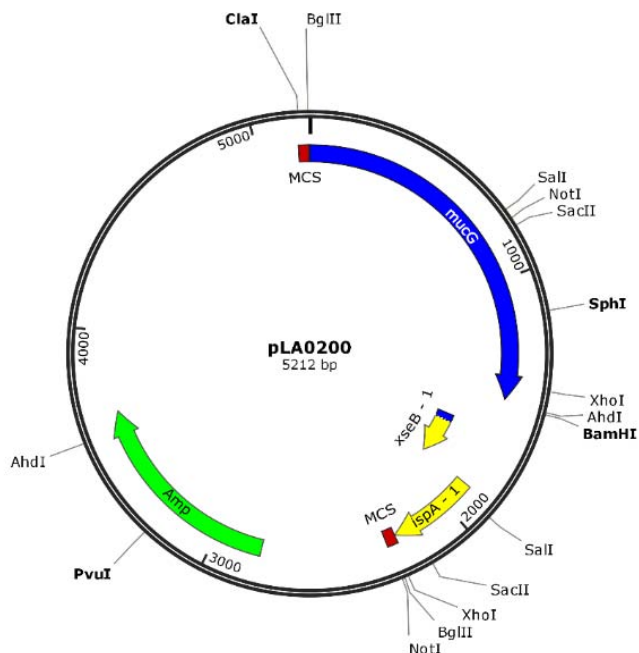


Figura 31. Mapa del plásmido pLA0200. En amarillo se muestra el fragmento de 700 pb que se amplificó por PCR de la cepa AEIV.

Con el fin de construir un plásmido que portase el gen *mucG* sin el dominio EAL se procedió a realizar un PCR inverso utilizando de DNA molde el plásmido pLA0200 y el par de oligonucleótidos XseBAh – F y G-DEAL. En la figura 32 se ilustra el gradiente realizado para encontrar las condiciones adecuadas para la pareja de oligos XseBAh – F y G-DEAL. En la figura 32 se puede apreciar que la reacción de PCR no fue específica por lo que se procedió a purificar, corriendose el producto de reacción en un gel de agarosa al 1% para posteriormente cortar la banda deseada. Posteriormente este fragmento se religó sin complicaciones debido a que se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity, DNA Polymerase cuyos productos de PCR contienen extremos romos; se utilizó el patrón de restricción con la enzima *BglII* para encontrar el plásmido correcto. El patrón de restricción esperado es de dos bandas de 2928 pb y 1477 pb. En la figura 33 se puede observar que las candidatas 1 y 5 presentan ese patrón, además se introdujo como control la digestión del plásmido pLA0200 en donde el patrón de restricción es distinto (bandas de 2928 pb y 2284 pb) debido a que la diferencia entre estos dos plásmidos es que uno contiene el dominio EAL y el otro no. El mapa del plásmido pLA0202, que porta el gen *mucG* en el que el dominio EAL ha sido eliminado (*mucG*<sup>ΔEAL</sup>) se muestra en la figura 34.

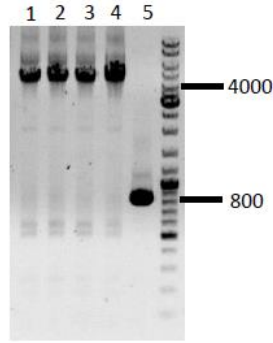


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para generar el plásmido pLA0202, utilizando distintas temperaturas de alineamiento: 56, 58, 60 y 62 °C (Carriles 1-4, respectivamente). Carril 5, plásmido pLA0200.

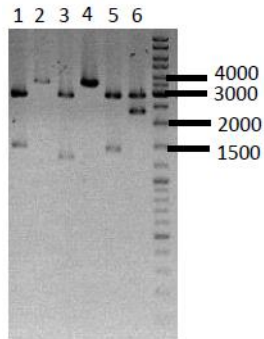


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos de candidatas pLA0202 digeridos con la enzima *Bgl*III (Carril 1-5). En el carril 6 se muestra la digestión del plásmido pLA0200 como control de comparación.

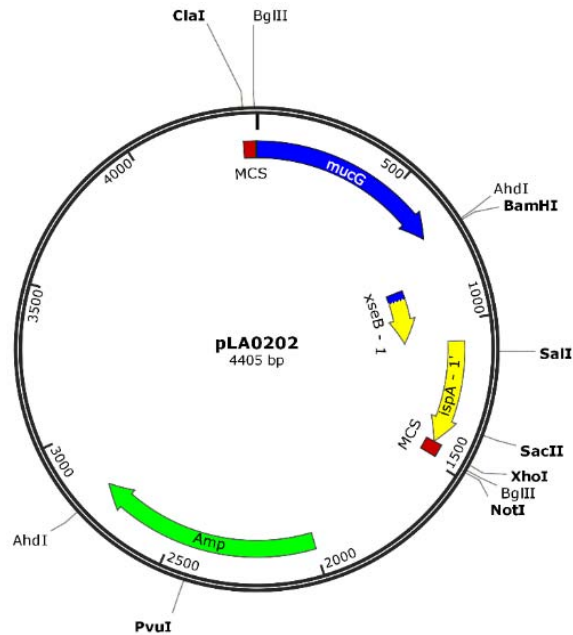


Figura 34. Mapa del plásmido pLA0202 (*mucG*<sup>ΔEAL</sup>). En azul se muestra el fragmento de *mucG* sin en dominio EAL. Compárese con el plásmido pLA0200.

Posteriormente, se introdujo un casete de resistencia a Sp en el único sitio *Bam*HI del plásmido pLA0202. Un patrón de restricción con la enzima *Pvu*I nos permitió identificar el plásmido correcto, denominado pLA0203. En la figura 35 se muestra el patrón de restricción de 5 candidatas; debido a las dos orientaciones en las cuales pudo ligarse el casete de Sp se pudieron identificar en el gel de agarosa dos patrones de restricción. El primero con dos bandas de 2958 pb y 3505 pb, este es el patrón que no se requiere; el segundo con dos bandas de 2516 pb y 3945 pb, este es el patrón correcto pues el casete de Sp se introdujo en el mismo sentido que la transcripción de *mucG*, sentido en el cual no habría un efecto polar sobre la posible transcripción del gen río abajo *xseB*-1. El plásmido correcto es la candidata 4.

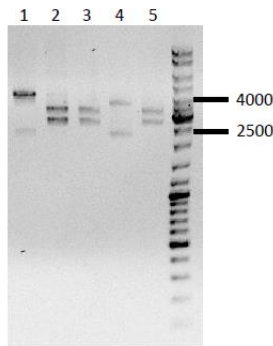


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos de 5 candidatas pLA0203 digeridos con la enzima *Pvu*I (Carriles 1-5). Último carril: marcador de peso molecular.

Este plásmido, llamado pLA0203, se linearizó con la enzima *Cla*I y se transformaron células competentes de *A. vinelandii* seleccionándose dobles recombinantes Sp<sup>r</sup>. Posteriormente se comprobó que estas candidatas llevasen la mutación *mucG*<sup>ΔEAL</sup> mediante 3 tipos de reacciones de PCR:

- 1) Utilizando los oligonucleótidos GG9-RT-F y XseB1-RT-R, los cuales amplifican un fragmento de 2.8 kb en la mutante y un fragmento de 1.5 kb en la cepa silvestre.
- 2) Utilizando los oligonucleótidos SpFlanK-R y mucG5?-F, se amplifica un fragmento de 2.1 kb solo si el casete de Sp se encuentra en el *locus* correcto;
- 3) Utilizando los oligonucleótidos mucG5?-F y XseB1-RT-R se amplifica un fragmento de 2.7 kb en el *locus* silvestre y un fragmento de 4 kb si el *locus* esta mutado y contiene el casete de Sp, estos oligonucleótidos también nos permitirían identificar copias del gen silvestre en las candidatas.

En la figura 36 se puede observar que las 4 candidatas probadas poseen el casete de Sp en el *locus* correcto debido a la presencia de las bandas de 2.1 kb y 2.8 kb (derivadas de las reacciones de PCR 1 y 2, respectivamente) que se encuentran en los carriles 1 – 4 y 10 – 13, respectivamente. Además cuando se realizó la reacción de PCR 3 no observamos la banda de 2.7 kb en los carriles 5 – 8 por lo que podemos asegurar que estas candidatas no poseen copias silvestres del gen *mucG*. En los carriles 9 y 14, como controles de comparación, se observan los fragmentos de PCR utilizando como DNA





siguientes cepas: la cepa silvestre AEIV y las mutantes GG9 (*mucG*::Tn5), CLAM01 (*mucG*<sup>AAA</sup>), CLAM02 (*mucG*<sup>ΔEAL</sup>) y como control de las dos últimas mutantes la cepa CLAM03 (*mucG*<sup>EAL</sup>), la cual porta el gen *mucG* silvestre pero lleva insertado el casete de Sp inmediatamente después del gen *mucG*. En la figura 37 y 38 se muestran los resultados obtenidos en medio sólido y en líquido, respectivamente.

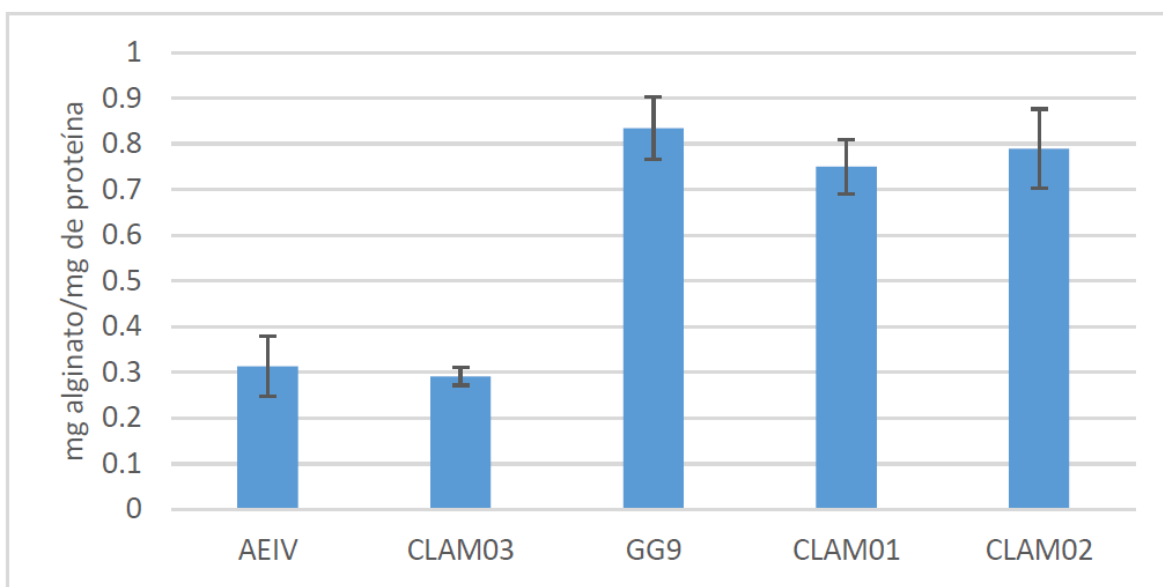


Figura 37. Cuantificación de alginato en medio BS sólido a las 48 h de cultivo.

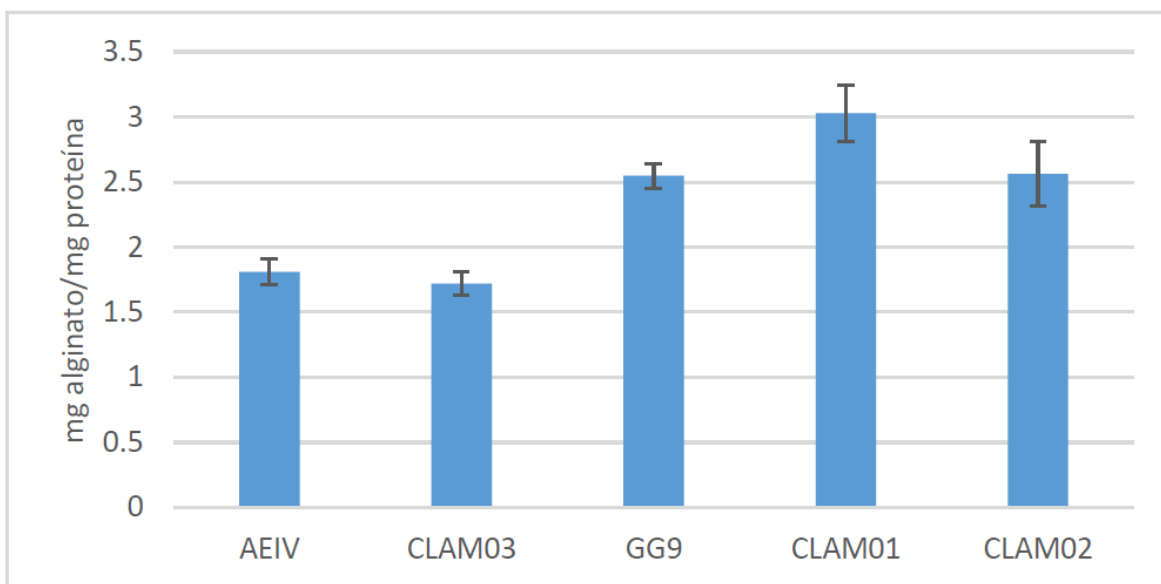


Figura 38. Cuantificación de alginato en medio BS líquido a las 48 h de cultivo.

En las figuras 37 y 38 se observa que la mutante GG9 tiene un producción específica de alginato mayor que la cepa parental AEIV en ambas condiciones, sin embargo esta diferencia es más pronunciada en medio sólido, 2.6 veces mayor en sólido contra 1.4 veces en líquido, tal y como se describió en la sección de Antecedentes de este trabajo. Es importante señalar que la cepa CLAM03 (cepa control) tiene una producción de alginato igual que la cepa silvestre AEIV, por lo cual, podemos asegurar que la inserción del casete de Sp no tiene un efecto sobre la producción específica de alginato.

Un análisis estadístico de t-student indicó que no hay diferencias significativas en la producción específica de alginato entre las cepas mutantes a un nivel de significancia del 5% y las diferencias entre las cepas mutantes con la cepa control sí son significativas a este nivel del 5%. Por lo tanto, la producción específica de las mutantes CLAM01 y CLAM02 mantienen la misma tendencia que la mutante GG9, es decir, poseen un producción específica de alginato mayor que la cepa parental en ambas condiciones. La producción específica de estas mutantes son muy similares, alrededor de 0.8 mg alginato/mg proteína en medio sólido y 2.7 mg alginato/mg proteína en medio líquido, mientras que la cepa silvestre AEIV y CLAM03 (cepa control) producen 0.3 mg alginato/mg proteína en medio sólido y 1.7 mg alginato/mg proteína en medio líquido.

Además de la producción específica de alginato de estas cepas también se determinó el PM de los alginatos producidos en medio BS líquido. En la figura 39 se muestra la distribución de PM del alginato producido por las cepas CLAM01, CLAM02, CLAM03, GG9 y AEIV.

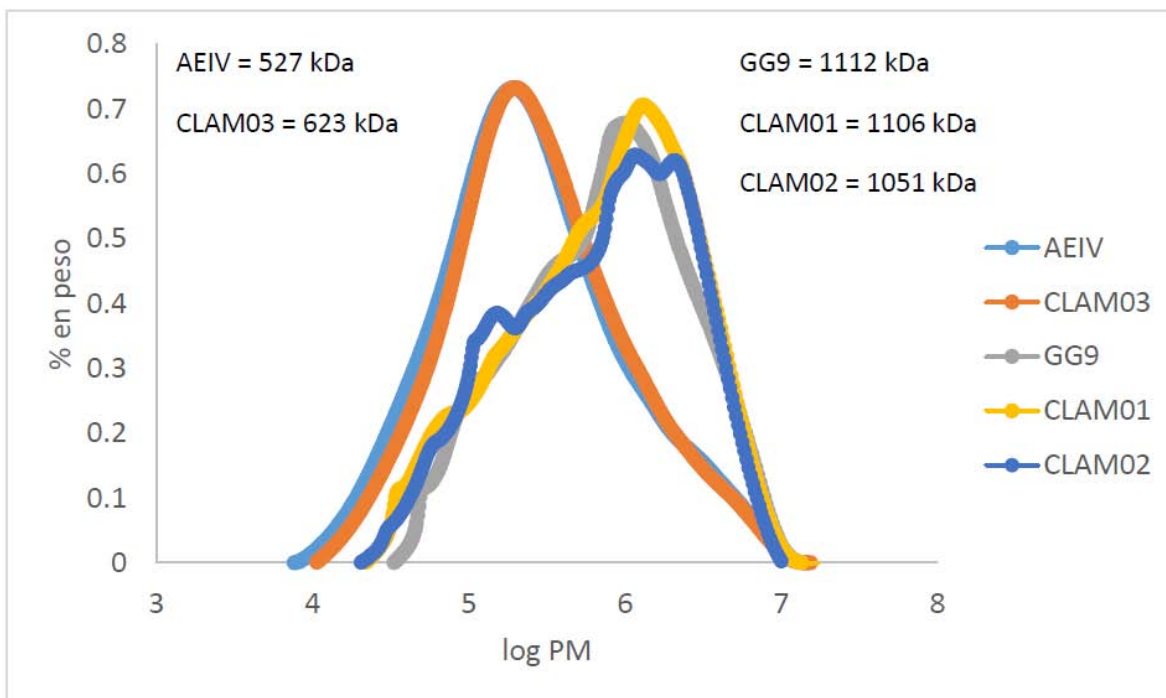


Figura 39. Distribución de pesos moleculares de los alginatos producidos por las cepas CLAM01, CLAM02, CLAM03, GG9 y AEIV. Se muestra el PMP del alginato producido.

Tal y como se describió en los antecedentes, el polímero producido por la mutante GG9 posee un PMP más elevado que la cepa parental AEIV, 1,112 kDa contra 527 kDa. Así mismo, las mutantes CLAM01 y CLAM02 poseen pesos moleculares de 1,106 kDa y 1,051 kDa, respectivamente, además la cepa control CLAM03 produce un alginato de PM muy semejante al de la cepa silvestre AEIV, 623 kDa (Tabla 7). Este fenotipo de la mutante GG9 se reitera en la mutantes sin actividad fosfodiesterasa (CLAM01) y en la mutante en la cual el dominio EAL ha sido eliminado (CLAM02), por lo tanto hay un claro efecto sobre el PMP del alginato producido presumiblemente por un aumento en los niveles de c-di-GMP.

Tabla 7. PMP de los alginatos producidos por las cepas AEIV, GG9, CLAM01, CLAM02 y CLAM03

CEPA	PMP (kDa)
AEIV	527 ± 19
CLAM03	623 ± 74
GG9	1,112 ± 134
CLAM01	1,106 ± 85
CLAM02	1051 ± 51

Las diferencias en producción específica de alginato en medio sólido y líquido son difíciles de explicar, debido a que no existen datos experimentales de los parámetros que afectan el crecimiento bacteriano en cultivo en medio sólido vs medio líquido; por ejemplo, el oxígeno. Normalmente, el medio sólido es empleado para observación de fenotipos marcados físicamente y no se miden parámetros como la aireación del medio de cultivo. Estas diferencias muy probablemente se deban a las diferencias físicas inherentes de cada condición de cultivo, por ejemplo, en un cultivo líquido el medio se encuentra en agitación constante lo que impide que las células crezcan formando grandes aglomerados, evitando así la formación de gradientes de oxígeno que pudieran afectar el crecimiento; este fenómeno sucede en cultivo en medio sólido, debido a que las bacterias crecen en la superficie del medio, lo que limita de oxígeno a las que se encuentran en las capas inferiores de la colonia exactamente sobre la superficie del medio, comparadas con las que se encuentran en la superficie de la colonia. Es evidente que el comportamiento celular, en términos de su metabolismo y su fisiología en medio sólido y medio líquido son muy distintos.

Ya se ha reportado al c-di-GMP como una molécula que afecta de manera positiva la producción de exopolisacáridos. La biosíntesis de celulosa en *G. xylinus* fue el primer proceso reportado regulado por c-di-GMP (Römling *et. al.*, 2013). También los polisacáridos Pel, Psl y el alginato en *P. aeruginosa* se sintetizan de manera c-di-GMP dependiente. Pel y Psl son regulados a nivel transcripcional por c-di-GMP, el cual se une a un regulador transcripcional FleQ deshaciendo el complejo FleN-FleQ (Römling *et. al.*, 2013). Este complejo ocasiona un doblés en el DNA que impide el acceso de la RNA

polimerasa al promotor de los genes que transcriben para las proteínas involucradas en la síntesis de Pel y Psl, la unión de c-di-GMP con FleQ alivia el efecto del complejo FleN-FleQ permitiendo la transcripción de los genes *pel* y *psl*. La biosíntesis de Pel también es regulada a nivel posttranscripcional, la molécula de c-di-GMP es detectada por una proteína llamada PelD, la cual es una DGC con un dominio degenerado que une c-di-GMP a través del sitio de inhibición del dominio (I-site) estimulando así la síntesis del polímero (Römling *et. al.*, 2013). Por otro lado, el alginato también es regulado a nivel postraduccional en *P. aeruginosa*, donde ya se ha demostrado que Alg44, la copolimerasa del complejo de síntesis del alginato, posee un dominio PilZ cuya función es detectar los niveles de c-di-GMP y estimular la síntesis del alginato, además se ha identificado a MucR como la DGC activa que proporciona el c-di-GMP para este proceso (Merighi *et. al.*, 2007 y Hay *et. al.*, 2009).

El proceso de biosíntesis del alginato se encuentra muy conservado entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* y ya se ha demostrado que MucG tiene un efecto negativo en la producción de alginato y su PM (datos no publicados). Los resultados de la producción específica de alginato elevados en las mutantes GG9, CLAM01 y CLAM02 con respecto a la silvestre y control, se explican debido a la ausencia de la actividad PDE de MucG en las mutantes, en las cuales los niveles de c-di-GMP se mantienen o son mayores que en la cepa silvestre y control, donde esta actividad fosfodiesterasa se encuentra presente. De esta manera, los resultados demuestran que el dominio EAL de MucG tiene un efecto negativo en la síntesis de alginato en la cepa de *A. vinelandii* AEIV. Sin embargo, no se ha determinado a qué nivel de regulación el c-di-GMP interviene en la síntesis del polímero; dado que Alg44 contiene un dominio PilZ, se propone que lo hace a nivel postraduccional estimulando la actividad del complejo polimerasa Alg8-Alg44.

Por otro lado ensayos de qRT-PCR han demostrado que la expresión de los genes *algD*, *alg8* y *algL* se encuentran incrementados en la mutante GG9 (datos no publicados). Estos resultados indican otro posible nivel de regulación por c-di-GMP de la biosíntesis de alginato, regulación a nivel transcripcional, posiblemente por la unión de c-di-GMP a un activador transcripcional que eficiente la localización correcta de la RNA polimerasa sobre alguno de los promotores a partir de los cuales se transcriben los genes *alg*. La relación de la transcripción de los genes *alg* con los niveles de c-di-GMP no se ha estudiado aún, sin embargo ya se ha demostrado en otros microorganismo que c-di-GMP si está involucrado en procesos de regulación de la transcripción de genes por múltiples vías (Römling *et. al.*, 2013).

Con los datos obtenidos de la producción específica de alginato se demostró que el dominio EAL de MucG tiene un efecto negativo en la producción del alginato; dado que el PM del alginato es mayor en las mutantes que carecen de la actividad fosfodiesterasa de MucG esto nos muestra que elevados niveles de c-di-GMP tienen un efecto positivo en el PMP del alginato. Determinar el mecanismo molecular por el cual el c-di-GMP conduce a estos fenotipos será fundamental para lograr entender la etapa de modificación y transporte del alginato a través del periplasma. Steiner *et. al.* (2013) reportó que c-di-GMP es un regulador alostérico de la maquinaria de síntesis del exopolisacárido poli- $\beta$ -1,6-N-acetilglucosamina en *E. coli*, estimulando la interacción eficiente entre el complejo que sintetiza el exopolisacárido. Un escenario de este tipo probablemente esté presente en *A. vinelandii*. Sin embargo, este complejo interacciona con c-di-GMP de manera muy

diferente debido a que ninguna de las proteínas involucradas en la síntesis del polímero contiene un dominio PilZ.

Díaz-Barrera en el 2012 y Flores en el 2013 reportaron una correlación entre el PM del alginato y la expresión del gen *alg8*, el cual codifica la alginato polimerasa. Cuando se presenta un escenario donde *alg8* se sobreexpresa se obtiene un alginato de mayor PM. Sin embargo también se ha observado una sobreexpresión de *algL* en las mismas condiciones donde se sobreexpresa *alg8* (Flores 2013, y Núñez datos no publicados). Esto probablemente se debe a que *algL* se encuentra dentro del grupo de genes que codifican para todas las proteínas necesarias para la formación del andamiaje periplásmico imprescindible para la exportación del polímero; no se ha determinado exactamente la localización de AlgL dentro de este andamiaje pero se ha reportado que es un elemento esencial en la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* (Bakkevig, 2005 y Jain, 2005). Siendo AlgL una alginato liasa cuya función enzimática es la de romper la cadena de alginato, es un poco inesperado que su expresión se encuentre aumentada en condiciones donde el PM del alginato es elevado. AlgL ha sido caracterizada bioquímicamente por Ertesvag en 1998, y durante su purificación, a partir de su expresión recombinante en *E. coli*, se encontró que su PM era de 39 kDa y no de 41.4 kDa como se predice con la secuencia de nucleótidos, indicando que en *E. coli*, AlgL sufre un corte proteolítico en su extremo N-terminal (Ertesvag, 1998). Este corte probablemente sea necesario para promover la actividad liasa de AlgL en *A. vinelandii*. Esta maduración de AlgL probablemente sea bloqueada por los niveles elevados de c-di-GMP en las mutantes GG9, CLAM01 y CLAM03.

Recientemente se ha descrito para *P. aeruginosa* que la localización, estabilidad y las interacciones proteína-proteína de Alg44 no se ven afectadas por los niveles de c-di-GMP (Moradali *et. al.*, 2015) y debido a que uno de los factores que determinan el PM del alginato es la actividad enzimática del complejo de membrana interna Alg8-Alg44, podemos proponer que el c-di-GMP ejerce un efecto positivo en la actividad de este complejo.

### **6.5 Determinación del PM en cultivos con diferentes VTO**

Tal y como se describió en el apartado 2.4.1, existen reportes donde se determinó el PMP del alginato producido por la cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046 en los cuales se correlaciona un PM elevado del alginato con condiciones de cultivo donde la velocidad de transferencia de oxígeno es baja (Díaz-Barrera *et. al.*, 2007). La producción de este alginato con PM elevado se ha correlacionado con un aumento en la expresión del gen *alg8* (Díaz-Barrera *et. al.*, 2012) así como también se ha visto un aumento en la expresión del gen *alg44* (Flores *et. al.*, 2013), genes que codifican para las enzimas de membrana interna encargadas de la polimerización del alginato. Por otro lado se ha reportado al segundo mensajero c-di-GMP como esencial para la síntesis de alginato en *P. aeruginosa* (Merighi *et. al.*, 2007) y dado que estos mecanismo de síntesis se encuentran muy conservados entre *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*, creemos que el c-di-GMP tiene un efecto positivo en la actividad del complejo polimerasa Alg8-Alg44.

Cabe recordar que la proteína MucG posee un dominio PAS el cual se sabe responde a los niveles de O<sub>2</sub> y en otras proteínas multidominio regula las actividades de los dominios

DGC o PDE. Por lo cual decidimos determinar el PM de los alginatos producidos por la cepa silvestre de *A. vinelandii* AEIV y la mutante GG9 (*mucG::Tn5*) en diferentes VTO para investigar si la proteína MucG participa en el control del PM en respuesta al oxígeno.

Para exponer las cepas a diferentes VTO se utilizó el modelo empírico propuesto por Maier y Büchs en el año 2001 para determinar la  $VTO_{max}$  en matraces Erlenmeyer y que se describe a continuación.

$$VTO_{max} = \frac{1}{6} (n^{0.84} V_L^{-0.84} d_0^{0.27} d^{-1.25} - 5)$$

Donde  $n$  es la frecuencia de agitación (rpm),  $V_L$  es el volumen de llenado (ml),  $d_0$  es el diámetro de agitación de la incubadora y  $d$  es el diámetro del matraz Erlenmeyer. 1/6 y 5 son constantes características de matraces de 500 ml.

Se utilizaron matraces de 500 ml con volumen de llenado de 50 ml, 100 ml y 200 ml los cuales corresponden a una velocidad de transferencia de oxígeno de 5.24 mmol/L h, 2.56 mmol/L h y 1.06 mmol/L h, respectivamente. La inoculación de los matraces así como la obtención del alginato para este experimento se describió en Materiales y Métodos.

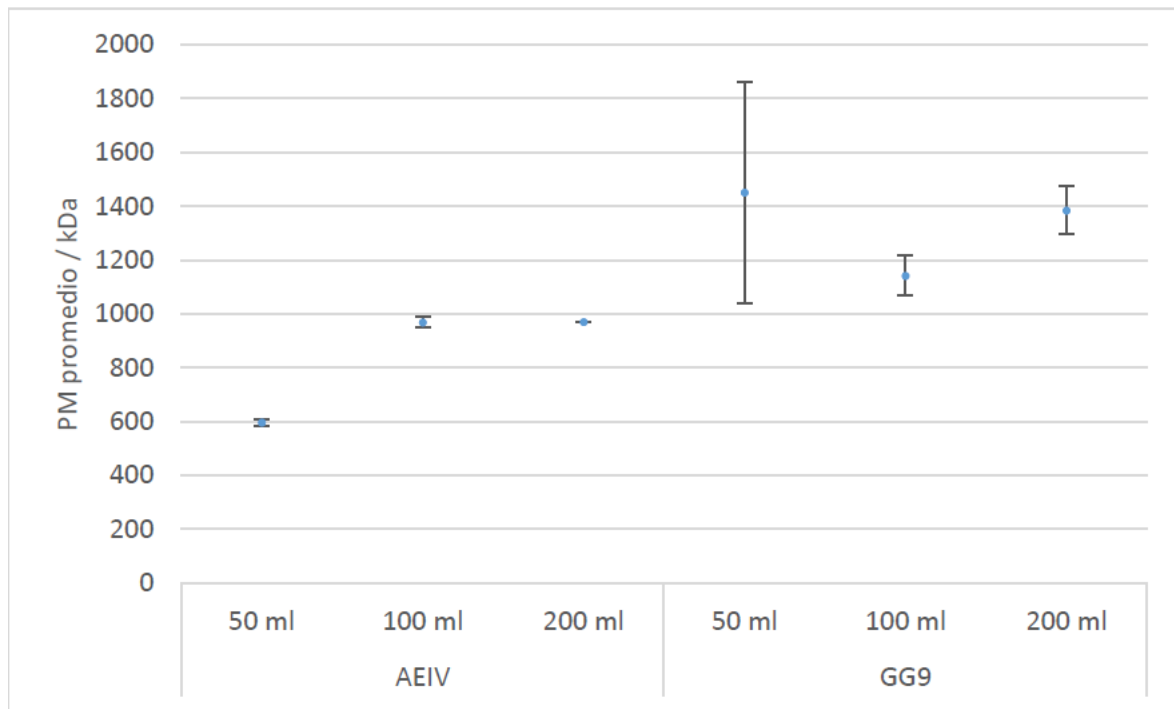


Figura 40. Pesos moleculares promedio de los alginatos producidos por las cepas AEIV y GG9 en diferentes volúmenes de llenado. 50 ml, 100 ml y 200 ml

En la figura 40 se observan los pesos moleculares obtenidos en los diferentes volúmenes de llenado utilizados para las cepas AEIV y GG9. En la cepa silvestre AEIV hay un aumento en el PMP de 600 kDa a 1000 kDa cuando se aumenta el volumen de llenado de 50 a 100 ml, es decir, cuando se disminuye la transferencia de oxígeno. Sin embargo,

cuando la transferencia de oxígeno se disminuye aún más aumentando el volumen de llenado hasta 200 ml el PM del alginato no sufre ningún cambio con respecto al volumen de llenado de 100 ml. Por otro lado, la mutante GG9 produce un alginato con PM más elevado que la cepa silvestre AEIV en todas las condiciones, con pesos moleculares que van desde los 1100 kDa hasta 1800 kDa.

Estos resultados indican que existe un control por parte del oxígeno sobre el proceso de biosíntesis de alginato en la cepa silvestre AEIV, de tal manera que en un volumen de llenado de 50 ml la VTO posee un efecto negativo sobre la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de modificación del alginato y que determinan su PM; cuando la VTO se disminuye, con el aumento del volumen de llenado a 100 ml, este efecto negativo se alivia produciéndose un alginato de mayor PM. Por otro lado, la mutante GG9 produce un alginato con PM mayor de 1,100 kDa en todas las condiciones empleadas, indicando que no se observa un efecto de la VTO sobre el peso molecular del alginato.

Ya se han reportado DGC y PDE cuyas actividades enzimáticas son reguladas por el oxígeno a través de un dominio PAS, tal es el caso del complejo DosC-DosP-PNPasa. La PNPasa forma parte de un complejo de degradación de RNA, cuya función es desestabilizar el RNA a través de la incorporación de una cadena de poli A en el extremo 3' de los RNA. Condiciones de microaeróbicas/anaerobias activan la DGC (DosC) y el c-di-GMP activa la PNPasa mientras que condiciones aerobias inhiben la actividad PNPasa por la degradación de c-di-GMP por la PDE, DosP (Römling *et. al.*, 2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos proponer que los niveles de oxígeno son detectados por el dominio PAS de la proteína MucG y se activa su dominio EAL; cuando la VTO disminuye hasta cierto límite donde el oxígeno ya no es detectado por MucG, esta podría permanecer con una actividad basal de su dominio EAL lo cual resultaría en un aumento en las pozas de c-di-GMP y el PM del alginato producido no aumentaría más allá del obtenido en ese límite. Esta propuesta explicaría porqué al disminuir la VTO con un volumen de llenado de 200 ml no se produce un alginato de mayor PM. Además, debido a que la mutante GG9 no expresa la proteína MucG, esta produce un alginato de mayor PM que la cepa parental debido a la ausencia de la actividad fosfodiesterasa basal y por lo tanto no respondería a los niveles de oxígeno.

#### **6.6 Determinación del grado de acetilación de los alginatos producidos por la mutante *mucG* GG9.**

En el periplasma, la cadena naciente de alginato sufre modificaciones importantes, una de ellas es el corte por una enzima alginato liasa, AlgL (Hay *et. al.*, 2013 y Galindo *et. al.*, 2007). Se ha reportado para esta liasa una especificidad hacia los alginatos que no se encuentran acetilados (Farrell y Tipton, 2012 y Ertesvåg *et. al.*, 1998), es por esta razón que nos dimos a la tarea de determinar el grado de acetilación del alginato producido por la mutante GG9 y la cepa silvestre AEIV. Una mayor acetilación del alginato producido por

la GG9 explicaría su mayor PM debido a una reducción en la frecuencia de corte por la enzima AlgL.

Se realizó un experimento con 5 réplicas biológicas de las cepas AEIV y GG9. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Determinación de g de acetilos por g de alginato

Cepa	% acetilos
AEIV	1.7 ± 0.4
GG9	1.8 ± 0.5

El grado de acetilación de los alginatos producidos por ambas cepas no presenta diferencias significativas. Sin embargo el PM del alginato producido por la mutante GG9 es mayor que el alginato producido por la cepa AEIV. Recientemente se ha reportado que la acetilación no afecta la procesividad de la polimerización del alginato en *P. aeruginosa* (Moradali, *et. al.* 2015). Por otro lado, se ha reportado que la liasa AlgL actúa preferentemente sobre alginatos no acetilados y polimanuronatos (Farrell y Tipton, 2012 y Ertesvåg *et. al.*, 1998). Al no existir diferencias significativas en el grado de acetilación de estos alginatos, se especula que ambos alginatos son igualmente susceptibles al corte por la alginato liasa AlgL, por lo que se podría sugerir que el peso elevado del alginato producido por la mutante GG9 podría deberse a un efecto positivo sobre la actividad del complejo polimerasa del alginato.

Otro hecho que apoya nuestra hipótesis, es la relación que existe entre la actividad epimerasa de AlgG con la polimerización del alginato. Una mutante que expresa una AlgG sin actividad epimerasa produce alginato de mayor peso molecular que la cepa silvestre, demostrando la importancia de AlgG en el andamiaje periplásmico para la procesividad del alginato. Debido a que el mecanismo de epimerización es similar al de las alginato liasas, se propone que AlgG podría estar controlando la longitud de la cadena de alginato, basando este hecho en que los alginatos de peso molecular bajo tienen un alto contenido de residuos G (Moradali, 2015). Apoyándonos en estos recientes reportes, el alginato producido por la mutante GG9 de mayor peso molecular, tendría una menor proporción de G con respecto al alginato de la cepa AEIV, sería un alginato en su mayoría de residuos manurónicos y por lo tanto más susceptible al corte de la alginato liasa AlgL durante el proceso de biosíntesis; al mismo tiempo lo haría menos propenso al corte por las alginato liasas extracelulares AlyA3 y AlgE7 (Gimmestad, 2009), aunque AlgE7 podría epimerizar residuos manurónicos a gulurónicos y convertir el alginato en un sustrato preferible a su actividad liasa. La determinación del contenido de residuos G y M de los alginatos producidos por las cepas mucG sería fundamental para poder establecer la razón del mayor PM de estos alginatos.



### **6.7 Determinación de la actividad liasa intracelular en la mutante *mucG*:Tn5 GG9.**

Se intentó determinar la actividad de las alginato liasas tal y como se describe en Materiales y Métodos, de acuerdo al objetivo 3 planteado. Sin embargo, no obtuvimos resultados concluyentes debido a que los experimentos no fueron reproducibles.

A pesar de que la actividad alginato liasa ya ha sido determinada en la cepa de *A. vinelandii* (Flores *et. al.*, 2013) ATCC 9046, en este trabajo utilizamos la cepa AEIV la cual fue aislada de suelos en Noruega por el grupo del Dr. Svain Valla en la Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología. En comunicación personal con la Dra. Helga Ertesvåg, colaboradora del Dr. Valla, también nos dijo de la incapacidad de determinar, en la cepa AEIV, la actividad alginato liasa de manera reproducible por su grupo de investigación. Las alginato liasas que posee *A. vinelandii* (en total se han descrito 5) (Gimmestad *et. al.*, 2009, Ertesvåg *et. al.*, 1998) muestran diferencias catalíticas, que van desde afinidades diferentes por los distintos tipos de alginatos a distintos requerimientos de fuerza iónica o pH. Es muy probable que este hecho limite técnicamente la determinación de las actividades de alginato liasas en *A. vinelandii* empleando una sola condición de cultivo y las mismas condiciones de ensayo.

Nuestra hipótesis de trabajo propone que el aumento en el PM del alginato producido por la mutante *mucG* es debido a un efecto sobre la actividad del complejo alginato polimerasa e independiente de la actividad alginato liasa. Con el objeto de evaluar de manera general la función de la proteína MucG y particularmente su efecto sobre la expresión de las liasas o de enzimas para la síntesis de alginato nos propusimos definir el regulón de la proteína MucG mediante ensayos proteómicos.

## 6.8 Proteoma de las cepas AEIV y GG9 (*mucG*::Tn5)

La molécula c-di-GMP se ha descrito como una molécula que actúa a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. Con el objeto de identificar las proteínas cuya expresión se afecta por la proteína MucG decidimos realizar un análisis proteómico, tal y como se describe en Materiales y Métodos, utilizando extractos proteicos solubles de las mutantes GG9 (*mucG*::Tn5) y como control de la AEIV.

En la tabla 9 se muestran las proteínas cuya expresión se ve afectada en la cepa mutante GG9 en comparación con la cepa silvestre AEIV.

Tabla 9. Expresión relativa de proteínas de *A. vinelandii* en la mutante GG9 con respecto a la parental AEIV

Nombre de la proteína	Cambio en la expresión <sup>a</sup>	Número Avin
Thiolase	18	Avin_07370
FAD dependent oxidoreductase	13	Avin_41390
Delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase	13	Avin_03070
Mn-containing catalase	10	Avin_47080
universal stress protein	9.5	Avin_45150
glutamine amidotransferase	4.6	Avin_48870
conserved hypothetical protein	4.2	Avin_02300
dihydrolipoamide acetyltransferase	4.1	Avin_10790
lipoic acid synthetase	4	Avin_08460
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3.9	Avin_14580
Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	3.7	Avin_10760
septum site-determining protein MinD	3.4	Avin_35120
conserved hypothetical protein	3.1	Avin_46010
Enoyl-CoA hydratase/isomerase	3	Avin_13550
chromosome partition ParB	2.9	Avin_52240
translation initiation factor IF-1	2.9	Avin_28260
tyrosyl-tRNA synthetase	2.7	Avin_45990
GDP-mannose 6-dehydrogenase	2.5	Avin_10970
Rod-shape determining protein, MreB	2.3	Avin_12650

ABC transporter	2.3	Avin_40960
alginate lyase; Poly(beta-D-mannuronate) lyase	2.3	Avin_10900
cell division protein FtsA	2.3	Avin_13290
geranyltranstransferase	2.3	Avin_07880
small GTP-binding protein TypA	2.2	Avin_45830
Aldo/keto reductase	2.2	Avin_22370
acyl-CoA dehydrogenase	2.1	Avin_45920
Flagellin	0	Avin_27700
ComEA-related protein	0.05	Avin_20070
multidrug efflux pump RND-family outer membrane protein	0.05	Avin_51570
Chain A, Crystal Structure Of The C42d Mutant Of Azotobacter Vinelandii 7fe Ferredoxin (Fdi)	0.07	Avin_38650
conserved hypothetical protein	0.08	Avin_10400
Ribosomal protein L4/L1e	0.09	Avin_06260
Cobalamin synthesis protein	0.1	Avin_22980
integration host factor, alpha subunit	0.1	Avin_20480
metallo beta-lactamase-like protein	0.1	Avin_41150
Aminopeptidase, M18 family	0.2	Avin_35150
conserved hypothetical protein	0.2	Avin_14770
Conserved hypothetical protein	0.2	Avin_29860
conserved hypothetical protein	0.2	Avin_20130
NifX	0.3	Avin_01480
KHG/KDPG aldolase	0.3	Avin_34340
Regulator of ribonuclease activity A, RraA	0.3	Avin_23290
ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	0.4	Avin_13060
acyl-CoA dehydrogenase	0.4	Avin_25210
Metallo-dependent hydrolase	0.4	Avin_42330
putative phasin protein PhbP	0.4	Avin_23670

---

<sup>a</sup> Razón de nivel expresión de la mutante GG9 vs AEIV

Dentro de todas las proteínas identificadas en este análisis proteómico, encontramos 2 proteínas involucradas en la síntesis de alginato, AlgD y AlgL. AlgD cataliza la conversión de GDP-manosa a ácido GDP-manurónico, esta conversión se ha descrito como el paso limitante de la biosíntesis de alginato (Hay *et. al.*, 2013). Por lo tanto, la sobreexpresión de AlgD aumentaría el flujo de carbono hacia la biosíntesis de alginato y se tendría una cepa que produce más alginato que la cepa parental, tal y como sucede con las mutantes *mucG*. De alguna manera, los niveles elevados de c-di-GMP activan de manera directa o indirecta la transcripción del gen *algD* o aumentan la traducción de su mensajero para mantener elevados niveles de la proteína.

Por otro lado, la expresión de la alginato liasa periplásmica AlgL también aumenta en la mutante GG9 lo cual es un resultado aparentemente contradictorio ya que esta mutante muestra PM elevados con respecto a la cepa silvestre (figura 10). AlgL, junto con otras proteínas, como AlgX, AlgK, y AlgG, conforma un andamiaje periplásmico por el que se transfiere la cadena nascente de alginato al poro de exportación localizado en la membrana externa (ver figura 4). El gen *algL* está localizado en el grupo de genes biosintéticos *alg* el cual está encabezado por el gen *algD* y en donde también se encuentran los genes *algX*, *algK*, *algG*, y los genes del complejo polimerasa *alg8* y *alg44*. Es probable que en la mutante *mucG* GG9 la expresión de todo este grupo de proteínas, incluyendo a AlgL, se favorezca por el incremento en las pozas de c-di-GMP, lo que explicaría el aumento en la producción de alginato. Así mismo estos resultados apoyan mas la propuesta de que estas pozas de c-di-GMP ejercen un efecto positivo sobre la actividad del complejo alginato polimerasa Alg44-Alg8 aumentando el grado de polimerización de alginato y el PM del polímero final. Alternativamente otra explicación al incremento en el PM del alginato sería la existencia de una señal que activara a AlgL o a alguna otra liasa y que dicha señal no se genera o es bloqueada por los niveles elevados de c-di-GMP en la cepa GG9, como se mencionó anteriormente.

Como se observa en la Tabla 9, MucG también parece tener un efecto sobre otros procesos celulares, por ejemplo, el ciclo celular, donde participan la proteína FtsA cuya función en este proceso la cumple junto a FtsZ en la formación del anillo Z en la posición media de la célula, previa a la invaginación del septo durante la división celular (Michie, 2006). En la formación de este anillo Z interviene la proteína MinD la cual se encarga de inhibir la polimerización de FtsZ en la región polar de la célula por dividirse por lo que restringe la formación del septo en la parte media de la célula (Conti, 2015). ParB es una proteína involucrada en procesos de condensación del DNA, así como en la segregación correcta del mismo durante la división celular y en la segregación de algunos plásmidos (Taylor, 2015). Otra proteína que también se ha relacionado con la correcta segregación de los cromosomas es MreB, sin embargo, se cree que es una proteína involucrada en determinar la forma circular de la célula, además de estar involucrada en la localización de las enzimas encargadas de sintetizar la pared celular (Michie, 2006). Estas 4 proteínas se encuentran sobreexpresadas en la mutante GG9, por lo tanto, estos procesos muy probablemente se encuentran regulados por c-di-GMP.

Dentro de las proteínas con expresión disminuida en la mutante GG9 se encuentra RraA, cuya función reportada es la de inhibir la actividad de la ribonucleasa E (RNasa E). RNasa E tiene una papel clave en la degradación de mRNAs (Lee *et. al.*, 2003), por lo cual, aquellos mensajeros blancos de RNasa E se ven afectados negativamente en estas

condiciones donde los niveles de RraA se encuentran disminuidos. Posiblemente, en la mutante GG9 se tendría una mayor actividad de RNasa E comparada con la cepa silvestre AEIV, por lo que una mayor actividad de RNasa E correlaciona con una mayor producción específica de alginato. Establecer el mecanismo molecular de esta relación de RNasa E con la producción específica de alginato requiere de un estudio más profundo, sin embargo, podríamos proponer que el transcrito de RsmA, un represor de la traducción de *algD* (Manzo *et. al.*, 2011), es un blanco de RNasa E lo que explicaría niveles elevados de la proteína AlgD, así como el fenotipo de sobreproducción de alginato.

En la tabla 9 se observa una aparente respuesta al estrés como lo indican las siguientes proteínas sobreexpresadas: proteína de estrés universal, una catalasa y TypA, esta última se ha descrito como un regulador global del estrés y virulencia, seleccionando la traducción de ciertos mensajeros (Micklinghoff *et. al.*, 2010). Una relación de esta proteína con la síntesis de alginato no se ha descrito aún en *A. vinelandii*, sin embargo no se descarta que intervenga en la traducción de los mensajeros de algunas proteínas que muy cercanamente impactan en el proceso de biosíntesis de alginato. Por otro lado, se ha descrito que *algD* se transcribe a partir de un promotor dependiente del factor transcripcional AlgU, el cual está involucrado en la expresión de genes que confieren resistencia al calor y al estrés oxidativo. Sería muy interesante determinar los niveles de expresión de *algU* en el fondo genético de la mutante *mucG::Tn5*.

La aparición de proteínas sobreexpresadas relacionadas con  $\beta$ -oxidación como es el caso de enoil-CoA hidratasa/isomerasa y la acil-CoA deshidrogenasa probablemente sea una señal de un redireccionamiento en el flujo de carbono. También se encuentra sobreexpresada la sintetasa de ácido lipoico necesario para la función catalítica de la dihidrolipoamida acetiltransferasa que interviene en el metabolismo del piruvato, convirtiéndolo en acetil-CoA el cual es dirigido al ciclo del ácido tricarbóxico para ser convertido en oxalacetato que mediante gluconeogénesis es convertido en fructosa-6-fosfato. De la ruta de gluconeogénesis se encuentra sobreexpresada la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El metabolismo de algunos aminoácidos también se ve afectado por MucG y muy probablemente por los niveles de c-di-GMP, como lo indica la sobreexpresión de  $\Delta$ -1-pirrolina-5-carboxilato reductasa involucrada en el metabolismo de prolina y lisina, y la Glu/Leu/Phe/Val deshidrogenasa cuya función es la desaminación reductiva de los aminoácidos a sus respectivos 2-oxoácidos e ion amonio. También se encuentra la enzima glutamina amidotransferasa cuyo sustrato es glutamina y la convierte en glutamato al mismo tiempo que transfiere el grupo amonio a otros esqueletos carbonados.

Dentro de las proteínas que disminuyen su expresión en la mutante GG9 se encuentra FliC, mejor conocida como flagelina, esta proteína forma parte del flagelo involucrado en la motilidad de *A. vinelandii*. Este dato está acorde a la abundante existencia de reportes donde mencionan que c-di-GMP afecta de manera negativa a la motilidad, inhibiendo la transcripción de los genes flagelares y concuerda con nuestra propuesta de que en la mutante *mucG* GG9 los niveles de c-di-GMP son elevados con respecto a la cepa silvestre.

Otra proteína interesante es ComEA, la cual es una proteína relacionada con la competencia de *A. vinelandii*. La disminución de esta proteína en la mutante GG9 podría ser la razón por la cual tuvimos serios problemas para transformar la cepa GG9.

Por otro lado, probablemente el estado redox, así como la cadena respiratoria de electrones se ve alterada en la mutante GG9 como se aprecia en la sobreexpresión de una oxidorreductasa dependiente de FAD y la disminución de una ferredoxina y una subunidad Fe-S de ubiquinol-citocromo c reductasa, propiciando un cambio en los niveles del estado redox de la ubiquinona, de la cual ya se ha descrito que la disminución en los niveles de ubiquinona correlacionan con niveles elevados de producción específica de alginato (Nuñez *et. al.*, 2012) tal y como sucede con la mutante GG9.

Otro resultado muy llamativo es la disminución de una acil-CoA deshidrogenasa y de la KHG/KDPG aldolasa (2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato). La primera porque otra acil-CoA deshidrogenasa aumenta su expresión, esto muy probablemente se deba a que ambas están involucradas en el proceso de  $\beta$ -oxidación y realicen la misma función dentro de la ruta, solo que en diferentes condiciones, es decir, su expresión depende de señales diferentes. La segunda, la aldolasa, es una proteína de la ruta de Entner-Doudoroff, ruta por la cual se metaboliza la glucosa. Sin embargo, existe otras 2 aldolasas en el genoma de *A. vinelandii*, una de ellas se encuentra río abajo del gen *pgl* cuyo producto es la enzima 6-fosfoglutonolactonasa que interviene antes que la aldolasa en la ruta de Entner-Doudoroff. Aquí nos encontramos con otro caso como el anteriormente mencionado, estas son proteínas cuya expresión depende de señales diferentes y bajo el control de c-di-GMP.

Como se puede apreciar en la tabla son diversos los procesos en los cuales interviene el c-di-GMP, algunos se pueden relacionar con la biosíntesis de alginato y otros se modificaron independientemente del alginato. Sin embargo, es importante mencionar que c-di-GMP interviene en una cascada de regulación que va más allá del proceso de biosíntesis de alginato, ya que afecta motilidad, competencia y estrés oxidativo. Además, es interesante observar que proteínas hipotéticas cuya función se desconoce también cambian su expresión en ausencia de MucG, probablemente estas proteínas estén involucradas en los procesos aquí afectados.

## 7. CONCLUSIONES

- 1) En *A. vinelandii* la proteína señalizadora MucG ejerce un efecto negativo en la síntesis de alginato y en su PM, para lo cual es necesario su dominio EAL activo.
- 2) El PM del alginato en la cepa silvestre AEIV está controlado dentro de un rango de VTO, este control está mediado por la proteína MucG muy probablemente controlando su actividad fosfodiesterasa.
- 3) La proteína señalizadora MucG tiene efectos en la expresión de proteínas involucradas con otros procesos celulares además de la biosíntesis de alginato.

## **8. PERSPECTIVAS**

- 1) Confirmar el efecto de la proteína MucG en las pozas intracelulares de c-di-GMP
- 2) Demostrar que el dominio EAL de MucG posee actividad PDE
- 3) Investigar la funcionalidad del dominio GGDEF en la proteína MucG
- 4) Investigar la funcionalidad del dominio PAS en la proteína MucG
- 5) Confirmar el efecto de MucG sobre la expresión de otras proteínas en los procesos de motilidad, competencia, estrés oxidativo etc. derivados del análisis proteómico.



## 9. REFERENCIAS

Baker, P., Ricer, T., Moynihan, P. J., Kitova, E. N., Walvoort, M.T., Little, D.J., Whitney, J. C., Dawson, K., Weadge, J. T., Robinson, H., Ohman, D.E., Codée, J.D., Klassen, J. S., Clarke, A. J. and Howell, P. L. 2014. *P aeruginosa* SGNH hydrolase-like proteins AlgJ and AlgX have similar topology but separate and distinct roles in alginate acetylation. PLoS Pathog 10(8): e1004334.

Bakkevig, K., Sletta, H., Gimmestad, M., Aune, R., Ertesvåg, H., Degnes, K., Christensen, B. E., Ellingsen, T. E. and Valla, S. 2005. Role of the *Pseudomonas fluorescens* Alginate Lyase (AlgL) in Clearing the Periplasm of Alginates Not Exported to the Extracellular Environment. Journal of bacteriology. 187: 8375–8384.

Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Chang, A. L., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikan, D., Benziman, M. and Guille-Gonzalez, M. A. 2001. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. Biochemistry. 40:3420-3426.

Cheetham, N. W. H. and Punruckvong, A. 1985. An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. Carbohydr polym. 5:399-406.

Conti, J., Viola, M. G. and Camberg, J. L. 2014. The bacterial cell division regulators MinD and MinC form polymers in the presence of nucleotide. FEBS Letters 589:201-206.

Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G. and Guilles-Gonzalez, M. A. 2000. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. Biochemistry. 39:2685-2691.

Díaz-Barrera, A., Peña, C. and Galindo, E. 2007. The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. Appl Microbiol Biotechnol 76:903-910.

Díaz-Barrera, A., E. Soto, and C. Altamirano. 2012. Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. J Ind Microbiol Biotechnol 39:613-21.

Ertesvåg, H., Erlie, F., Skjåk-Braek, G., Rehm, B. H. and Valla, S. 1998. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *azotobacter vinelandii* alginate lyase. J. Bacteriol. 180:3779-3784.

Farrell, E. K. and Tipton, P. A. 2012. Functional characterization of AlgL, an alginate Lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry. 51:10259-10266.

- Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C. and Galindo, E. 2013. Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology* 53:85-91.
- Frankiln, M. J. and Ohman, D. E. 2002. Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 184:3000-7.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D. and Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* 6:7.
- Galperin, M. Y. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology*. 6:552-567.
- Gimmestad, M., Ertesvåg, H., Heggeset, T. M., Aarstad, O., Svanem, B. I. and Valla, S. 2009. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, ones of which is involved in cyst germination. *Journal of bacteriology*. 191:4845-4853.
- Guilles-Gonzalez, M. A, Gonzalez, G. and Perutz, M. F. 1995. Kinase activity of oxygen sensor FixI depends on the spin state of its heme iron. *Biochemistry*. 34, 232-236.
- Guilles-Gonzalez, M. A. and Gonzalez, G. 2004. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *Journal of applied physiology*. 96:774-783.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166: 557 – 580.
- Hay, I. D., Remminghorst, U. and Rehm, B. H . 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 75:1110-20.
- Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Moradali, M. F., Wang, Y. and Rehm, B. H. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*. 6:637-650.
- Hefti, M. H., François, K. J., de Vries, S. C., Dixon, R. and Vervoort, J. 2004. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur. J. Biochem*. 271:1198-1208.
- Hernández, R. M., Orive, G., Murua, A. and Pedraz, J. L. 2010. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62:711-730.
- Jain, S. and Ohman, D. E. 2005. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 73: 6429–6436.
- Jedrzejewski, M. J. 2000. Structural and functional comparison of polysaccharide-degrading enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35:221–251.

- Kennedy C, Rudnick P, MacDonald ML et al. (2005) Genus III. *Azotobacter Beijerinck* 1901, 567a. In: Brenner DJ, Noel RK, Staley JT and Garrity GM (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology—The Proteobacteria*, pp. 384–402. Springer, New York, NY.
- Knutson, C. A. and Jeanes, A. 1968. A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Anal Biochem* 24:470–481.
- Lee, K., Zhan, X., Gao, J., Qiu, J., Feng, Y., Meganathan, R., Cohen, S. N. and Georgiou, G. 2003. RraA: a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* 114:623-634.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velázquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L. E., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. and Catañeda, M. 2011. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 21:147-159
- Maier, Ulrike and Büchs, Jochen. 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical engineering Journal*. 7:99-106.
- Merighi, M., V. T. Lee, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and S. Lory. 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 65:876-95.
- Michie, K. A. and Löwe J. 2006. Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Biochem.* 75:467-92.
- Micklinghoff, J. C., Schmidt, M., Geffers, R., Tegge, W. and Bange, F. C. 2010. Analysis of expression and regulatory functions of the ribosome-binding protein TypA in *Mycobacterium tuberculosis* under stress conditions. *Arch Microbiol* 192:499-504.
- Moradali, M.F., Donati, I., Sims, I.M., Ghods, S. and Rehm, B. H. A. 2015. Alginate polymerization and modification are linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 6(3):e00453-15.
- Núñez, C., Peña, C., Kloeckner, W., Hernández-Eligio, A., Bogachev, A. V., Moreno, S., Guzmán, J., Büchs, J., and Espín, G. 2012. Alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* is increased by reducing of intracellular production of ubiquinone. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-012-4329-0.
- Page, W. J. and Sadoff, H. L. 1976. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*. 125(3):1080.
- Peña, C., Campos, N. and Galindo, E. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:510-515.
- Ponting, C. P. and Aravind, L. 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Current biology*. 7:R674-R677.

Quandt, F. and Hynes, M. F. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*. 127: 15 – 21.

Rodgers, K. R. 1999. Heme-based sensor in biological systems. *Current opinion in chemical biology*. 3:158-167.

Römling, U., Galperin, M. Y. and Gomelsky, M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77:1-52.

Roy, A. B., Petrova, O. E. and Sauer, K. 2012. The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *Journal of Bacteriology*. 194:2904-2915.

Segura, D., Núñez, C. and Espín, G., 2014. *Azotobacter* cysts. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chicester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000295.pub2.

Setubal, J. C. et al. 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*. 191:4534-4545.

Simon, R., Priefer, U.B. and Puhler, A. 1983. A broad host range system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology*. 1: 784 – 791.

Steiner, S., Lori, C., Boehm, A. and Jenal, U. 2013. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *The EMBO Journal*. 32:354-368.

Svanem, B. I. G., Skjåk-Braek, G., Ertesvåg, H. and Valla, S. 1999. Cloning and expression of the three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5-epimerases. *Journal of Bacteriology*. 181:68-77.

Svanem, B. N. G., Strand, W. I., Ertesvag, H., Skjåk-Braek, G., Hartmann, M., Barbeyron, T. and Valla, S. 2001. The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *The journal of biological chemistry*. 276:31542-31550.

Taylor, B. L. and Zhulin, I. B. 1999. PAS domain: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:479-506.

Taylor, J. A., Pastrana, C. L., Butterer, A., Pernstich, C., Gwynn, E. J., Sobott, F., Moreno-Herrero, F. and Dillingham, M. S. 2015. Specific and non-specific interactions of ParB with DNA: implication for chromosome segregation. *Nucleic Acids Research*. 43(2):719-731.

Trujillo-Roldán, M., Moreno, S., Segura, D., Galindo, E. and Espín, G. 2003. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:733-737.

Trujillo- Roldán, M. A., Moreno, S., Espín, G. and Galindo, E. 2004. The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:742-747.

Tuckerman, J. R. Gonzalez, G., Sousa, E. H. S., Wan, X., Saito, J. A., Alam, M. and Guille-Gonzalez, M. A. 2009. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry.* 48:9764-9774.

Whitney, J. C. and Howell, P. L. 2013. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology.* 21:63-72.

Wong, T. Y., Preston, L. A. and Schiller, N. L. 2000. Alginate Lyase: Review of major sources and enzyme. Characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:289-340.

Zhulin, I. B., Taylor, B. L. and Dixon, R. 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22:331-333.

## 10. APÉNDICE

### 10.1 Proteoma de las cepas JG501 y AEIV

También se realizó el proteoma de la cepa JG501. Las condiciones utilizadas para esta cepa fueron exactamente las mismas que las descritas en Materiales y Métodos para la mutante GG9. Desde la inoculación de los matraces hasta la obtención de los extractos proteicos. En la tabla 10 se muestran las proteínas cuya expresión cambió en el fondo de las mutante JG501.

Tabla 10. Expresión relativa de proteínas de *A. vinelandii* en la mutante JG501 con respecto a la parental AEIV.

Nombre de la proteína	Cambio en la expresión <sup>a</sup>	Número Avin
Thiolase	19	Avin_20130
FAD dependent oxidoreductase	13	Avin_41390
dihydrolipoamide acetyltransferase	6.9	Avin_10790
glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase, isomerizing	5.1	Avin_51890
ATP-dependent RNA helicase, DEAD box family	4.6	Avin_03540
acyl-CoA dehydrogenase	4.4	Avin_10680
DEAD/DEAH box ATP-dependent RNA helicase	4.4	Avin_10010
hypothetical protein Avin_11010	3.8	Avin_11010
chromosome partition ParB	3.8	Avin_52240
cytochrome bd	3.8	Avin_19910
septum site-determining protein MinD	2.8	Avin_35120
GDP-mannose 6-dehydrogenase	2.7	Avin_10970
Glycyl-tRNA synthetase protein, beta subunit	2.5	Avin_00100
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.2	Avin_14580
Flagellin	0.04	Avin_27700
ComEA-related protein	0.08	Avin_20070
Regulator of ribonuclease activity A, RraA	0.3	Avin_23290
conserved hypothetical protein	0.4	Avin_36910
conserved hypothetical protein	0.4	Avin_20130

<sup>a</sup> Razón de nivel expresión de la mutante JG501 vs AEIV

En este proteoma se obtuvieron un total de 20 proteínas, menos de la mitad de las encontradas en el proteoma de la mutante GG9. Sin embargo, la mayoría de las proteínas identificadas en este proteoma también se encuentran en el proteoma de la GG9, como era de esperarse. Las diferencias podrían explicarse con algún posible deterioro de la muestra antes de realizarse el análisis. Estos proteomas confirman el efecto de MucG sobre otros procesos celulares además de la síntesis de alginato.