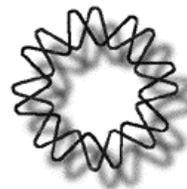




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GENÉTICA DE *arsA* EN
Azotobacter vinelandii

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

BIÓL. YANET ROMERO RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL G. SEGURA GONZÁLEZ.

CUERNAVACA, MORELOS.

Marzo 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
I. Resumen	i
II. Introducción	
II. 1 Características y ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
II. 2 Alquilresorcinoles en <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
II. 3 Importancia de los alquilresorcinoles	4
II. 4 Biosíntesis de alquilresorcinoles en <i>Azotobacter vinelandii</i>	7
II. 5 Regulación del proceso de enquistamiento	9
II. 5. 1 Factores sigma	10
II. 5. 2 Reguladores transcripcionales	11
II. 5. 3 Familia LysR	11
II. 5. 4 Sistema de dos componentes GacS/GacA	13
II. 5. 5 Sistema CsrA/CsrB	15
III. Antecedentes	
III. 1 Identificación de genes biosintéticos de alquilresorcinoles	18
III. 2 Reguladores posiblemente involucrados en la expresión de genes biosintéticos de alquilresorcinoles en <i>Azotobacter vinelandii</i>	19
III. 2. 1 Gen <i>algU</i>	20
III. 2. 2 Gen <i>rpoS</i>	20
III. 2. 3 Sistema de dos componentes GacS/GacA	21
III. 2. 4 Gen <i>arsR</i>	22
III. 2. 5 Sistema RsmA/RsmB	22
IV. Hipótesis	24
V. Objetivos	
V. 1 Objetivo general	26
V. 2 Objetivos particulares	26
VI. Estrategia experimental	27

VII. Materiales y métodos	27
VII. 1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i>	31
VII. 2 Amplificación de <i>arsR</i> por PCR	31
VII. 3 Reacciones de digestión de ADN	33
VII. 4 Reacciones de ligación	33
VII. 5 Electroforesis de ADN	35
VII. 6 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método de CaCl ₂	35
VII. 7 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método de CaCl ₂	36
VII. 8 Extracción de ADN plasmídico (“Miniprep”)	36
VII. 9 Determinación de actividad de β-glucuronidasa	37
VII. 10 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	38
VII. 11 Cuantificación de alquilresorcinoles	38
VII. 12 Caracterización fenotípica sobre producción de alquilresorcinoles de las mutantes en <i>A. vinelandii</i>	40
VII. 13 Extracción de ADN cromosomal de <i>A. vinelandii</i>	40
VII. 14 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	41
VII. 15 Transformación de <i>A. vinelandii</i>	42
VII. 16 Secuenciación de plásmidos	42
VII. 17 Purificación de ARN total de <i>A. vinelandii</i>	43
VII. 18 Síntesis de ADN complementario	44
VII. 19 Reacción en cadena de la polimerasa-tiempo real	45
VII. 20 Expresión de <i>ArsR</i> en sistema de <i>E. coli</i>	45
VII. 21 Preparación de muestras de proteína	46
VII. 22 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	46
VII. 23 Western blot	48
VIII. Resultados y discusión	
VIII. 1 Expresión diferencial de <i>arsA</i>	50
VIII. 2 Reguladores de la expresión de <i>arsA</i> : transferencia de las mutaciones en los genes <i>gacA</i> , <i>arsR</i> y <i>rpoS</i> a la cepa SW136	54
VIII. 3 Fenotipos de las mutantes UW136, YRG5, YRR7 y YRS9 en la producción de alginato y poli-β-hidroxibutirato	55
VIII. 4 Fenotipos de las mutantes UW136, YRG5, YRR7 y YRS9 en la producción de alquilresorcinoles	56
VIII. 5 Expresión de <i>arsA</i> en las cepas SW136, UW136, YRG5, YRR7 y YRS9 de <i>A. vinelandii</i>	58
VIII. 6 Expresión de <i>arsR</i> en las cepas SW136, UW136, YRG5 y YRS9 de <i>A. vinelandii</i>	60
VIII. 7 <i>GacA</i> no regula la expresión de <i>rpoS</i> en la cepa SW136	62

VIII. 8 El sistema de regulación postranscripcional RsmA/RsmB controla la síntesis de alquilresorcinoles	65
VIII. 9 Modelo propuesto de regulación genética de <i>arsA</i> en <i>Azotobacter vinelandii</i>	68
IX. Conclusiones	72
X. Perspectivas	73
XI. Bibliografía	74
XII. Apéndice	
XII. 1 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%	81
XII. 2 Determinación de actividad de β -glucuronidasa	81
XII. 3 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	81
XII. 4 Cuantificación de alquilresorcinoles	82
XII. 5 Extracción de ADN cromosomal de <i>A. vinelandii</i>	82
XII. 6 Expresión de ArsR en <i>E. coli</i>	83
XII. 7 Electroforesis de proteína en gel de acrilamida al 12%	83
XII. 8 Western Blot	85
Índice de figuras	
Fig. 1 Ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i>	2
Fig. 2 Estructura de los alquilresorcinoles aislados de quistes de <i>A. vinelandii</i>	5
Fig. 3 Estructura de las alquilpironas aisladas de quistes de <i>A. vinelandii</i>	6
Fig. 4 Micrografías electrónicas de quistes de cepa silvestre y cepa mutante teniendo síntesis de alquilresorcinoles abatida de <i>A. vinelandii</i>	7
Fig. 5 Ruta propuesta para la biosíntesis de alquilresorcinoles en <i>A. vinelandii</i>	8
Fig. 6 Modelo de la ruta de transducción de señales del sistema GacS/GacA	15
Fig. 7 Modelo de regulación postranscripcional ejercido por CsrA/CsrB sobre el ARNm <i>glgCAP</i> para reprimir la síntesis de glicógeno	17
Fig. 8 Distribución de los genes de <i>A. vinelandii</i> que intervienen en la síntesis de alquilresorcinoles	18
Fig. 9 Modelo hipotético de regulación de la expresión de los genes <i>arsR</i> y <i>arsA</i>	25
Fig. 10 Estrategia experimental	28

Fig. 11 Amplificación por PCR de <i>arsR</i>	32
Fig. 12 Clonación de <i>arsR</i> en pBAD/His-A	34
Fig. 13 Región secuenciada del plásmido pYRC6	43
Fig. 14 Electroforesis de proteínas de muestras recuperadas antes y después de la inducción con arabinosa	47
Fig. 15 Western blot de proteínas de muestras recuperadas antes y después de la inducción con arabinosa	49
Fig. 16 Expresión del gen <i>arsA</i> en la cepa OV11	51
Fig. 17 Producción de alquilresorcinoles y enquistamiento en la cepa SW136	52
Fig. 18 Fenotipos sobre producción de alquilresorcinoles de mutantes obtenidas en fondo SW136	57
Fig. 19 Cuantificación de alquilresorcinoles de SW136 (WT) y las cepas mutantes	58
Fig. 20 Expresión del gen <i>arsA</i> en la cepa SW136 (WT) y en las cepas mutantes	60
Fig. 21 Expresión del gen <i>arsR</i> en la cepa SW136 (WT) y en las cepas mutantes	61
Fig. 22 Crecimiento y expresión de <i>rpoS</i> de la cepa SW136	60
Fig. 23 Expresión de <i>rpoS</i> en SW136 (WT) y cepa mutante YRG5	61
Fig. 24 Fenotipos sobre producción de alquilresorcinoles de la cepa SW136 (WT) y de las mutantes YRA11 (<i>rsmA</i> -) y YRB13	66
Fig. 25 Cuantificación de alquilresorcinoles de SW136 (WT) y las cepas mutantes YRA11 (<i>rsmA</i> -) y YRA13 (<i>rsmB</i> -)	67
Fig. 26 Modelo de regulación genética de <i>arsR</i> y <i>arsA</i> propuesto	71

Índice de tablas

Tabla 1. Familias de reguladores transcripcionales de procariontes	12
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo	29
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo	30
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	30

Índice de abreviaturas

ACP: significado en inglés **A**cy **C**arrier **P**rotein domain, en español, dominio de una proteína acarreadora de acilos.

AcNA: acetato de sodio.

AcK: acetato de potasio.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AP1: 6-heneicosil-4-hidroxi-2-pirona.

AP2: 4-hidroxi-6-(2'-oxotricosil)-2-pirona.

ARN: ácido ribonucleico.

AR'S: alquilresorcinoles.

AR1: alquilresorcinoles 5-n-heneicosilresorcinol y 5-n-tricosilresorcinol.

AR2: alquilresorcinoles 5-n-heneicosilresorcinol y 5-n-tricosilresorcinol galactosidados.

BHB: β-hidroxibutirato.

BSA: Albúmina de suero bovino.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

DBD: significado en inglés, DNA- binding domain, en español, dominio de unión a ADN.

DEPC: dietilpirocarbonato.

D.O: densidad óptica.

EDTA: Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético.

EMSA: significado en inglés **E**lectroforetic **M**obility gel **S**hift **A**ssay; en español, ensayo de retardamiento.

gm^r: resistencia a gentamicina.

HTH: significado en inglés helix-turn-helix domain, en español, dominio helice-vuelta-helice.

km^r: resistencia a kanamicina.

LB: medio luria Bertani

LTTRs: por sus siglas en inglés **LysR Transcriptional Regulators**, significado en español, reguladores transcripcionales de la familia LysR.

MPM: marcador de peso molecular.

nal^r: resistencia a ácido nalidíxico.

PBS: buffer de fosfatos.

PHB: poli- β -hidroxibutirato.

PKS: policétido sintasa.

PNPG: p-nitrofenil- β -D-glucurónido.

rif^r: resistencia a rifampicina.

rpm: revoluciones por minuto.

SDS: dodecilsulfato sódico.

sp^r: resistencia a espectinomicina.

TE: solución Tris-EDTA.

TRIS: dibromo -2,3 propilo.

El presente trabajo se realizó en el departamento
de Microbiología Molecular del Instituto de
Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección
del Dr. Daniel G. Segura González

*“Si he hecho descubrimientos invaluables
ha sido más por tener paciencia
que a cualquier otro talento”*

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elda Guadalupe Espín:

Mi más sincero agradecimiento por darme la oportunidad de haber trabajado en su grupo de investigación durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Daniel Segura: por haber sido un excelente tutor, por su gran apoyo, consejos y paciencia. Por haber dedicado parte de su tiempo en mi formación profesional, mil gracias.

A la Biól. Soledad Moreno y M. en C. Josefina Guzmán: por compartir sus conocimientos, por su apoyo y ayuda incondicional. Por sus consejos y conversaciones gracias.

A mi comité tutorial compuesto por:

Dr. José Luis Puente, Dr. Ernesto Pérez Rueda y Dr. Daniel Segura González, por sus buenas recomendaciones en cada tutorial.

Al jurado compuesto por:

Dra. Esperanza Martínez, Dr. Otto Geiger, Dr. Víctor Bustamante, Dr. Mario Soberon y Dr. Daniel Segura, por la revisión de la tesis.

A los integrantes de laboratorio:

A la Dra. Cinthia Nuñez, Dr. Renato León, M. en C. Alberto Hernández, Lic. Miguel Cocotl y I.B.Q. Nashbly Rosas por su apoyo, consejos y sincera amistad. A Eduardo Juárez, Rosalba González y Pablo Juárez por su eficiencia en el laboratorio.

Al CONACyT:

Por la beca otorgada, para realizar mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

A DIOS: por bendecirme y llenarme de fortaleza cada día.

A MI PADRES: Bernabe Romero y Esperanza Ramírez, por su grandísimo amor, apoyo y comprensión en todo momento. Los amo por estar siempre al pendiente de mí y por ayudarme a levantarme cuantas veces he decaído.

A MIS HERMANAS: Maricruz y Yadira por su paciencia y consejos. Por darme fortaleza y por ser parte de mi vida.

A DIEGO MI HERMOSO ENANO: por haber llegado en el justo momento y alegrarme la vida.

A MIS AMIGOS: Evelyn y Gaston por apoyarme en las buenas y malas situaciones, por darme siempre animo a seguir adelante y seguir siendo mis amigos a pesar de todo.

I. Resumen.

Azotobacter vinelandii es una bacteria que presenta un ciclo de vida característico, que comprende una fase vegetativa y una fase latente en forma de quiste. Los quistes son células rodeadas por una cápsula, que está formada por una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina. Cuando *A. vinelandii* entra a este proceso de diferenciación promueve un cambio de metabolismo de carbohidratos a metabolismo de lípidos, que resulta en la formación de una familia de 5-n-alquilresorcinoles (AR´S) y 6-n-alquilpironas. Estos lípidos se acumulan principalmente en la exina y en el cuerpo central del quiste y reemplazan los fosfolípidos que son comunes en células vegetativas. Se ha propuesto la ruta biosintética para estos lípidos, que involucra las enzimas codificadas por el operon *arsABCD*. Sin embargo, no hay información acerca de la regulación genética que controla la expresión de estos genes, para promover la producción de los alquilresorcinoles. Previamente se observó que el regulador transcripcional ArsR y reguladores globales como GacA, AlgU y RpoS controlan la producción de alquilresorcinoles, pero no se determinó a que nivel actúan. En este trabajo se estudió la regulación de la expresión del gen *arsA*, gen que encabeza el operon y que codifica para la primera enzima de la ruta biosintética. Se logró definir de qué manera los reguladores ArsR, GacA, AlgU y RpoS controlan la expresión de este gen. Se midió la expresión del gen *arsA* a través de una fusión transcripcional *arsA::gusA* en cromosoma, y mediante experimentos de reverso transcripción y PCR en tiempo real. Utilizando ambas metodologías se logró determinar que la síntesis de alquilresorcinoles se regula mediante el control transcripcional de la expresión de *arsA*, y que ambos procesos se llevan a cabo exclusivamente en células que entran en proceso de enquistamiento. También se determinó que ArsR, GacA y RpoS regulan positivamente la transcripción de *arsA*, mientras que AlgU regula negativamente. Se observó que el efecto de los reguladores globales GacA, AlgU y RpoS sobre la expresión de *arsA* es a través de controlar la expresión de su activador transcripcional, ArsR. Se determinó que en la cepa SW136 de *A. vinelandii*, la expresión de *rpoS* no es controlada por GacA, como ocurre en la cepa ATCC 9046, por lo que la regulación por GacA sería directa o a través de un tercer sistema de regulación. Se encontró que el sistema formado por RsmA/RsmB (CsrA/CsrB), reguladores recientemente encontrados en *A. vinelandii* controlan la producción de alquilresorcinoles, aunque no se ha determinado a que nivel regula la biosíntesis de estos lípidos. Nosotros sugerimos que podría ser a través de regular postranscripcionalmente la traducción de *arsR*.

II. Introducción.

II.1 Características y ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa de vida libre y fijadora de nitrógeno en condiciones aerobias. Sus células son ovoides de 2 x 5 μm de diámetro. Las células vegetativas presentan movilidad por la presencia de flagelos. Tiene un ciclo de vida característico que comprende una fase vegetativa y una fase latente en forma de quiste (Fig. 1). El proceso natural de diferenciación de *A. vinelandii* lleva a la formación de quistes maduros resistentes a la desecación (43), que pueden permanecer en estado de latencia por largos periodos de tiempo en el suelo, hasta que hay condiciones adecuadas para su germinación (23). Durante el proceso de enquistamiento las células pierden su locomoción y presentan una última división, adquiriendo una forma esférica. Se forma una cápsula alrededor de la célula y hay acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB), polímero de reserva que será utilizado en la germinación como fuente de carbono y energía. La cápsula que rodea al cuerpo central, está formada por una capa interna llamada intina, y una capa externa llamada exina, ambas compuestas principalmente por alginato, lípidos y proteínas (46). El enquistamiento se lleva a cabo aproximadamente en 5 días, resultando en la formación de quistes maduros de un tamaño de 1.5 a 2 μm de ancho. Cuando el quiste maduro entra en una etapa de germinación, existe una depolimerización de PHB, posteriormente la célula se divide y al empezar a

crecer, se fractura la exina y emergen dos células por cada quiste, perdiéndose de esta manera la cápsula (17, 48).

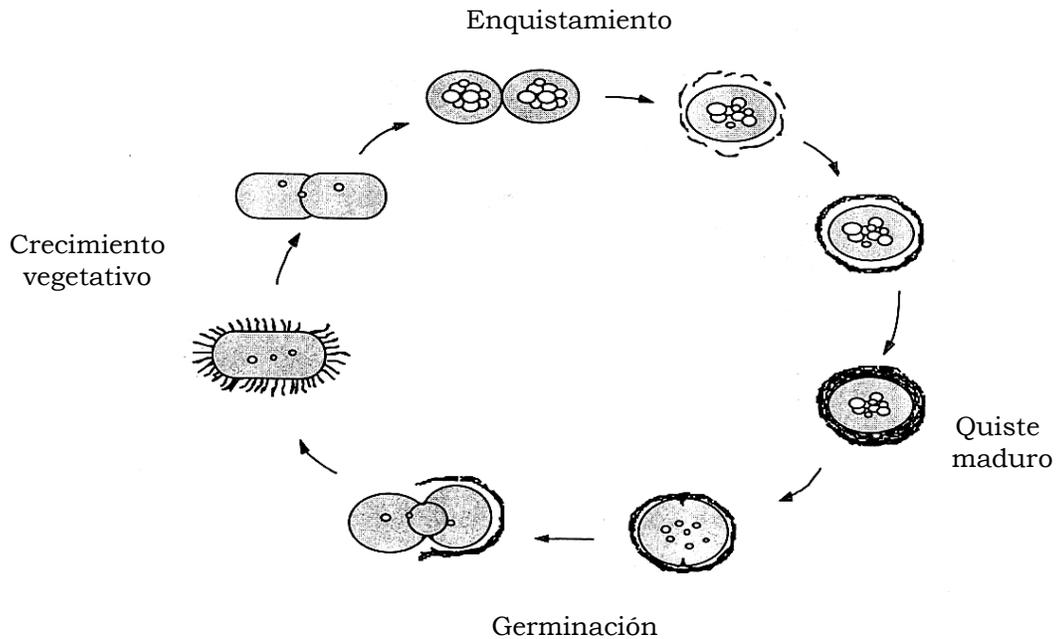


Fig. 1. Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii* (34).

A. vinelandii es interesante también por su capacidad para producir dos polímeros de importancia industrial: alginato y poli- β -hidroxibutirato (PHB). La producción de ambos polímeros está asociada al proceso de diferenciación (37). El alginato es un componente esencial de la cápsula del quiste y mutantes no productoras de alginato son incapaces de formar quistes maduros (40). El PHB se ha considerado importante en el proceso de enquistamiento ya que se acumula una gran cantidad en los quistes y

el porcentaje de enquistamiento se ha correlacionado con la cantidad de PHB acumulado (41). Además se puede inducir este proceso de diferenciación con metabolitos relacionados con el PHB como el β -hidroxibutirato (BHB) y el butanol (23, 33). Sin embargo, mutantes bloqueadas en la síntesis de PHB forman quistes morfológicamente normales y resistentes a la desecación, por lo que este polímero no es necesario para el enquistamiento (40). La célula latente en forma de quiste es capaz de sobrevivir en suelos secos por largos periodos de tiempo. En el enquistamiento inducido por BHB o n-butanol (23), hay un cambio de metabolismo de carbohidratos a metabolismo de lípidos que resulta en la formación de una familia de 5-n-alkilresorcinoles (AR'S) y 6-n-alkilpironas (34).

II.2 Alkilresorcinoles en *Azotobacter vinelandii*.

Los alquilresorcinoles (AR'S) son lípidos fenólicos homólogos de orcinol (1-3 dihidroxi 5-metil benceno) de cadenas laterales largas. Este tipo de lípidos están presentes tanto en animales como en plantas, teniendo mayor incidencia en algunas familias como son: Ginkgoaceae, Anacardiaceae y Gramineae. También se han reportado en 5 familias de algas y hongos, y se confirmó posteriormente la existencia de estos lípidos resorcinólicos en microorganismos, especialmente en las cepas de los géneros: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* y *Azotobacter* (21). Además de AR'S, *Azotobacter* sintetiza otros lípidos denominados 6-n-

alquilpironas con cadenas laterales de 19 y 21 carbonos, las cuales, junto con los AR´S, reemplazan los fosfolípidos de las membranas de las células vegetativas durante el proceso de enquistamiento (32-34) constituyendo ambos el 95% de lípidos en las membranas del quiste (34). En *A. vinelandii* los AR´S más abundantes son los 5-n-heneicosilresorcinol y 5-n-tricosilresorcinol (AR1) (Fig. 2) que contienen cadenas de 21 y 23 carbonos respectivamente, encontrándose en proporciones 7:1 y sus derivados galactosidados (AR2) también en la misma proporción (32). Las alquilpironas identificadas son la 6-heneicosil-4-hidroxi-2-pirona (AP1) y 4-hidroxi-6-(2'-oxotricosil)-2-pirona (AP2, fig. 3, ref. 29 y 34).

II.3 Importancia de los alquilresorcinoles.

Los alquilresorcinoles presentan diversas actividades, tales como antimicrobiales, antiparasíticos y citotóxicos dependiendo del organismo que lo produzca. En plantas, por ejemplo, los AR´S participan en la protección de las semillas evitando el ataque por hongos (21). La presencia de los AR´S en la membrana de los quistes cambia las propiedades fisicoquímicas de ésta, precisamente por contener cadenas alifáticas largas que hacen que estos lípidos sean prácticamente insolubles en agua, por lo que se ha propuesto que favorecen la resistencia a la desecación de los quistes (21). Sin embargo, pruebas de desecación utilizando mutantes incapaces de sintetizar AR´S, han mostrado que los AR´S no contribuyen de forma significativa a la resistencia a falta de agua de los quistes.

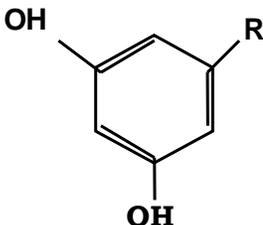
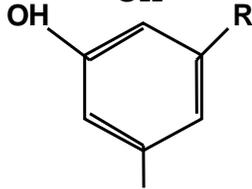
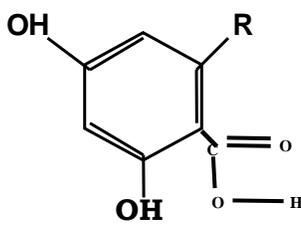
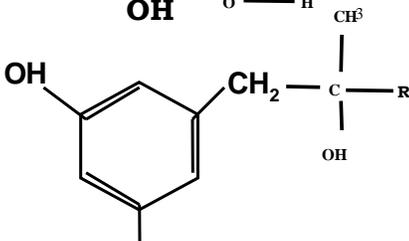
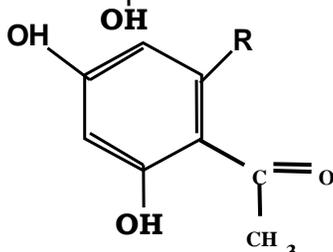
Estructura	Nombre de Laboratorio	R	Proporción
	AR1	C ₂₁ H ₄₃ C ₂₃ H ₄₇	87 13
	AR2	C ₂₁ H ₄₃ C ₂₃ H ₄₇	87 13
	AR3	C ₂₁ H ₄₃ C ₂₃ H ₄₇	1 1
	AR4	C ₁₉ H ₃₉ C ₂₁ H ₄₃	3 4
	AR5	C ₂₁ H ₄₃ C ₂₃ H ₄₇	6 4

Fig. 2. Estructura de los alquilresorcinoles aislados de quistes de *A. vinelandii* (34).

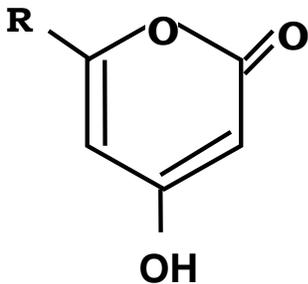
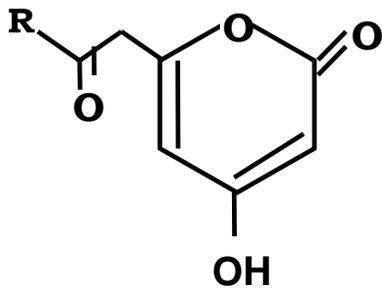
Estructura	Nombre Laboratorio	R	Proporción
	AP1	$C_{21}H_{43}$ $C_{23}H_{47}$	2 5
	AP2	$C_{19}H_{39}$ $C_{21}H_{43}$	1 1

Fig. 3. Estructura de las alquilpironas aisladas de quistes de *A. vinelandii* (34).

Además de formar parte de las membranas de los quistes, los AR'S son componentes de la cápsula, tal como lo demuestran estudios de distribución con marcaje, indicando que los AR'S se encuentran en cantidades iguales en la exina y en las membranas del cuerpo central del quiste y con sólo cantidades traza en la intina (33). En nuestro laboratorio, a través de microscopía electrónica realizada a quistes maduros de mutantes en donde la síntesis de AR'S está abatida, se observó que la

cápsula (exina) no está bien estructurada y sus componentes no están definidos en comparación con los quistes de las cepa silvestre (Fig. 4a). Las laminillas que se observan en quistes silvestres, y que están constituidas por AR´S, desaparecen en la cepa mutante (Fig. 4b). Se observó también que los quistes de las mutantes se aglutinan de manera que forman agregados por uniones entre las cápsulas (40). Así, los AR´S desempeñan un papel estructural en la cápsula de los quistes, aunque no son esenciales para la resistencia a desecación (32).

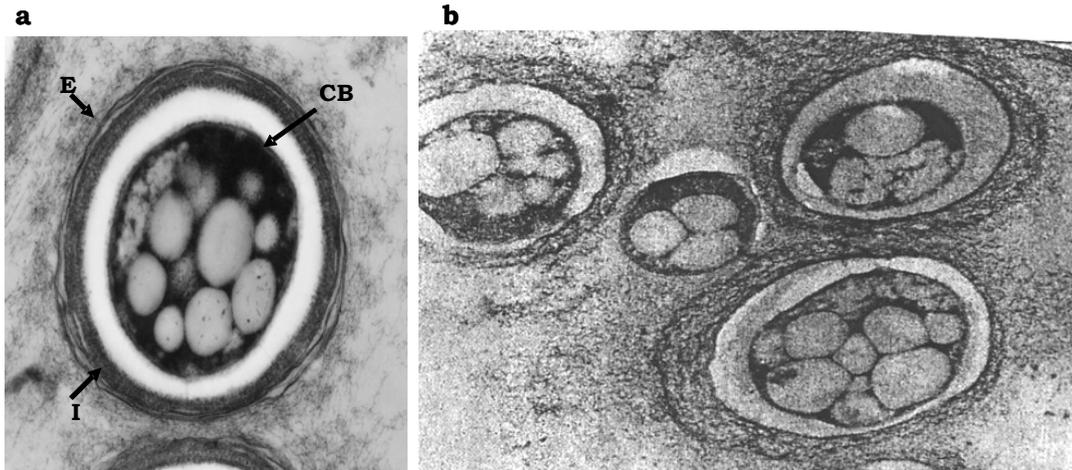


Fig. 4. Micrografías electrónicas de quistes de cepa silvestre (a) y cepa mutante teniendo síntesis de alquilresorcinoles abatida (b) de *A. vinelandii*. E=exina, I=intina, CB= Cuerpo central.

II.4 Biosíntesis de alquilresorcinoles en *Azotobacter vinelandii*.

Se ha propuesto una ruta biosintética de AR´S en *A. vinelandii* donde interviene un grupo de proteínas denominadas ArsA, ArsB, ArsC y ArsD. La ruta consiste en que ArsA junto con ArsD son responsables de la biosíntesis de ácidos grasos de 22 y 26 carbonos a partir de malonil-CoA.

El ácido graso sintetizado permanece unido al dominio ACP de ArsA y es transferido directamente a la cisteína del sitio activo de ArsB y ArsC. ArsB recibe el ácido graso de 22-26 carbonos directamente de ArsA y junto con 3 moléculas de malonil-CoA, sintetiza los 5-n-heneicosilresorcinoles por condensación aldólica entre C2 y C7, o bien, el sustrato es recibido por ArsC para la formación de 6-n-alkilpironas, utilizando 2 moléculas de malonil-CoA. ArsD cataliza la modificación postraduccional del dominio ACP (proteína acarreadora de acilos) de la proteína ArsA, uniendo covalentemente un “brazo” de 4-fosfopanteteína proveniente de malonil-CoA para de esta manera hacer funcional a ArsA para aceptar a sus sustratos (Fig. 5, ref. 2, 29).

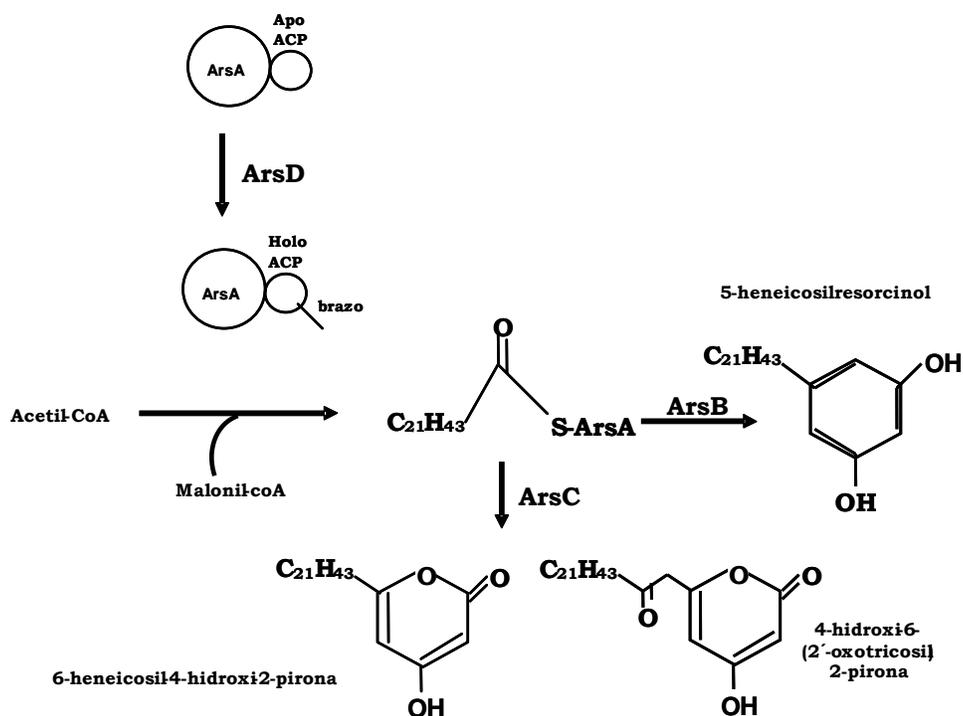


Fig. 5. Ruta propuesta para la biosíntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii* (27).

II. 5 Regulación del proceso de enquistamiento.

La síntesis de alquilresorcinoles se da durante el proceso de enquistamiento, guardándose una relación muy estrecha con este proceso de cambio morfofisiológico, del cual prácticamente no se tiene información en términos de su regulación. Los mecanismos de control genético que afectan la síntesis de AR´S podrían estar afectando también otros aspectos del proceso de enquistamiento.

Los procesos biosintéticos suelen estar sujetos a una cascada de regulación fina y altamente compleja con la finalidad de coordinar la expresión de genes que codifican para las proteínas reguladoras, las enzimas involucradas y otras proteínas necesarias para la obtención del producto final o metabolito.

En las cascadas de regulación usualmente están involucrados reguladores globales que participan en varios de los procesos celulares, incluso en algunos organismos hay mecanismos de regulación a nivel postranscripcional que llegan a ser determinantes en la expresión genética. Algunos ejemplos de reguladores maestros que están presentes en *A. vinelandii*, son el sistema de dos componentes GacS/GacA, los factores sigma AlgU y RpoS, y un tercer sistema global de regulación postranscripcional recientemente encontrado en *A. vinelandii* denominado RsmA/RsmB. Se ha demostrado que estos reguladores intervienen en el control de la síntesis de otros componentes del quiste, como son el poli- β -hidroxibutirato y el alginato.

II. 5. 1 Factores sigma.

Los factores sigma son subunidades importantes de la RNA polimerasa encargadas de reconocer secuencias promotoras de genes e iniciar su expresión. Hay varias familias de factores sigma que reconocen diferentes secuencias promotoras. Estos reguladores permiten la expresión de grupos de genes bajo las diferentes condiciones en la que se encuentra la célula; fase vegetativa, fase exponencial, fase estacionaria, condiciones de estrés o daño celular. Algunos ejemplos de factores sigma alternativos que se ha visto están involucrados en la expresión de componentes del quiste en *A. vinelandii* son AlgU y RpoS.

El gen *algU* también conocido como *algT*, *rpoE* o σ^{22} , codifica para un factor sigma descrito por el reconocimiento de promotores involucrados en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa* (14). Pertenece a la familia de factores sigma σ^E (σ^{32}) de otras bacterias, donde reconoce promotores de genes que participan en la reparación de daños por factores ambientales (12,13).

El gen *rpoS* codifica para el factor σ^s o σ^{38} el cual interviene en la expresión de un gran número de genes involucrados en diversas respuestas celulares: estrés osmótico, choque a temperaturas altas y bajas, y del estado de transición de fase exponencial a estacionaria en diversas bacterias (24). Se ha descrito también que este factor sigma desempeña un papel en la regulación de genes biosintéticos para alginato y PHB en *A. vinelandii* (31).

II. 5. 2 Reguladores transcripcionales.

Los reguladores transcripcionales son proteínas que están involucradas en el control de la expresión de sus genes blanco, actuando negativa o positivamente dependiendo el regulador y el sistema que será regulado. Comúnmente los reguladores se clasifican en familias, en base a criterios de similitud en la secuencia, estructura y función (11). En la tabla 1 se enlistan las familias de reguladores transcripcionales más importantes en bacterias.

II. 5. 3 Familia LysR.

Los reguladores transcripcionales de la familia LysR (LTTRs) son el tipo de reguladores positivos más comunes en procariotes (39). Se han identificado secuencias similares dentro de los LTTRs, cada miembro presenta un dominio Hélice-Vuelta-Hélice (HTH) de unión a ADN en el amino terminal, un dominio involucrado en el reconocimiento de co-inductores o de respuesta, y un dominio carboxilo terminal. Usualmente los LTTRs activan la transcripción de sus promotores blancos sólo en presencia de pequeñas moléculas señal (co-inductores). La mayoría de los miembros de esta familia tienen otras cuatro características: a) son proteínas de 276 a 324 residuos generalmente activadoras de la transcripción, b) se unen para regular su secuencia blanco en posiciones y motivos estructurales similares, c) comúnmente se transcriben de manera

Tabla 1. Familias de reguladores transcripcionales de procariontes (11, 39).

Familia	Acción	Algunas funciones que regula	*Motivo DBD	Posición
LysR	Activador/Represor	Metabolismo de nitrógeno y carbono	HTH	N-Terminal
AraC/XylS	Activador/Represor	Metabolismo de carbono, respuesta a estrés y patogénesis	HTH	C-Terminal
TetR	Represor	Biosíntesis de antibióticos, bombas de flujo, estrés oxidativo.	HTH	C-Terminal
LuxR	Activador	Sensado Quorum, biosíntesis y metabolismo	HTH	C-Terminal
LacI	Represor	Utilización de fuentes de carbono	HTH	N-Terminal
ArsR	Represor	Resistencia a metales	HTH	Central
IcIR	Represor/Activador	Metabolismo de carbono	HTH	N-Terminal
MerR	Represor	Resistencia y detoxificación	HTH	N-Terminal
AsnC	Activador/Represor	Biosíntesis de aminoácidos	HTH	N-Terminal
MarR	Activador/Represor	Resistencia a múltiples antibióticos	HTH	Central
NtrC	Activador	Asimilación de nitrógeno, síntesis de aminoácidos aromáticos, rutas catabólicas, flagelos, respuestas a fagos.		
OmpR	Activador	Metales pesados y virulencia		
DeoR	Represor	Metabolismo de azúcares	HTH	N-Terminal
GntR	Represor	Metabolismo general	HTH	N-Terminal
Crp	Activador/Represor	Respuestas globales, represión catabólica y anaerobiosis	HTH	C-Terminal

* DBD = DNA- binding domain

divergente a su gen blanco, d) debido a esto, controlan la transcripción de forma bidireccional. Los HTH de los LTRRs tienen residuos conservados (idénticos en el 70% de los LTRRs) los cuales son: Ala27, Thr(Ser)33, Gln34, Pro35, Ser(Thr)38, Leu44 y Glu45. Algunos ejemplos de reguladores de esta familia son: TrpI encontrado en *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* y *P. syringae*, que regula la transcripción de *trpBA*, que codifican una triptofano sintasa. OxyR en *E. coli* y *S. typhimurium*, que controla un regulón que interviene en respuesta a estrés oxidativo; CatR en *Pseudomonas putida*; CysB en *Klebsiella aerogenes*, y CatM en *Acinetobacter calcoaceticus*, entre muchos otros miembros (39). En *Azotobacter vinelandii* se identificó un gen denominado *arsR* que codifica para una proteína que presenta similitud con miembros de la familia LysR. La inactivación de *arsR* afecta negativamente la síntesis de AR´S (44).

II. 5. 4 Sistema de dos componentes GacS/GacA.

Los sistemas de regulación de dos componentes están ampliamente distribuidos entre bacterias y algunos organismos eucariontes. El sistema consiste en una cinasa sensora (GacS en el caso del sistema GacS/GacA) y un regulador de respuesta (GacA). GacS, también conocido como BarA, ExpS, VarS, ApdA, RepA, PheN o LemA (9), es un miembro de la subclase de cinasas sensoras tripartitas, que consisten de un dominio transmisor primario, un dominio central receptor y un dominio fosfotransferasa C-terminal. GacS detecta señales bióticas o abióticas que aun se desconocen,

y de esta manera sufre una autofosforilación en un residuo de histidina conservado (H1). Después el grupo fosfato (P) es transferido desde H1 a un residuo de aspartato (D) y luego a una segunda histidina (H2) de GacS, y posteriormente es transferido a un aspartato conservado del regulador transcripcional GacA, que de esta manera se activa y actúa sobre sus genes blanco (Fig. 6).

GacA (UvrY, ExpA, SirA, VarA), es un regulador de respuesta de la familia FixJ que contiene un motivo Hélice-vuelta-Hélice (HTH) involucrado en la unión a ADN (20). Se han identificado cerca de 20 homólogos de GacS/GacA en bacterias entéricas (*E. coli*, *Salmonella enterica* y *Erwinia carotovora*), *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Azotobacter* (15). El sistema GacS/GacA ayuda a estos organismos a adaptarse a diferentes condiciones en respuesta a cambios ambientales; controla la producción de metabolitos secundarios y enzimas o productos extracelulares que están involucradas en patogenicidad (16). Esta reportado que la producción de antibióticos, antifúngicos y exoenzimas requeridos para el control de hongos patógenos de plantas es dependiente de este sistema GacA/GacS en *Serratia plymuthica* (30).

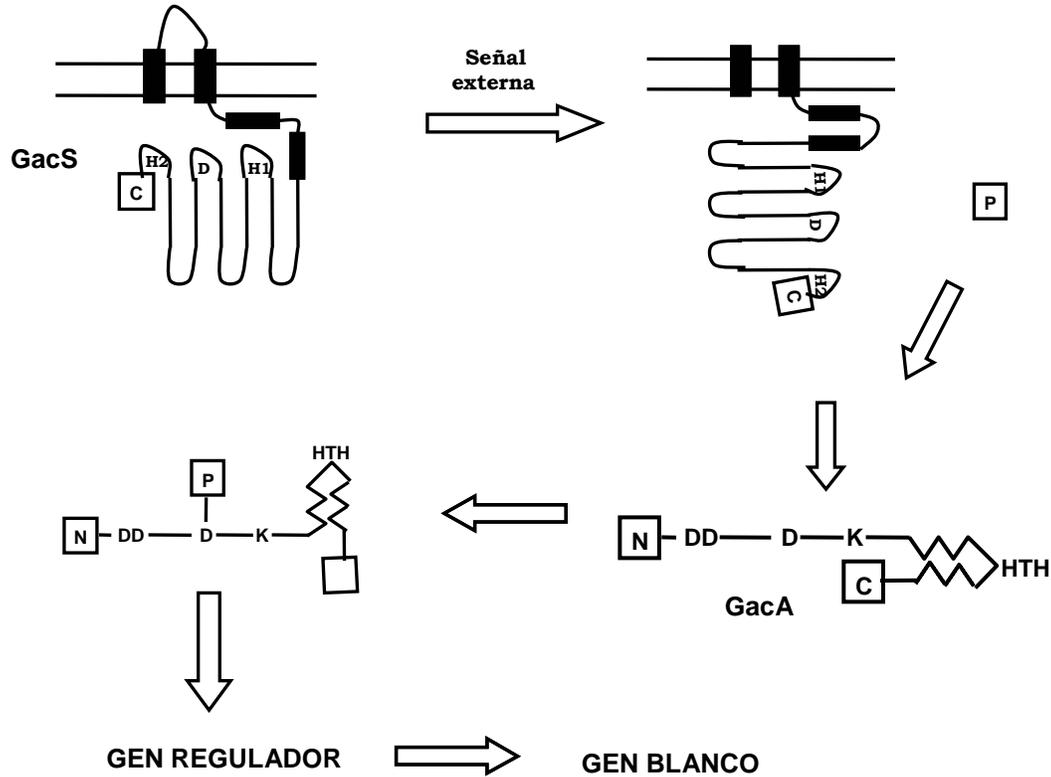


Fig. 6. Modelo de la ruta de transducción de señales del sistema GacS/GacA. Serina (D), Histidina (H), Fosfato (P), Dominio amino (N), carboxilo (C) (16).

II. 5. 5 Sistema CsrA/CsrB.

CsrA/CsrB constituye un sistema global de regulación postranscripcional que controla principalmente el metabolismo central de carbono, motilidad y la conducta multicelular en *E. coli* (35). El efector de este sistema es CsrA, una proteína de unión a ARN de 61 aminoácidos. CsrA tiene la capacidad de unirse a regiones consenso (GGA) generalmente cerca al sitio de unión a ribosoma de los ARN mensajeros blanco, impidiendo así su traducción y promoviendo su degradación (35). Sin embargo, también puede actuar como regulador positivo de ciertos genes involucrados en

motilidad, glicólisis y metabolismo de acetato, aunque muy poco se sabe sobre el mecanismo bioquímico de activación (35). El segundo componente es CsrB, un ARN no codificante que puede formar un gran complejo nucleoproteínico capaz de interactuar con hasta 18 subunidades de CsrA, antagonizando los efectos de esta proteína *in vivo* (Fig. 7, ref. 35). Homólogos a CsrB han sido reportados en otras bacterias gram-negativas como *Salmonella enterica* (CsrB/CsrC), *Vibrio cholerae* (CsrA/CsrB/CsrC), *Erwinia carotovora* (RsmB), *Pseudomonas fluorescens* (RsmX/RsmY/RsmZ), en donde están involucrados también en cascadas reguladoras (3). En *Pseudomonas fluorescens* este sistema de regulación postranscripcional reprime genes de fase estacionaria (18). En *Erwinia carotovora* reprime traducción de mensajeros involucrados en patogénesis (10). En *Vibrio cholerae* regula la multicelularidad, y en *Salmonella enterica* genes que intervienen en la invasión entérica (1).

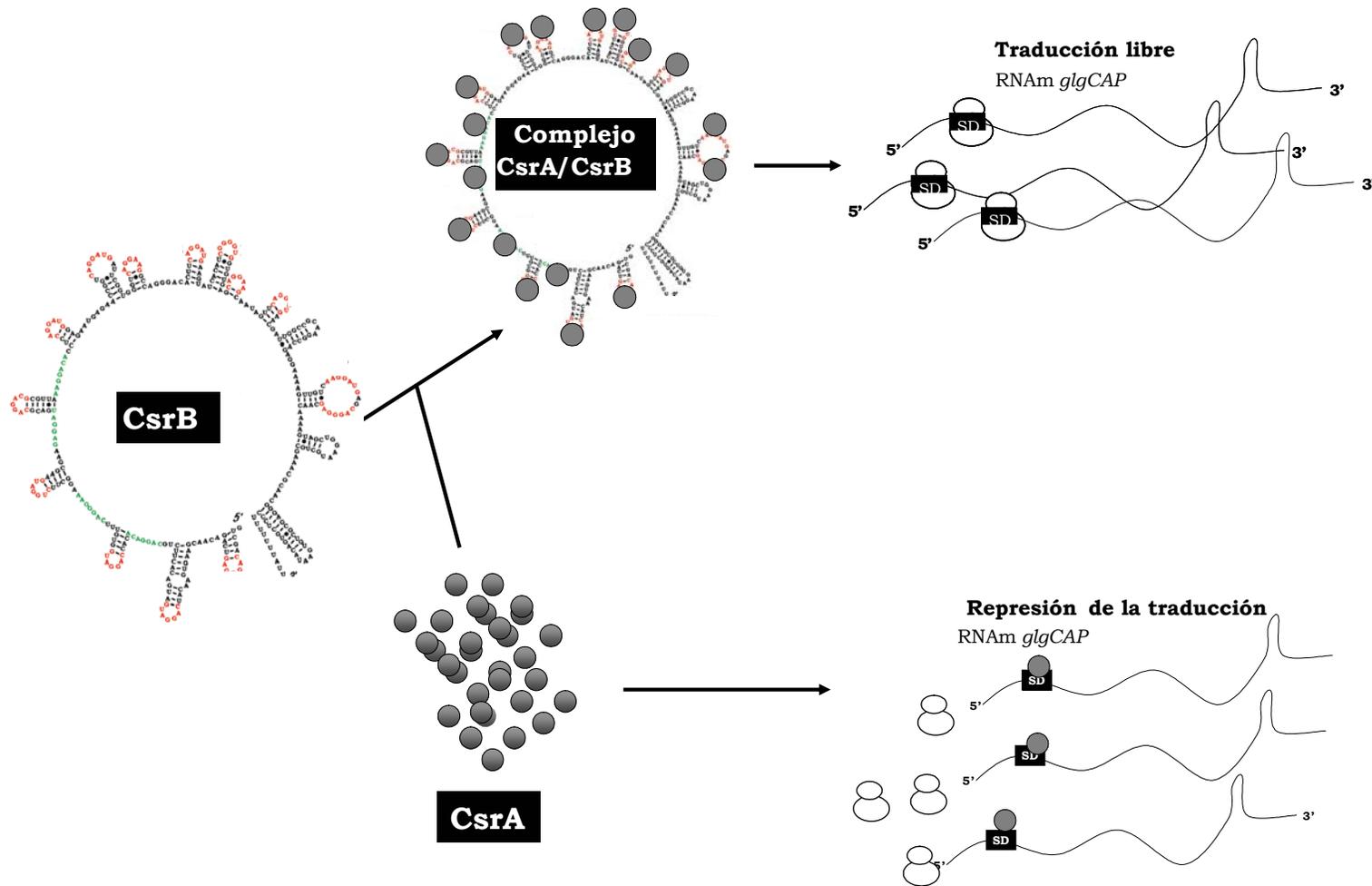


Fig. 7. Modelo de la regulación postranscripcional ejercida por CsrA/CsrB sobre el ARNm *glgCAP* para reprimir la síntesis de glucógeno. Los niveles de CsrB son determinantes para la actividad de CsrA (35).

III. Antecedentes.

III. 1 Identificación de genes biosintéticos de alquilresorcinoles.

En trabajos recientes en el laboratorio, y con la finalidad de identificar los genes involucrados en la síntesis de AR'S, se mutagenizó a *A. vinelandii* con el transposón Tn5gusA40. Se identificó un grupo de 11 genes que intervienen en la síntesis de alquilresorcinoles (44). A estos genes se les llamó *ars* (alkyl resorcinol synthesis, fig. 8).

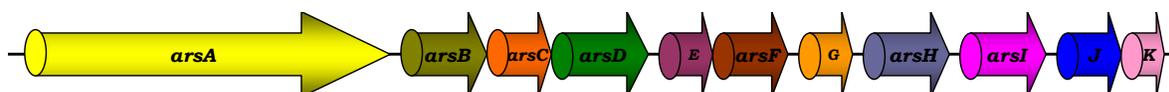


Fig. 8. Distribución de los genes de *A. vinelandii* que intervienen en la síntesis de alquilresorcinoles.

Dentro de este grupo se encuentra el gen *arsA*, que codifica para una proteína con similitud a sintasas de ácidos grasos y con proteínas policétido sintasas (PKS) tipo I. ArsA junto con ArsD se encarga de sintetizar ácidos grasos de 22 a 26 carbonos que son sustratos para la síntesis de AR'S y alquilpironas (2, 29). ArsA es una proteína modular en la cual se identificaron los dominios de enoil reductasa, β -cetoacil sintasa, malonil/acil transferasa, un dominio de proteína acarreadora de acilos (ACP) y uno semejante a cetoreductasa. Los genes *arsB* y *arsC* codifican para proteínas que son similares a policétido sintasas tipo III, comunes en

plantas, y actualmente se han comenzado a caracterizar en algunos géneros de bacterias (17). En *A. vinelandii* se ha demostrado que estos genes codifican las enzimas responsables de la biosíntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas respectivamente (Fig. 5, ref. 2, 29). ArsD tiene un dominio estructural de deshidratasa y un dominio ACP-4-fosfopanteteínil transferasa, ArsE y ArsF con transportadores tipo ABC, ArsG y ArsH son proteínas hipotéticas, ArsI presenta similitud con glicosil transferasas, ArsJ con un dominio de la enzima acil transferasa de las sintasas de ácidos grasos o de policetidos, ArsK tiene un péptido señal que podría ser utilizado para dirigir esta proteína a través de la membrana celular (44). Mutantes en los genes *arsA*, *arsB*, *arsC* y *arsD* presentan un abatimiento en la síntesis de alquilresorcinoles y los quistes de las mutantes en *arsA* pierden la organización de la cápsula (29, 36 y 44). Se piensa que al menos *arsA*, *arsB*, *arsC* y *arsD* pueden estar organizados en un operón (29).

III. 2 Reguladores posiblemente involucrados en la expresión de genes biosintéticos de alquilresorcinoles en *Azotobacter vinelandii*.

La síntesis de AR´S se da en células de *A. vinelandii* que entran al proceso de enquistamiento (33, 40). Este incremento en la síntesis está relacionado con la inducción a enquistamiento. Se ha demostrado que cepas de *A. vinelandii* que contienen mutaciones en los genes *algU*, *gacA* y *rpoS* presentaron un efecto negativo en la síntesis de estos lípidos fenólicos (44).

III. 2. 1 Gen *algU*.

Existen evidencias que sugieren que AlgU en *A. vinelandii* está involucrado en la formación de quistes maduros independientemente de su participación en la síntesis de alginato (27). Se sabe que en *A. vinelandii*, AlgU desempeña un papel en la regulación de la transcripción de algunos genes estructurales de la síntesis de alginato (genes *alg*). Por ejemplo un promotor del gen *algD*, el cual codifica para la enzima clave para la síntesis del exopolisacárido, es dependiente de AlgU para su transcripción (6, 26, 27). AlgU también controla la expresión de *algC*, que codifica para la enzima, que cataliza la segunda reacción en la síntesis de alginato (6). Se ha observado también que la inactivación parcial de *algU* mediante sobreexpresión de los reguladores negativos *mucABCD* en *A. vinelandii* afecta el proceso de enquistamiento, independientemente de su papel en la síntesis de alginato, pues la expresión de *mucABCD* disminuye la producción de alginato a un nivel que es suficiente para formar quistes, pero no se observó la formación de quistes resistentes a la desecación. De manera que este factor sigma tiene probablemente un papel adicional en enquistamiento (27).

III. 2. 2 Gen *rpoS*.

En *Azotobacter vinelandii* el gen *rpoS* está involucrado en el control de la producción del PHB y alginato (8, 31). Se ha reportado que σ^s participa en el control de la expresión de los genes biosintéticos de PHB, pues uno de

los dos promotores del operón *phbBAC* es σ^s dependiente (31) y, adicionalmente, la expresión del gen que codifica para PhbR, el activador transcripcional de los genes *phbBAC*, también depende parcialmente del factor σ^s (31). σ^s también regula la expresión de *algD*, una enzima clave para la síntesis de alginato, aunque no afecta significativamente la producción de este polímero, ya que la inactivación de *rpoS* disminuye la transcripción de *algD* a partir de su promotor dependiente de σ^s , pero provoca un incremento en la transcripción a partir de su segundo promotor dependiente de σ^E (8). También se ha determinado que la síntesis de AR'S y la generación de quistes resistentes a la desecación se ven afectadas en mutantes *rpoS* (8).

III. 2. 3 Sistema de dos componentes GacS/GacA.

Los sistema GacS/GacA (BarA/UvrY) controlan entre otros genes, la expresión de *rpoS* durante la fase estacionaria en *Pseudomonas fluorescens* (22, 45) y en *E. coli* (26). En *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, organismos filogenéticamente cercanos a *A. vinelandii*, se ha determinado que GacS/GacA no ejercen ninguna regulación sobre la expresión de *rpoS* (4). Sin embargo, en *A. vinelandii* GacA regula la expresión de *rpoS* ya que en la mutante *gacA*⁻ se ve afectada la transcripción de *rpoS* (8), aunque el efecto de GacS/GacA sobre la expresión de *rpoS* parece no estar presente en algunas cepas de *A. vinelandii* (dato no publicado). En *A. vinelandii* se sabe que el sistema

GacA/GacS regula la producción de alginato, así como la síntesis de PHB, ya que mutaciones en *gacA* reducen significativamente la síntesis de estos polímeros. Adicionalmente, se ha observado un efecto negativo sobre el proceso de enquistamiento (7). También se ha determinado que la síntesis de AR´S se abate en las cepas que tienen *gacA* inactivo.

III. 2. 4 Gen *arsR*.

Una mutagénesis con miniTn5 que se realizó para identificar los genes biosintéticos de AR´S permitió también la identificación de un gen que se denominó *arsR*. El producto del gen *arsR* presenta identidad del 75% con CysB de *Klebsiella aurogenes*, el cual es una proteína que actúa como regulador transcripcional tipo LysR y encargado de regular la transcripción de genes involucrados con la síntesis de cisteína. La inactivación del gen *arsR* provoca el abatimiento de la síntesis de AR´S por lo que podría ser un activador de la transcripción de los genes biosintéticos *ars* (44).

III. 2. 5 Sistema RsmA/RsmB.

Recientemente se identificó el sistema RsmA/RsmB en *Azotobacter vinelandii* y, se determinó que éste regula la síntesis de alginato y PHB (Castañeda M., datos no publicados). Una mutación en *rsmB* afecta la producción de alginato y PHB de manera negativa, ya que la producción de estos polímeros disminuye, y cuando hay expresión ectópica de RsmA se observa un efecto negativo sobre la producción de alginato y PHB

(Castañeda M., datos no publicados). Se tiene evidencia experimental de que GacS/GacA regulan la expresión de *rsmB* (Castañeda M., datos no publicados), pero se desconoce a que nivel RsmA/RsmB regulan la producción de ambos polímeros en *A. vinelandii*. Es posible que este sistema de regulación postranscripcional regule también otros genes involucrados en el proceso de diferenciación que sufre *A. vinelandii*. Dado que existen antecedentes de la regulación de AR'S por el sistema GacS/GacA, se considera que el sistema, RsmA/RsmB también podría estar involucrado en el control de la síntesis de estos lípidos, y que el efecto de mutaciones en GacS/GacA en la síntesis de AR'S probablemente sea a través de este sistema. En la actualidad la información sobre el control de la síntesis de AR'S es escasa, además, de que no se ha determinado de que manera se relacionan los reguladores que podrían estar participando. Los genes *ars* son buenos marcadores del proceso de enquistamiento, y el estudio del control de su expresión pudiera dar información sobre el control del enquistamiento. Así, la finalidad de este proyecto fue estudiar los mecanismos que regulan la expresión del gen *arsA* y determinar a que nivel estarían participando los reguladores AlgU, RpoS, ArsR, GacS/GacA y RsmA/RsmB.

IV. Hipótesis.

La hipótesis de este trabajo es que la expresión del gen *arsA* es controlada transcripcionalmente por el regulador ArsR, reguladores globales como AlgU, RpoS y el sistema de dos componentes GacS/GacA, a través de una cascada de regulación o mediante sistemas independientes (Fig. 9). El regulador global que iniciaría la cascada sería el sistema de dos componentes GacS/GacA que podría regular la expresión de *rpoS* en *A. vinelandii* SW136, como sucede en la cepa ATCC 9046 (8). RpoS tendría un lugar dentro de la cascada de regulación, ya que una mutación en *rpoS* suprime la producción de AR^S. Sin embargo, se ha observado que hay variaciones de este sistema de regulación dependiendo de la cepa de *A. vinelandii* utilizada, por lo que confirmaremos esta regulación en la cepa SW136. También es posible que el sistema GacS/GacA regule la expresión de *arsR* y *arsA* de manera directa, o indirecta a través de *rpoS*, o bien podría estar regulando a *arsA* mediante el control de la expresión de *arsR*. Por otra parte AlgU induciría la expresión de *arsA*, controlando directamente su expresión, o indirectamente a través de regular la expresión de *arsR* o de algún otro intermediario.

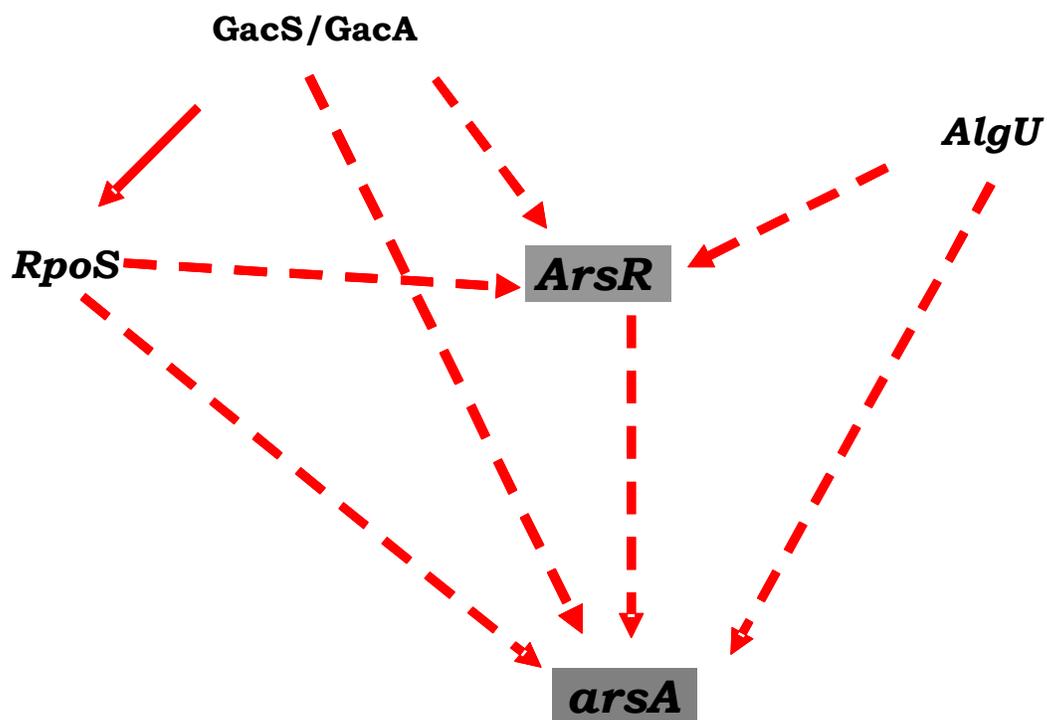


Fig. 9. Modelo hipotético de regulación de la expresión de los genes *arsR* y *arsA* donde se involucra a *ArsR* y los reguladores globales *GacS/GacA*, *RpoS* y *AlgU* en *A. vinelandii*
 —→ Regulación confirmada - - -→ Regulación Hipotética

V. Objetivos.

V. 1 Objetivo general.

- Estudiar la regulación de la expresión de los genes *arsA* y *arsR* y definir el papel de los reguladores GacA, RsmA, RsmB, RpoS, AlgU y ArsR en el control de la síntesis de AR'S en *A. vinelandii*.

V. 2 Objetivos particulares.

- Determinar si el sistema de dos componentes GacS/GacA regula la expresión de *rpoS* en *A. vinelandii* SW136.
- Medir la expresión de *arsA* y *arsR* en cepas que llevan mutaciones en genes reguladores de *A. vinelandii* identificados hasta el momento.
- Determinar si ArsR regula directamente la expresión de *arsA* mediante ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA).
- Estudiar el efecto de las mutaciones en *rsmA* y *rsmB* en la producción de AR'S.

VI. Estrategia experimental.

Se generaron las mutaciones en los reguladores GacA, AlgU, RpoS y ArsR, para cuantificar la expresión de *arsA* en medio Burk sacarosa (BS) y Burk butanol (BOH) y determinar el patrón de expresión de *arsA* y *arsR* en las cepas mutantes en los genes que codifican para reguladores globales, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real ya que no se obtuvieron fusiones transcripcionales que fueran estables en *Azotobacter vinelandii*. Se utilizaron cultivos en ambos medios, manteniendo el crecimiento por 36 y 48 horas, tiempos en los que se extrajo el ARN para sintetizar el ADN complementario (cADN) y cuantificarlo por la técnica de PCR tiempo real (Fig. 10A). Por otra parte, para definir si ArsR regula directamente la expresión de *arsA*, se purificó la proteína ArsR y se realizaron ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA) utilizando la región promotora de *arsA* (Fig. 10B). Una vez obtenidos los datos de cada uno de los ensayos planteados, se interpretaron los resultados y se planteó un modelo de regulación de la expresión de los genes *arsA* y *arsR* (Fig. 10C).

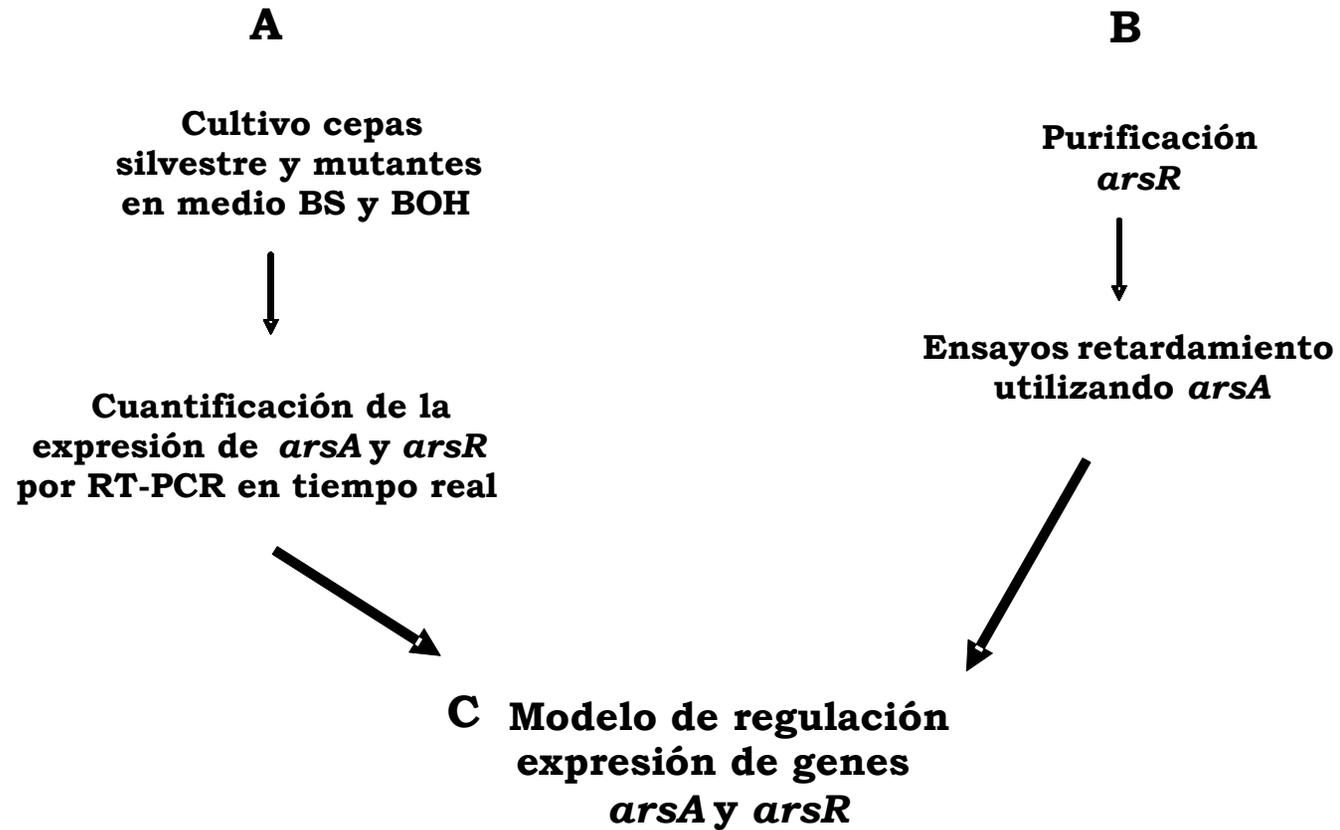


Fig. 10. Estrategia experimental. A) Para medir expresión por RT-PCR tiempo real. B) Para purificar ArsR. C) Etapa final.

VII. Materiales y métodos.

Las cepas de *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Fenotipo/Genotipo	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
SW136	Cepa silvestre, mucoide. <i>algU</i> ⁺ , Rif ^r , Nal ^r	Este Laboratorio
UW136	No-mucoide, <i>algU</i> , Rif ^r y Nal ^r .	5, 24
OV11	SW136 con fusión transcripcional <i>arsA::gusA</i> en cromosoma, sp ^r .	44
OV7	AEIV con mutación <i>arsR::sp</i> .	44
CNS59	ATCC 9046 con mutación <i>rpoS::sp</i> .	8
JM3	ATCC 9046 con mutación <i>gacA::gm</i> .	8
UW136/ <i>rsmA</i>	UW136 con mutación <i>rsmA::sp</i> .	No publicado
UW136/ <i>rsmB</i>	UW136 con mutación <i>rsmB::km</i> .	No publicado
YRG5	SW136 con mutación <i>gacA::gm</i> .	Este trabajo
YRR7	SW136 con mutación <i>arsR::sp</i> .	Este trabajo
YRS9	SW136 con mutación <i>rpoS::sp</i> .	Este trabajo
YRA11	SW136 con mutación <i>rsmA::sp</i> .	Este trabajo
YRB13	SW136 con mutación <i>rsmB::km</i> .	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5 α	LacZ ⁻ , <i>recA</i> .	GIBCO BRL
LMG194	F ⁻ , Δ <i>lacX74</i> , <i>gal E</i> , <i>thi rpsL</i> Δ <i>phoA</i> Δ <i>ara714 leu::Tn10</i> .	INVITROGEN

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan en las tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencia
pMOS <i>Blue</i>	Vector de clonación (2.8 kb) <i>LacZ</i> , Amp ^r .	Amersham Biotech
pBAD/His A	Vector de expresión (4.1 kb) 6xHis N-terminal.	Invitrogen
pBAD/Myc-His A	Vector de expresión (4.1 kb) 6xHis C-terminal.	Invitrogen
pYRC6	Plásmido pBAD/His A con <i>arsR</i> clonado.	Este trabajo
pYRN6	Plásmido pBAD/Myc-His A con <i>arsR</i> clonado.	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia
gyrAFw2	5'-CCAGCAAGGGCAAGGTCTA-3'
gyrArev	5'-TCGTCCAGCGGCAACAGGT-3'
gyrA2Us	5'-CGTGATGCTGATCAAGTTGG-3'
gyrA2Ds	5'-TCCTCGTCGTCGAATAGCTC-3'
arsA-U2	5'-CACCCCTCGTCAATCTGCTC-3'
arsA-L2	5'-GATCCTGGTCGAAGACCTTG-3'
arsR-U1	5'-ATTCCCTCGCTCACGTCTGA-3'
arsR-L1	5'-TACTGGTCATCGCAAAGCTG-3'
rpoS-U4	5'-ATGCTGAATTCTCCTCATGAAGGATGG-3'
rpoS-L4	5'-GGTCTCGAATCGGTAATTCC-3'
arsRu	5'-GATGGTGAGCTCATCGCTTTTGTGCTCATGG-3'
arsRw	5'-CGCTAAGAATTCAGGTTGCCAGAACGAT-3'
pBADup	5'-GACGATAAGGATCGATG-3'
pBADMu	5'-GGCTGAACTTCTCTCACCG-3'
pBADMw	5'-GGTTGTCGCTGCTGAAACAGG-3'

VII. 1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*.

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

VII. 2 Amplificación de *arsR* por PCR.

Se amplificó la región codificante de *arsR* sin tomar en cuenta el codón de inicio, se utilizó ADN cromosomal de la cepa SW136 y los oligonucleótidos:

arsRu que tiene un sitio *SacI* y arsRw con el sitio *EcoRI* (Tabla 4). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: una primera desnaturalización a 95°C/2 minutos, una segunda desnaturalización a 95°C/1 minuto de la cual inician los ciclos, temperatura de alineamiento 56°C/1.3 minutos, temperatura de extensión 72°C/1.3 minutos, 5 ciclos, seguidos por 25 ciclos con temperatura de desnaturalización a 95°C/45 segundos, temperatura de alineamiento 56°C/1 minuto, temperatura de extensión 72°C/1 minuto. Se dio posteriormente un ciclo más de extensión a 72°C/10 minutos. En la figura 11a se esquematiza la región amplificada y en 11b se observa la banda esperada de 957pb que corresponde a *arsR*.

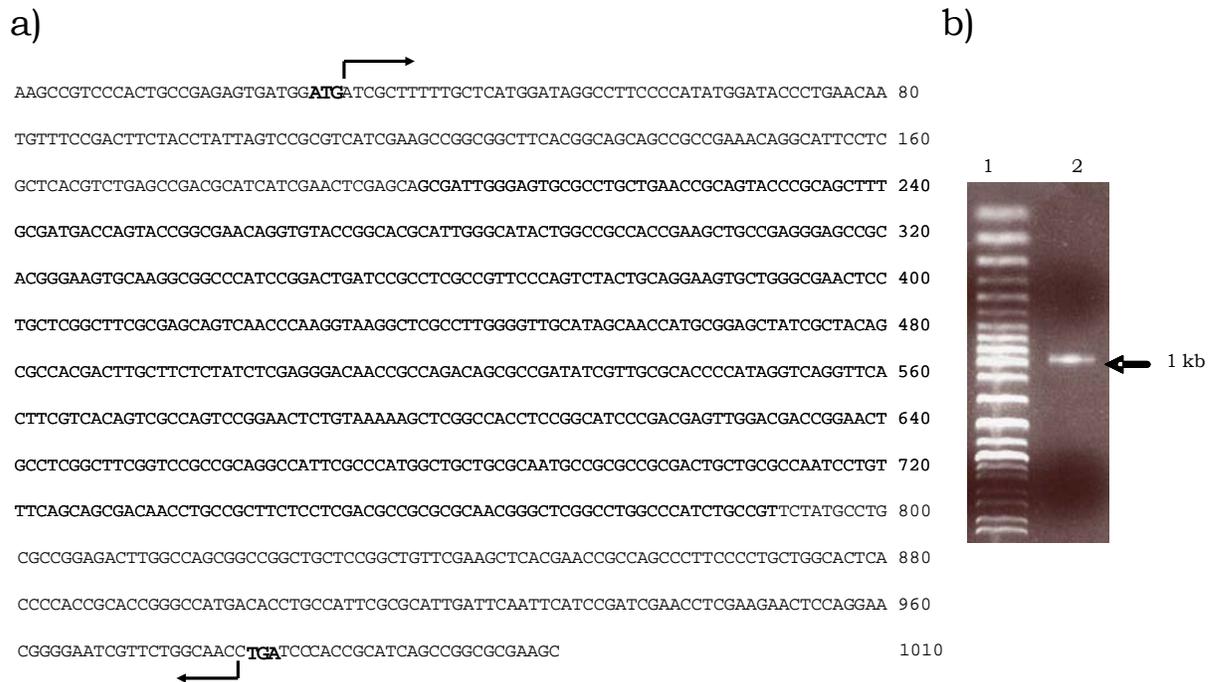


Fig. 11. Amplificación por PCR de *arsR*. a) Secuencia de *arsR* amplificada, en letras negras los codones de inicio y término, las flechas muestran la posición de los oligonucleótidos. b) Electroforesis en gel del fragmento amplificado, 1. MPM, 2. Fragmento amplificado de 957 pb.

VII. 3 Reacciones de digestión de ADN.

Las reacciones de digestiones de los plásmidos que se construyeron en este trabajo (tabla 3) se llevaron de la siguiente manera: ADN plasmídico 5 µg (10 µl), enzima (*EcoRI*, *KpnI*, *SacI*, o *HindIII*) 1 µl, Buffer (10x) 2 µl, H₂O 7 µl, el volumen total fue de 20 µl. Finalmente la reacción se incubó por 1 hora a 37°C.

VII. 4 Reacciones de ligación.

Para las reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs), se calculó la cantidad de inserto requerido para tener una relación 1:3 vector:inserto, que es el rango para obtener una máxima eficiencia de ligación, la mezcla se dejó incubando a 16°C toda la noche, posteriormente se procedió a realizar la transformación en *E. coli* (DH5α o LMG194). Una vez que se amplificó la región codificante para *ArsR*, se clonó en los vectores de expresión pBAD/His-A y pBAD/Myc-His A (Invitrogen) generando los plásmidos pYRC6 (Fig. 12a) y pYRN6 respectivamente. La elección de aquellas colonias que tuvieron el vector (pBAD/His-A o pBAD/Myc-His A) con la región codificante de *arsR* clonada, fue a través de PCR de colonia, identificando aquellas en las que se amplificó una banda de 957 que corresponde a *arsR* (Fig. 12b). De 7 colonias que se analizaron 5 tenían clonado *arsR* en el vector de expresión, de éstas, se eligieron 3 para hacer un patrón de restricción utilizando *SacI* y *EcoRI* esperando liberar el

inserto de *arsR* que se clonó. En la figura 12c observamos un gel de agarosa en el que se corrieron las muestras digeridas. Todas ellas liberaron la banda de *arsR* de 957pb y una de 4.1 kb que correspondió al vector. Se corrió como control negativo al vector digerido con las mismas enzimas.

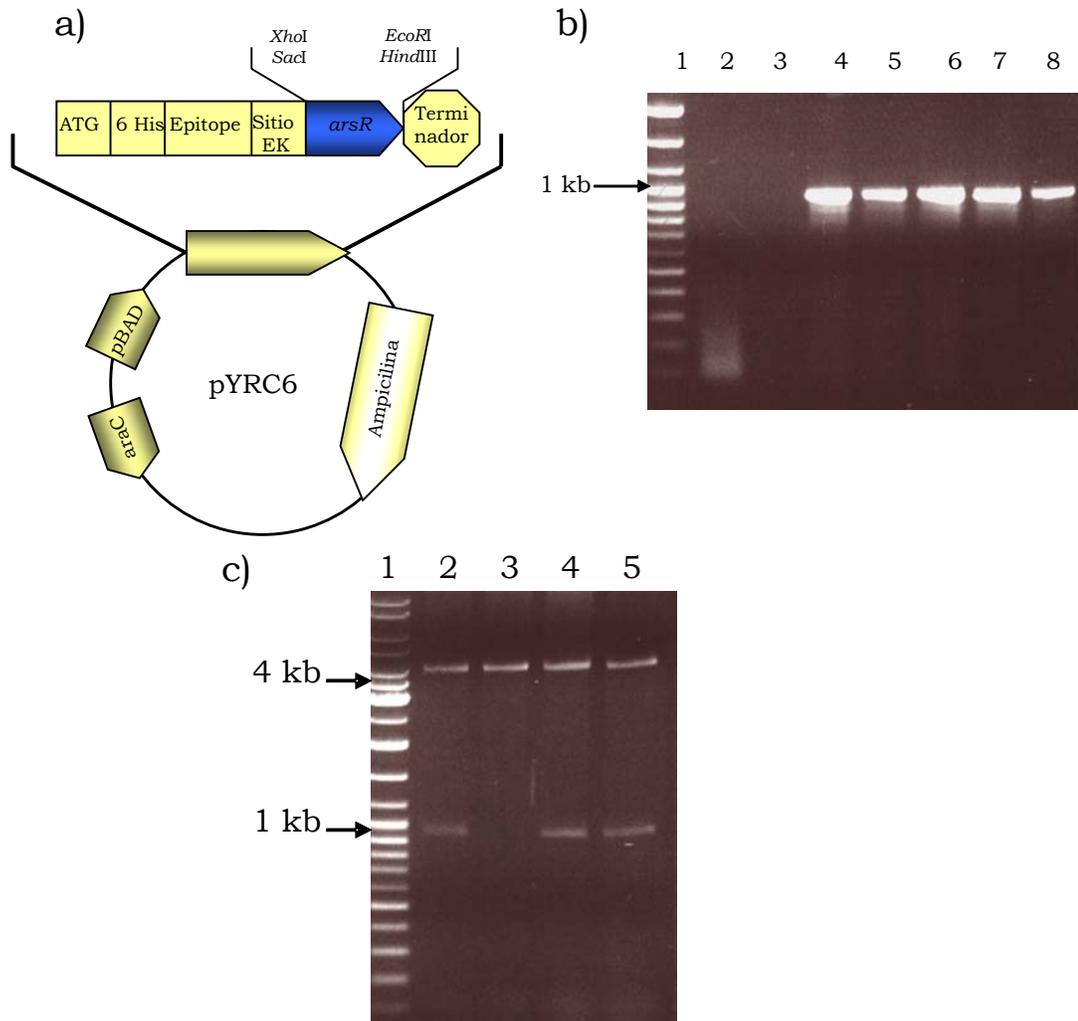


Fig. 12. Clonación de *arsR* en pBAD/His-A. a) Esquema del plásmido pYRC6. b) Electroforesis en gel de los productos de PCR, 1: MPM, 2 y 3: colonias que no tienen clonado a *arsR* y 4-8: colonias con fragmento amplificado de 957 pb. c) bandas esperadas del patrón de digestión con *SacI* y *EcoRI*. Carril 1:MPM, carriles: 2,4 y 5: colonias que tienen clonado *arsR* y carril:3: control negativo (vector linealizado).

VII. 5 Electroforesis de ADN.

Se prepararon geles de agarosa al 1% (ver apéndice) en solución amortiguadora de TRIS-acetatos 1X y bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Los pozos del gel se cargaron de acuerdo a la concentración necesaria de la muestra de interés, más 1-2 µl de colorante. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA *ladder Mix* (Fermentas), para calcular el tamaño de las bandas de ADN y su concentración. La electroforesis se corrió a 80 volts, por 45-60 min en solución amortiguadora de acetatos al 1X. Posteriormente, el gel se observó en el transiluminador de luz UV, para visualizar el ADN (38).

VII. 6 Preparación de células competentes de *E. coli* por el método de CaCl₂.

Se inició con un cultivo fresco de células de *E. coli*, se transfirió una colonia bacteriana a 5 ml de medio LB y se creció a 37°C por 16-20 h. Posteriormente, se inocularon 100 ml de medio LB líquido (en matraz de 250 ml) con 1 ml de este cultivo y se incubó a 37°C por 3 h en agitación vigorosa (300 rpm) hasta que se alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0.4-0.5. Posteriormente, el cultivo se transfirió a tubos de polipropileno y se incubaron en hielo durante 10 min, enseguida se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C y se recuperó el paquete celular. Éste se resuspendió en 30 ml de CaCl₂ 50mM dejándose en hielo por 15 min. La muestra se

centrifugó a 4000 rpm 10 min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 3-5 ml de CaCl₂ 50 mM con glicerol al 14% frío por cada 50 ml del cultivo original. Se hicieron alícuotas de 0.2 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se guardaron a -70°C (38).

VII. 7 Transformación de células competentes de *E. coli* por el método de CaCl₂.

Se agregaron 4 µl (0.150 µg) de la ligación en pBAD/His-A o pBAD/Myc-His A con *arsR* en reacciones separadas a 200 µl de células competentes de *E. coli* (LMG194) respectivamente, se dejó incubando 30 min en hielo. Posteriormente se dió un choque térmico a 42°C por 2 min y se volvió a incubar en hielo 2 min, se adicionó 1ml de medio de cultivo LB (sin antibiótico) y se dejó crecer por 1h a 37°C a 200 rpm; posteriormente se sembraron de 0.1-0.2 ml, en cajas con medio LB con el antibiótico ampicilina (38).

VII. 8 Extracción de ADN plasmídico (“Miniprep”).

Se inocularon las posibles clonas que tenían la región codificante de ArsR en 5 ml de medio de cultivo LB con ampicilina. Se incubó toda la noche a 37°C a 200 rpm al día siguiente, se transfirió el cultivo en un tubo Eppendorf; se centrifugó 10 min, y se obtuvo únicamente las células. Se resuspendió la pastilla celular en 200 µl de solución I (buffer de sacarosa),

se agregaron 20 μ l de lisozima (20 mg/ml) se mezcló por inversión e incubó 5 min a 37°C. Se agregaron 200 μ l de solución de lisis (NaOH 0.2N, SDS 1%) se mezcló y se incubó 5 min en hielo, se agregaron después 150 μ l de AcNa o AcK se mezcló e incubó en hielo 10 min. Se centrifugó por 8-10 min y transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y se le adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo. Se mezcló vigorosamente en vortex y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf limpio y se adicionó dos volúmenes de etanol absoluto, se agitó y centrifugó a 14000 rpm recuperando la pastilla, la cual se lavó dos veces con etanol al 70%, la pastilla se dejó secar y finalmente se resuspendió en 50 μ l de una solución de ribonucleasa (ARNasa 2 μ g/ml).

VII. 9 Determinación de actividad de β -glucuronidasa.

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo o más dependiendo de la densidad celular, se centrifugó para obtener el paquete celular y se resuspendió en 1 ml de MgSO₄ 10 mM. Se tomaron 20 μ l de muestra (Volumen de reacción) o más dependiendo del grado de expresión de β -glucuronidasa. Se agregaron 710 μ l de amortiguador Z (ver apéndice), posteriormente se agregaron 10 μ l de lisozima (10 mg/ml) y se dejó incubando a 37°C por 5 min en baño maría. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 10 μ l de Tritón X-100 al 10% y 100 μ l de p-nitrofenil- β -D-glucurónido (PNPG) 12.5 mM; inmediatamente se cronometra el tiempo de inicio de la reacción.

Se transfirieron los tubos a un baño de agua a 28°C por 15 min (Tiempo de reacción). Se detuvo la reacción agregando 150 µl de Na₂CO₃ 1.2 M, se leyó la absorbancia a 405 nm. Para calcular las unidades Miller se utilizó la siguiente ecuación

$$U \beta\text{-glucuronidasa} = \frac{\text{D.O (405 nm)} \times 1000}{(\text{Tiempo reacción min.})(\text{Vol reacción } \mu\text{l})(\mu\text{g proteína/ml})}$$

VII. 10 Cuantificación de proteína por método de Lowry.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry (25). Los ensayos se realizaron por duplicado. Las células se lavaron con MgSO₄ 10 mM para eliminar el alginato y se resuspendieron en 1 ml de H₂O. Del paquete celular se tomó una alícuota cuyo volumen fue de acuerdo a la cantidad de células en el cultivo, y se aforó con H₂O a 1 ml. Posteriormente se adicionaron 5 ml de la solución reactiva recién preparada (ver apéndice). Se agitó y dejó reposar 10 min., se adicionaron 0.5 ml de reactivo de Folin (Sigma) dilución 1:2 en H₂O. Se agitó y se dejó reposar 30 min, y se midió la absorbancia a 595 nm. Simultáneamente se corrió una curva de calibración utilizando un patrón de albúmina, con las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 400 y 600 µg/ml.

VII. 11 Cuantificación de alquilresorcinoles.

Las mutantes aisladas se crecieron por 5 días en medio Burk Butanol líquido para inducir síntesis de AR´S y enquistamiento. Después las células se colectaron y se pasaron a tubo Eppendorf, se resuspendieron en

1 ml de MgSO₄ 10mM. Se tomó una muestra (300 µl) para cuantificación de proteína, la muestra restante se centrifugó a 14,000 rpm por dos minutos. Al terminar de centrifugar, se retiró el sobrenadante y se dejó la pastilla, a esta se le adicionó 1 ml de acetona para la primera extracción de AR'S, se agitó en vortex y se dejó reposar 1 h. Posteriormente se centrifugó a la misma velocidad y tiempo. Se colectó la acetona y se añadió otro mililitro de acetona a la pastilla para la segunda extracción. Se agitó en vortex hasta resuspender y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente, sin exposición a la luz. Al día siguiente las muestras se centrifugaron y se recolectó la acetona. Los dos extractos obtenidos se mezclaron y se llevaron a una centrifuga de vacío (Savant), para concentrar el extracto y llevarlo a un volumen de 200 µl. Posteriormente se tomaron 50 µl de las muestras y se secaron en el Savant. Para hacer la cuantificación de AR'S se añadió 1 ml de la solución azul rápido B-Propanol (ver apéndice) y se dejó reaccionando las muestras 1 h en la oscuridad (42). Para leer las muestras en el espectrofotómetro se utilizó una longitud de onda de 520 nm. Simultáneamente se realizó una curva patrón con un estándar de 4-(4-Nitrofenilazo) resorcinol (Aldrich) en acetona a distintas concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 µg/ml).

VII. 12 Caracterización fenotípica sobre producción de alquilresorcinoles de las mutantes de *A. vinelandii*.

Para determinar el fenotipo de AR`S en placa de las mutantes, se realizó el siguiente procedimiento: Se crecieron las mutantes en medio Burk Sacarosa, se lavaron con MgSO₄ 10 mM y se resembró en placas con medio Burk Butanol para inducir enquistamiento y síntesis de AR`S. Después de cinco días de incubación, la placa se roció con una solución reveladora de placas (ver apéndice). Mediante esta metodología las colonias con el fenotipo silvestre de producción de AR`S se tiñeron de rojo por la reacción del colorante, mientras que las no productoras permanecieron del color original blanquecino.

VII. 13 Extracción de ADN cromosomal de *A. vinelandii*.

Se creció *A. vinelandii* en 50 ml de medio BS líquido en agitación a 200 rpm a 30°C, durante 48 h. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 8000 rpm por 5 min, para obtener la pastilla celular, la cual se transfirió a un tubo de 1.5 ml tipo Eppendorf. Para quitar el exceso de alginato se lavaron las células con 2 ml de TE (ver apéndice). El paquete celular se resuspendió en 450 µl de amortiguador TE 50/20, se adicionó 50 µl de lisozima (10 mg/ml, recién preparada) y se incubó a 37°C, por 30 min. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de proteasa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C, por 30 min. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 50 µl de SDS 10 % y

se incubó a 37°C por 15 min, hasta que se observó una solución turbia y viscosa. Se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M, se dejó reposar 10 min a 65°C. Se agregaron 80 µl de CTAB 10 % / NaCl 0.7 M (ver apéndice) y se dejó incubando 20 min a 65°C. Posteriormente, se realizó una extracción con 400 µl de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13,000 rpm recuperando el sobrenadante. Se extrajo con 400 µl de fenol-cloroformo-isoamílico, esto se realizó tres veces, hasta que se obtuvo una interfase limpia, centrifugando cada vez 10 minutos y recuperando cuidadosamente la fase acuosa. Se extrajo una vez con 400 µl de cloroformo-isoamílico. Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min recuperando cuidadosamente el sobrenadante. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se desechó el sobrenadante, recuperando únicamente la pastilla. La pastilla se lavó 3 veces con etanol al 70 %; cuidadosamente se retiró el etanol y la pastilla se dejó secar a 37°C por 10 min. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µl de solución RNAsa (ribonucleasa 2 µg/ml) (38).

VII. 14 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*.

Se cultivaron las células de *A. vinelandii* 2 veces en medio CM sólido (medio de competencia, el cual contiene los mismos reactivos que el medio BS excepto Na₂MoO₄·2H₂O y FeSO₄·7H₂O), se incubaron a 30°C por 48 h

cada pase. Posteriormente se cosecharon todas las células y se inocularon 50 ml de medio CM líquido. Se incubó a 30°C por 48 h a 200 rpm. Después se recolectaron las células por centrifugación a 4,000 rpm por 10 min, se dieron 3 lavados con MgSO₄ 10mM. Finalmente se resuspendieron las células en 2 ml de medio CM con 16 mM de MgSO₄.

VII. 15 Transformación de *A. vinelandii*.

Se tomaron alícuotas de 200 µl de células competentes de *A. vinelandii* y se mezclaron con 10 µg (15 µl) de ADN, se dejó incubando por 30 min a 30°C sin agitación. Posteriormente se depositó en cajas de medio CM sólido y se incubó a 30°C por 48 h. Después se levantaron las células en 500 µl de MgSO₄ y se plateó 0.1 ml en cajas con medio Burk Sacarosa con los antibióticos correspondientes.

VII. 16 Secuenciación de plásmidos.

La secuencia de los plásmidos que se construyeron en este trabajo (Tabla 3) fue obtenida por secuenciación automatizada. El oligonucleótido para la secuenciación del plásmido pYRC6 fue pBADup. Para pYRN6 se utilizaron los oligonucleótidos pBADMu y pBADMw. Para la preparación de la mezcla con volumen final de 16 µl se agregó una concentración de 750 ng (15 µl) del plásmido purificado mediante el kit “High Pure plasmid Isolation” (Roche) y 1 µl del oligonucleótido a una concentración de 10 pmol/µl. En la

figura 13 se muestra el resultado de la secuenciación se confirmó que no hubo mutaciones en la secuencia. La clonación fue en el sitio *SacI* y quedó en fase con la secuencia del codón de inicio del vector, en la figura se señala subrayado el sitio *SacI* del vector y en cursivas el inicio de la secuencia del fragmento *arsR* que fue clonado.

```

1  CGAGCTCATC GCTTTTTGCT CATGGATAGG CCTTCCCCTAT ATGGATACCC
51  TGAACAATGT TTCCGACTTC TACCTATTAG TCCGCGTCAT CGAAGCCGGC
101 GGCTTCACGG CAGCAGCCGC CGAAACAGGC ATTCCCTCGCT CACGTCTGAG
151 CCGACGCATC ATCGAACTCG AGCAGCGATT GGGAGTGCGC CTGCTGAACC
201 GCAGTACCCG CAGCTTTGCG ATGACCAGTA CCGGCGAACA GGTGTACCGG
251 CACGCATTGG GCATACTGGC CGCCACCGAA GCTGCCGAGG GAGCCGCACG
301 GGAAGTGCAA GGCGGCCCAT CCGACTGAT CCGCCTCGCC GTTCCCAGTC
351 TACTGCAGGA AGTGCTGGGC GAACTCCTGC TCGGCTTCGC GAGCAGTCAA
401 CCCAAGGTAA GGCTCGCCTT GGGGTTGCAT AGCAACCATG CGGAGCTATC
451 GCTACAGCGC CACGACTTGC TTCTCTATCT CGAGGGACAA CCGCCAGACA
501 GCGCCGATAT CGTTGCGCAC CCCATAGGTC AGGTTCACTT CGTCACAGTC
551 GCCAGTCCGG AACTCTGTAA AAAGCTCGGC CACCTCCGGC ATCCCAGCGA
601 GTTGGACGAC CGGAACTGCC TCGGCTTCGG TCCGCCGCGAG GCCATTTCGCC
651 CATGGCTGCT GCGCAATGCC GCGCCGCGAC TGCTGCGCCA ATCCTGTTTT
701 AGCAGCGACA ACCTGCCGCT TCTCCTCGAC GCCGCGCGCA ACGGGCTCGG
751 CCTGGCCCAT CTGCCGTTCT ATGCCTGCG

```

Fig. 13 Región secuenciada del plásmido pYRC6 mostrando en subrayado el sitio *SacI*, en cursivas el inicio de la secuencia clonada.

VII. 17 Purificación de ARN total de *A. vinelandii*.

Se colectaron las células de 1.5 ml de cultivo de 36 y 48 h de crecimiento en medio BS y BOH, se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se resuspendieron en 50 µl de H₂O con DEPC (di-etil pirocarbonato) 0.1% V/V. Se adicionaron 5 µl de DEPC 0.5% y 400 µl de acetona helada, se mezcló manualmente y centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante con cuidado. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 50 µl de DEPC 0.1%, se agregaron 10 µl de lisozima (10 mg/ml) preparada

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

VII. 18 Síntesis de ADN complementario.

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

incubación por 60 min a 42°C. Se paró la reacción calentando a 70°C por 10 min, se enfrió en hielo y se mantuvo en congelación.

VII. 19 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La cuantificación de la expresión de los genes *arsA*, *arsR* y *rpoS* se realizó utilizando como control interno al gen *gyrA*. Para los genes *arsA*, *arsR* y *gyrA* se llevo a cabo la siguiente mezcla por triplicado de cada cepa SW136, UW136, YRG5, YRR7 y YRS9: 10 µl de SYBRGREEN (Applied Biosystem), 1 µl de ADN complementario (5 ng), 1 µl de oligonucleótido Fw (250 nM), 1 µl de oligonucleótido Rev (250 nM) y 7 µl de H₂O estéril. Se cuantificó *rpoS* sólo en las cepas SW136 y YRG5. Las mezclas fueron colocadas en una placa de 96 pozos y se colocó en el termociclador. Las condiciones para el PCR tiempo real fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 10 min, 1 ciclo a 95°C por 15 segundos y 1 ciclo a 60°C por 15 min, los dos últimos ciclos se repitieron 40 veces.

VII. 20 Expresión de ArsR en sistema de *E. coli*.

Se utilizaron 0.05 ml de un cultivo de 16 h de *E.coli* LMG194 llevando el plásmido pYRC6 o pYRN6 para inocular tubos con 5 ml de LB, se mantuvo el crecimiento a 37°C hasta una O.D.₆₀₀ de 0.3-0.4. Mientras las células llegaron a O.D.₆₀₀ de 0.3-0.4, se prepararon 4 diluciones seriales utilizando arabinosa al 20% como stock (ver apéndice). Cuando las células

alcanzaron la O.D.₆₀₀ requerida se colectó una muestra (muestra sin inducir) que fue procesada y mantenida a -20°C y al resto se adicionó la L-arabinosa (ver apéndice) para promover la inducción de ArsR, el crecimiento se realizó a 30°C por 4 h. Terminado el tiempo de inducción se colectaron las células y se mantuvieron a -20°C.

VII. 21 Preparación de muestras de proteína.

Las células colectadas fueron centrifugadas a 8000 rpm por 5 min en una centrifuga refrigerante, se dio un lavado con MgSO₄ 10mM y nuevamente se centrifugó, la pastilla obtenida se resuspendió en 50-100 µl en la solución B-PER^R II Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce) y se adicionaron 2-4 µl de inhibidor de proteasa Complete 25X (Roche). Las muestras fueron sonicadas por 10 segundos, se centrifugaron, se separó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en la solución B-PER^R II, se agregó nuevamente inhibidor de proteasa. Para correr las muestras en gel de poliacrilamida se mezclaron con 1 volumen del buffer de tratamiento 2X (ver apéndice) y se calentaron por 10 min a 94°C.

VII. 22 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 12% (ver apéndice) para llevar a cabo electroforesis de proteínas. Los pozos fueron cargados de acuerdo a la concentración de la muestra más 1 volumen de buffer de

carga (ver apéndice); como marcador de peso molecular se utilizó SeeBlue plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Se dejó corriendo el gel a 20 mA por 2 h en solución amortiguadora Tank (ver apéndice). Posteriormente, el gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie durante 1 h, en seguida se lavó con una solución para desteñir por 30 min (ver apéndice). En la figura 14, se muestra el gel de proteínas de las células de *E.coli* no inducidas e inducidas con 2%, 0.2% y 0.002% de L-arabinosa. Esperábamos ver que una banda de alrededor de 35 a 36 kDa aumentara en las muestras obtenidas de células inducidas, sin embargo, en el gel no se observó ninguna banda que nos indicara sobreexpresión de ArsR o que sólo se encontrara en aquellas muestras obtenidas de la inducción (carriles 3 a 8) y no en las muestras control: células con el vector sin el gen *arsR* (carril 1) o células con el vector y gen *arsR* sin inducir (carril 2).

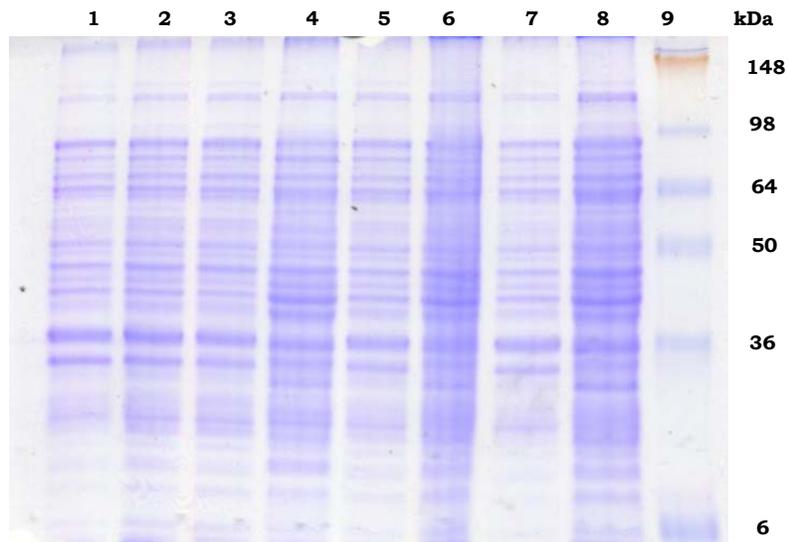


Fig. 14 Electroforesis de proteínas de muestras recuperadas antes y después de la inducción con arabinosa. Carriles: 1. pBAD/His-A Parte Insoluble (2% arabinosa), 2. pYRC6 o pYRN6 Insoluble (Sin Inducir), 3. pYRC6 o pYRN6 Soluble (2%), 4. pYRC6 Insoluble (2%), 5. 0.2% Soluble, 6. 0.2% Insoluble, 7. 0.02% Soluble, 8. 0.02% Insoluble y 8, Marcador peso molecular.

VII. 23 Western blot.

Se corrió un gel de proteínas (SDS-PAGE). Se mantuvo en buffer de transferencia (ver apéndice) la membrana de nylon para transferencia de proteínas y el papel filtro unos minutos, se armó el aparato para transferir proteínas, se ensambló la red conteniendo el gel, la membrana y papeles filtro y se llenó de buffer de transferencia, se dejó transfiriendo por 2 h a 150 mA en el cuarto frío, ya terminado el tiempo se desensambló y se colocó la membrana en solución PBS 1X (ver apéndice) por 15 min. Inmediatamente se preparó 20 ml de solución bloqueadora (BSA 3.0% en PBS 1%) y se dejó reposando la membrana por 1 h como mínimo. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con PBS Tween 0.3%, en cada lavado se dejó incubando por 5 min, se continuó con 3 lavados utilizando PBS también por espacios de 5 min. Al finalizar los lavados se agregó el anticuerpo primario Anti-His₆ (Roche) en una relación 1:1000 que se preparó en 15-20 ml de PBS-BSA 0.3%, se dejó toda la noche incubando en el cuarto frío. Al siguiente día se dio nuevamente 3 lavados con PBS-Tween 0.3% y 3 con sólo PBS, se agregó el 2° anticuerpo Anti-Rabbit IgG-POD (Roche) 1:5000 que fue preparado en PBS-BSA 0.3%, se dejó incubando en el cuarto frío por toda la noche. Para finalizar se dieron los 3 lavados con PBS-Tween 0.3% y 3 con PBS, se agregó el reactivo para la reacción de la fosfatasa alcalina, se detuvo la reacción con agua. En la figura 15 se muestra el Western blot, se observó que sí hay expresión de ArsR en las cepas que se indujeron con cualquiera de las concentraciones

de arabinosa que se utilizó y no se detectó la expresión en aquella cepa en la que no se agregó inductor, ni en la cepa que sólo lleva el vector pBAD/His-A o pBAD/Myc-His A con inductor.

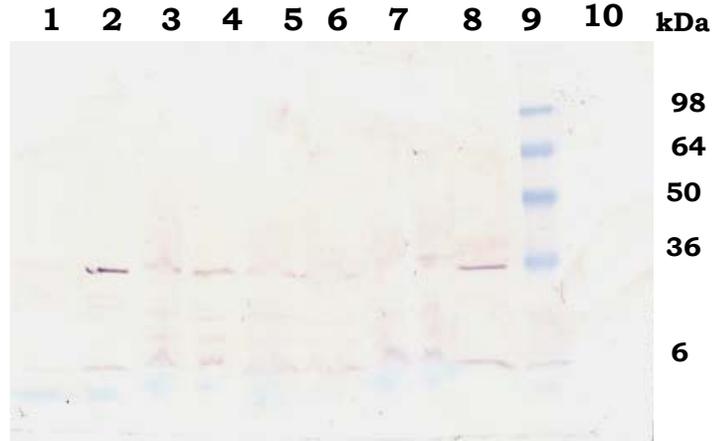


Fig. 15 Western blot de proteínas de muestras recuperadas antes y después de la inducción con arabinosa. Carriles: 1. pYRC6 o pYRN6 parte Insoluble (Sin inducir), 2. pYRC6 o pYRN6 insoluble (2%), 3 y 4. pYRC6 o pYRN6 soluble (2%), 5. pYRC6 o pYRN6 nsoluble (0.2%), 6. 0.2% Soluble, 7. 0.02% soluble, 8. 0.02% Insoluble, 9, Marcador peso molecular y 10. pBAD/His-A o pBAD/Myc-His A (2%)

VIII. Resultados y discusión.

VIII.1 Expresión diferencial de *arsA*.

Se sabe que la producción de alquilresocinoles inicia cuando la célula entra a enquistamiento (33, 40), por lo tanto, es probable que exista una correlación con la expresión de los genes *ars*. *arsA* es el gen que encabeza al grupo de 11 genes involucrados en la síntesis de alquilresorcinoles (AR´S), y que codifica para una subunidad de la primera enzima (Sintasa de ácidos grasos tipo I) de la ruta biosintética de estos lípidos (Fig. 5, ref. 2, 29, 44). Por ambas razones se estudió la expresión y regulación del gen *arsA*, y con la finalidad de descubrir los mecanismos que controlan la síntesis de AR´S y que podrían estar involucrados también en el control del proceso de enquistamiento. Debido a la hipótesis de que *arsA* se expresaría sólo durante la diferenciación, se cuantificó la expresión de este gen en dos condiciones de cultivo, una para crecimiento vegetativo en medio Burk sacarosa (BS) y otra para inducir a enquistamiento utilizando medio Burk butanol (BOH). Se midió la actividad de β -glucuronidasa, producto del gen *uidA* de *E. coli*, el cual está fusionado transcripcionalmente a *arsA* en la mutante OV11 (*arsA*). En la figura 16 se muestra la expresión de *arsA* en la cepa OV11 en ambos medios de cultivo (BS y BOH). Se observó claramente que en los cultivos en medio de crecimiento vegetativo la expresión de *arsA* inició después de un periodo de incubación largo, cuando el cultivo es viejo y algunas células comienzan a enquistarse (menos del 0.01%). Bajo estas condiciones, la expresión de

arsA aumentó sólo 14 veces a las 120 horas de incubación con respecto al nivel de expresión inicial. En cambio, en medio de inducción a enquistamiento (BOH), la expresión de *arsA* se indujo antes de las 24 horas de incubación con un incremento en la expresión de más de 400 veces a las 72 horas; posteriormente se observó un decremento en la expresión. De esta manera se confirma que la expresión de *arsA* es diferencial, registrándose altos niveles de expresión en las primeras horas en medio BOH, datos que no fueron observados en medio BS.

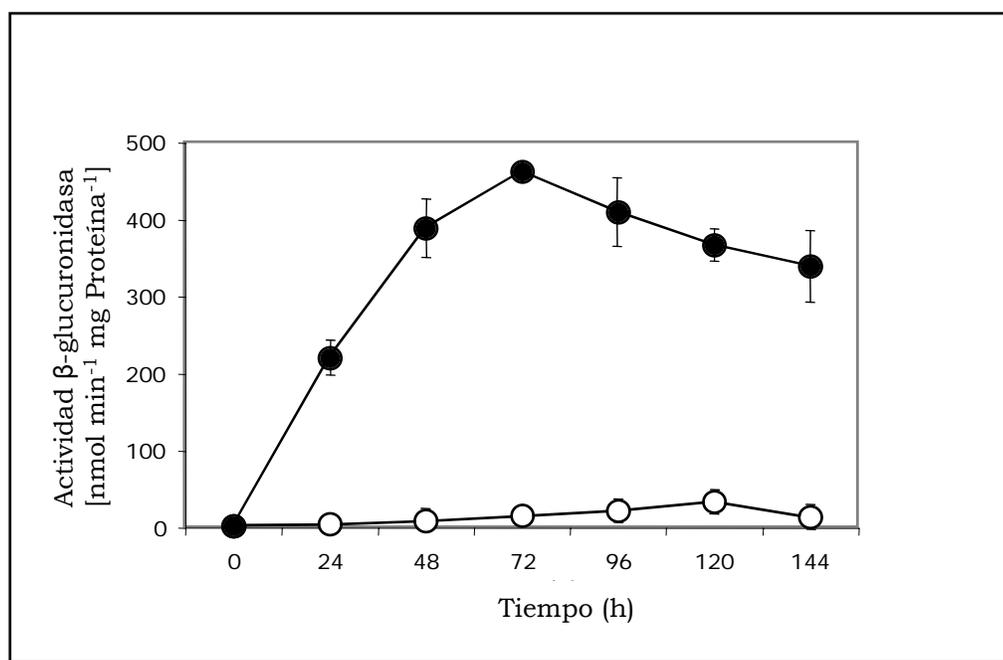


Fig. 16. Expresión del gen *arsA* en la cepa OV11. Actividad de β-glucuronidasa de una fusión transcripcional *arsA::uidA* en medio BS (○) y BOH (●).

Para determinar si hay una correlación entre la expresión del gen *arsA* y la concentración de alquilresorcinoles, se cuantificó la producción de estos

lípidos fenólicos de cultivos de la cepa SW136 crecidos en las mismas condiciones en la que se estudió la expresión de *arsA*, tanto en medio BS como en BOH. Los resultados que obtuvimos se muestran en la figura 17. Se observó que la producción de AR'S se dió únicamente en los cultivos que crecieron en medio de enquistamiento (BOH), y la cinética de producción fue similar a la de la expresión de *arsA* (Fig. 16). La síntesis de AR'S inició durante las primeras horas de incubación en BOH y aumentó con respecto al tiempo hasta que se alcanzó la producción máxima, que fue alrededor de 12 μg de AR'S por mg de proteína, a las 48 y 72 horas; tiempos en donde también se observó la expresión máxima de *arsA* (Fig. 16). Los resultados anteriores nos indican que sí hay una correlación entre la expresión de *arsA* y la producción de alquilresorcinoles.

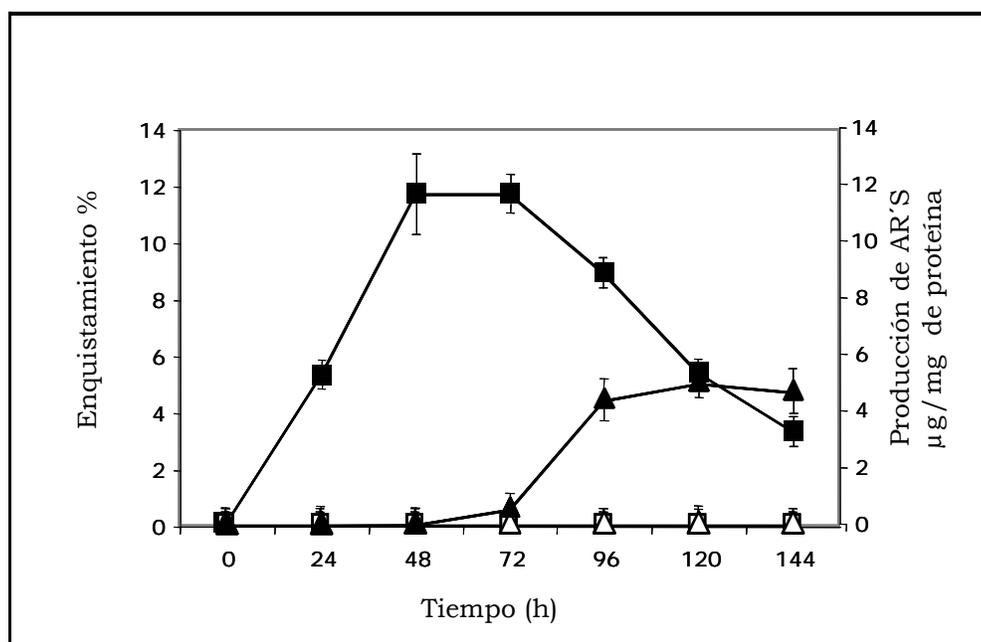


Fig. 17. Producción de alquilresorcinoles y enquistamiento en la cepa SW136. AR'S en medio BS (□) y BOH (■). Enquistamiento en BS (Δ) y BOH (▲).

Los AR´S son componentes importantes de las membranas y la cápsula de los quistes (34), por ello se decidió determinar la relación entre la expresión de *arsA*, la síntesis de AR´S y el enquistamiento (quistes maduros y resistentes a desecación). Para esto, se estudió el porcentaje de enquistamiento en cultivos de SW136 en las condiciones para crecimiento vegetativo y para inducción a enquistamiento, y se comparó con la cinética de producción de alquilresorcinoles. En la figura 17 se grafican, además de la producción de AR´S, el porcentaje de enquistamiento en los medios BS y BOH. Se observó enquistamiento únicamente en cultivos en medio BOH, iniciando a las 72 horas y fue aumentando con el transcurso del tiempo hasta que se alcanzó el valor máximo de enquistamiento, alrededor del 5% del cultivo a las 120 horas; en cultivos en BS se observó un porcentaje de enquistamiento muy bajo y sólo hasta tiempos muy tardíos (menos del 0.001% a las 144 horas). La aparición de quistes maduros, en comparación con la expresión de *arsA* y la producción de alquilresorcinoles en BOH, se observó en tiempos más tardíos. Este resultado era de esperarse considerando que los AR´S y otros componentes importantes de las cápsulas del quiste deben sintetizarse antes que comiencen a aparecer quistes completamente maduros. Es decir, las primeras horas a partir de la inducción son utilizadas para sintetizar AR´S y los demás componentes que formaran parte de un quiste maduro, pero se requiere de un tiempo adicional para su estructuración. Con los resultados anteriores se determinó que la expresión de *arsA* y la

producción de alquilresorcinoles son procesos que llevan a cabo exclusivamente aquellas células que entran en proceso de diferenciación.

VIII.2 Reguladores de la expresión de *arsA*: transferencia de las mutaciones en los genes *gacA*, *arsR* y *rpoS* a la cepa SW136.

Dentro de los objetivos de este proyecto se planteó el determinar si los reguladores GacA, AlgU y RpoS, reguladores de otros componentes del quiste como son el alginato y el poli- β -hidroxibutirato (7, 8, 26 y 27), y ArsR, identificado por presentar un efecto en la síntesis de AR \acute{S} al ser inactivado (44), intervenían en el control de la transcripción de *arsA*. Al igual que para *arsR*, se tenían antecedentes sobre el efecto de la inactivación de los genes *gacA*, *algU* o *rpoS* en la cantidad de AR \acute{S} producida. Sin embargo, esos efectos se observaron en diferentes cepas de *A. vinelandii* (Tabla 2), y no se determinó a que nivel se afectaba la producción de AR \acute{S} (44). Para poder estudiar el papel de estos reguladores en el control de la expresión de *arsA*, se transfirieron las inserciones en los genes correspondientes de los fondos genéticos en los que se encontraban (Tabla 2) a la cepa SW136, ya que la mutante *arsA* $^{-}$ (OV11) y otras mutantes afectadas en genes involucrados en la biosíntesis de alquilresorcinoles se encuentran en este fondo genético. Adicionalmente, es la cepa de *A. vinelandii* cuyo genoma ya se ha secuenciado (<http://www.jgi.doe.gov/>). Para transferir las mutaciones se purificó el ADN de las cepas mutantes JM3, CNS59 (8) y OV7 (44), y se utilizó para

transformar células competentes de SW136. Posteriormente se seleccionaron las candidatas en los respectivos antibióticos y se mantuvieron en una selección constante para promover la segregación de los genes mutados y eliminar así las copias silvestres, ya que *A. vinelandii* es una bacteria poliploide. Se confirmó que las candidatas ya no tuvieran copias silvestres a través de PCR en colonia de cada una de ellas y así se obtuvieron las cepas YRG5 (*gacA*), YRR7 (*arsR*) y YRS9 (*rpoS*), (Tabla 2). La cepa UW136 es una mutante espontánea que tiene una inserción en el gen *algU* (5, 26). Las cepas SW136 y UW136 son isogénicas, por lo que no fue necesario transferir la mutación *algU* a la cepa SW136. UW136 ha sido utilizada para estudios relacionados con producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) (5, 24) y fijación de nitrógeno principalmente (19).

VIII.3 Fenotipos de las mutantes UW136, YRG5, YRR7 y YRS9 en la producción de alginato y poli- β -hidroxibutirato.

Como se esperaba, las mutaciones *rpoS*, *algU*, y *gacA* afectaron los fenotipos de mucoidía, que es ocasionado por la producción de alginato, y de opacidad de las colonias, causado por la presencia de PHB (40). La mutante YRS9 (*rpoS*) presentó una mucoidía reducida. En UW136 (*algU*) y YRG5 (*gacA*) se perdió la mucoidía totalmente. En YRG5 y YRS9 se observó una menor opacidad (disminución en la acumulación de PHB) y en la cepa UW136 aumentó (mayor acumulación de PHB, datos no mostrados). Los fenotipos de mucoidía y opacidad que presentaron las

mutantes, confirman que en el fondo genético de la cepa SW136, la síntesis de estos polímeros (alginato y PHB) se regula de forma similar a lo observado en las cepas de *A. vinelandii* estudiadas previamente, en donde GacA, es un regulador positivo de su síntesis y los factores sigma RpoS y AlgU intervienen en la transcripción de genes biosintéticos de alginato (7, 8) y PHB (31). En la cepa YRR7 (*arsR*) ni la producción de alginato ni la de PHB se vieron afectadas, lo que indica que no es un regulador que participe en la síntesis de estos polímeros.

VIII.4 Fenotipos de las mutantes UW136, YRG5, YRR7 y YRS9 en la producción de alquilresorcinoles.

Con respecto a producción de alquilresorcinoles, en la figura 18 se muestran los fenotipos de las mutantes obtenidas (tinción específica de AR´S). Se observó producción de AR´S en las cepas SW136 (WT) y UW136 (*algU*), por lo que presentaron un fenotipo rojo; sin embargo, en UW136 la coloración fue más intensa que la de la cepa silvestre, lo que indica que probablemente sobreproduce AR´S. Las cepas YRG5 (*gacA*⁻), YRR7 (*arsR*), y YRS9 (*rpoS*) presentaron un fenotipo blanco indicando una disminución importante en la síntesis de AR´S.

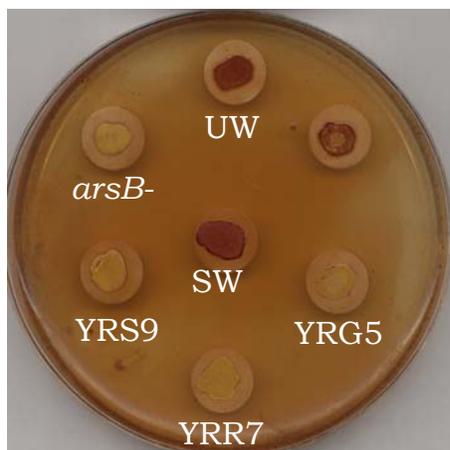


Fig. 18. Fenotipos de producción de alquilresorcinoles de mutantes obtenidas en fondo SW136. SW136 (WT), YRG5 (*gacA*), YRR7 (*arsR*), YRS9 (*rpoS*) y UW136 (*algU*), *arsB* fue utilizado como control negativo.

La menor producción de AR'S observada por tinción en las cepas YRG5, YRR7 y YRS9 se confirmó cuantificando los AR'S tras extraer los lípidos totales de cultivos inducidos a enquistamiento con BOH. Como se esperaba, la cepa UW136 produjo alrededor de 1.5 veces más AR'S (hasta 15.6 μg por mg de proteína) que la cepa SW136 (9 μg), y no hubo detección en las cepas YRG5, YRR7 y YRS9 (Fig. 19). Los resultados de la cuantificación de alquilresorcinoles indicaron lo que ya se había observado en los fenotipos de tinción, que las mutaciones en los genes reguladores *gacA*, *rpoS* y *arsR* afectaron de manera negativa la síntesis de AR'S a tal grado que se observó su abatimiento. Por el contrario, la inactivación en *algU* afectó de manera positiva, ya que se aumentó el nivel de producción.

Por lo tanto todos estos reguladores (GacA, RpoS, AlgU y ArsR) estarían controlando la producción de alquilresorcinoles.

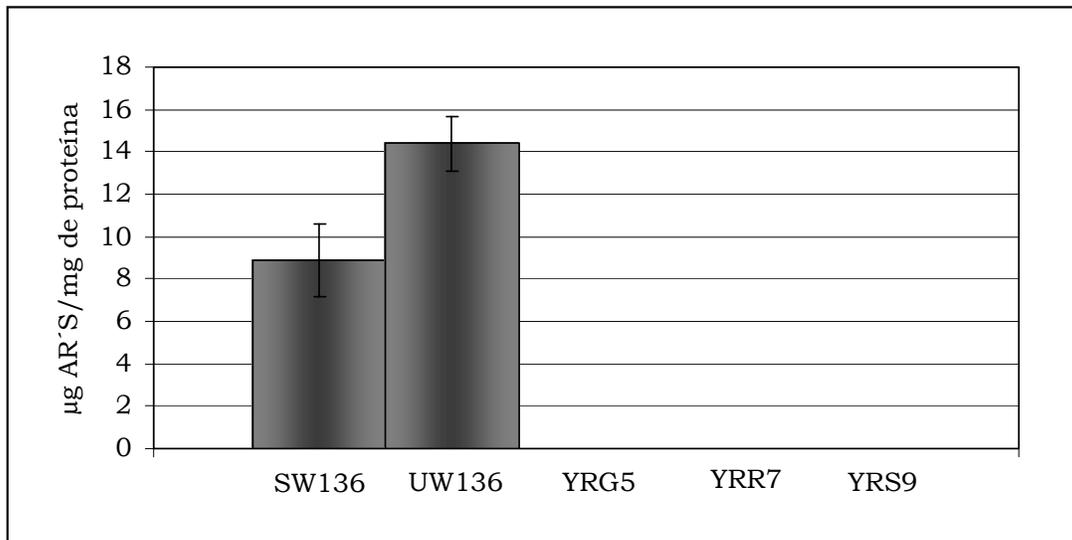


Fig. 19. Cuantificación de alquilresorcinoles de SW136 (WT) y las cepas mutantes UW136 (*algU*), YRG5 (*gacA*), YRR7 (*arsR*) y YRS9 (*rpoS*). Los valores son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

VIII.5 Expresión de *arsA* en las cepas SW136, UW136, YRG5, YRR7 y YRS9 de *A. vinelandii*.

En los experimentos anteriores se determinó que el regulador transcripcional ArsR y los reguladores globales GacA, RpoS y AlgU, regulan la producción de alquilresorcinoles en *A. vinelandii*. Es probable que el efecto de GacA, RpoS, AlgU y ArsR en la regulación de la síntesis de AR'S sea a través de regular la expresión del gen *arsA*. Para determinar de qué manera afectan estos reguladores la expresión de este gen, se cuantificó su expresión en las cepas mutantes en los genes reguladores

algU (UW136), *gacA* (YRG5), *rpoS* (YRS9) y *arsR* (YRR7) a través de experimentos de reverso transcripción y PCR en tiempo real. Se utilizaron ARNs de cultivos de cada una de las cepas de *A. vinelandii* crecidas en medio de inducción a enquistamiento (BOH) por 36 horas. En la figura 20 se muestra la expresión relativa del gen *arsA* en las cepas SW136 (WT) y en las mutantes UW136 (*algU*), YRR7 (*arsR*), YRG5 (*gacA*⁻) y YRS9 (*rpoS*⁻). La mutación *algU* afectó de manera positiva la expresión del gen *arsA* ya que aumentó más de 6 veces (670%) con respecto a la cepa SW136. En la mutante YRR7 (*arsR*) la expresión de *arsA* disminuyó significativamente hasta en un 78-96%. Sin embargo, hubo un efecto mayor sobre la expresión de *arsA* en la mutante YRG5 (*gacA*⁻) reduciéndose hasta un 98% y en la mutante YRS9 (*rpoS*⁻) hasta un 96% la expresión de *arsA* (Fig. 20). Por lo tanto, el mismo efecto de las mutaciones probadas sobre la síntesis de AR'S, se observó en los niveles de mensajero del gen biosintético *arsA*.

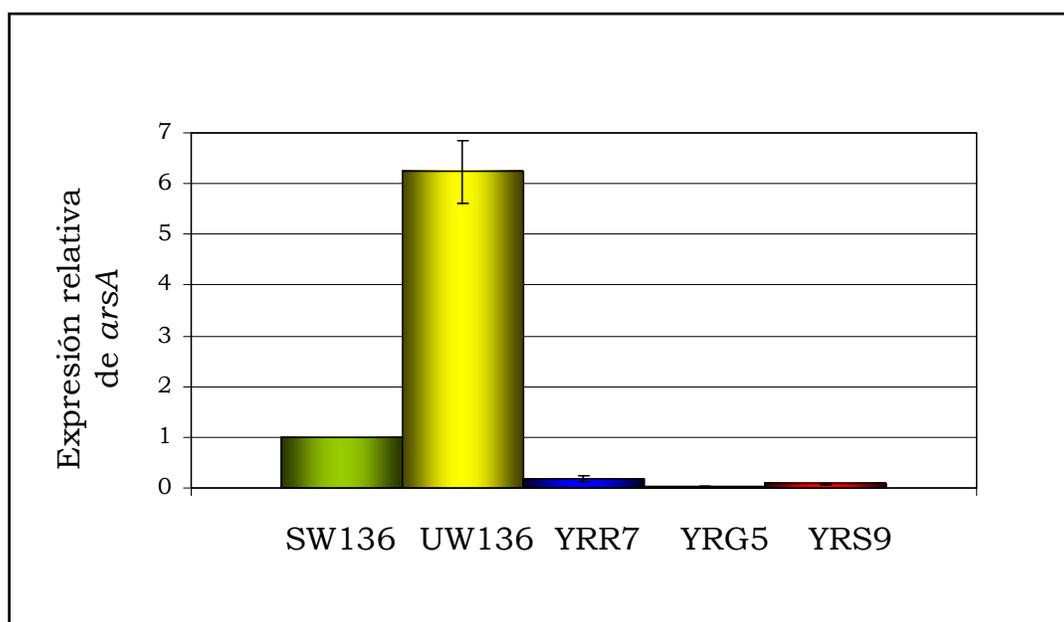


Fig. 20. Expresión del gen *arsA* en la cepa SW136 (WT) y en las cepas mutantes UW136 (*algU*), YRR7 (*arsR*), YRG5 (*gacA*) y YRS9 (*rpoS*). Los resultados son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

VIII.6 Expresión de *arsR* en las cepas SW136, UW136, YRG5, y YRS9 de *A. vinelandii*.

El regulador transcripcional ArsR aparentemente no es un regulador global, ya que la inactivación del gen *arsR* que lo codifica afectó únicamente la síntesis de alquilresorcinoles (Fig. 18 y 19) y no se observó otro fenotipo. La producción de alginato y la de PHB, que tienen reguladores comunes con la síntesis de AR´S, no se afectaron en esta mutante (datos no mostrados); por lo tanto ArsR sería un regulador (activador) específico de la biosíntesis de AR´S. Así, GacA, RpoS y AlgU podrían estar regulando la expresión de *arsA* de manera indirecta, a través

de regular la expresión de *arsR*, quien activaría posteriormente la expresión de *arsA*. Se estudió si GacA, RpoS y AlgU regulan la expresión de *arsR* utilizando el mismo método con que se estudió la expresión de *arsA* (reverso transcripción y PCR en tiempo real). La expresión del gen *arsR* en la cepa silvestre SW136 y las cepas mutantes UW136 (*algU*), YRG5 (*gacA*) y YRS9 (*rpoS*) se muestran en la figura 21. Las mutaciones afectaron la expresión de *arsR* de manera similar a lo observado para el gen *arsA*. En las mutantes YRG5 (*gacA*) y YRS9 (*rpoS*) se afectó la expresión de *arsR* de manera negativa, ya que disminuyeron hasta en un 50% y 96% respectivamente, en cambio, la mutación *algU* (UW136) afectó de manera positiva aumentando más de cuatro veces la expresión de *arsR* (440%).

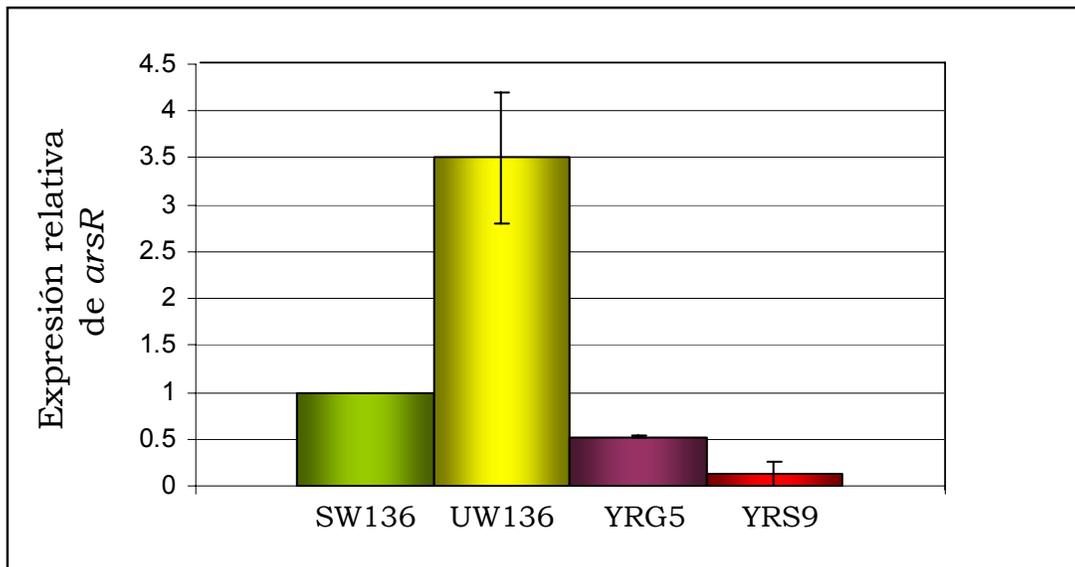


Fig. 21. Expresión del gen *arsR* en la cepa SW136 (WT) y en las cepas mutantes UW136 (*algU*), YRG5 (*gacA*) y YRS9 (*rpoS*). Los datos son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

Los resultados confirmaron que los reguladores globales GacA, RpoS y AlgU participan en la regulación de la expresión de *arsR*, ya que las mutaciones en estos genes reguladores (*gacA*, *rpoS* y *algU*) alteraron su expresión, de manera positiva en el caso de *algU*, y de manera negativa por las mutaciones *gacA* y *rpoS*. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de *arsA* por estos reguladores es a través del control de la expresión del activador transcripcional ArsR. Se propuso determinar si ArsR es el activador directo para la expresión de *arsA*, a través de realizar ensayos de retardamiento, que no se pudieron realizar, debido a que no se logró sobre expresar y purificar la proteína ArsR (ver materiales y métodos VII. 22 y 23).

VIII.7 GacA no regula la expresión de *rpoS* en la cepa SW136.

GacA y RpoS son elementos importantes para la regulación de *arsA* y *arsR* (Fig. 20 y 21). Se sabe que GacA controla la expresión de *rpoS* en *A. vinelandii* ATCC 9046 (8). Así, GacA regularía la expresión de *arsR-arsA* a través del control de *rpoS*. Sin embargo, hay evidencias que indican que la regulación de GacA sobre *rpoS* varía entre las cepas de *A. vinelandii* (Sampieri A., datos no publicados). Por lo tanto, se estudió si en la cepa SW136 esta regulación se conserva. El método por el que se detectó la expresión de *rpoS* en la mutante YRG5 fue a través de PCR en tiempo real. Se realizó un primer experimento de cuantificación de *rpoS* en cultivos de la cepa SW136 en medio BS antes de cuantificar la expresión en la

mutante YRG5 (*gacA*). Este experimento se realizó como control para asegurar que la detección con los oligonucleótidos utilizados (*rpoS*-U4 y *rpoS*-L4, tabla 4) en la técnica de PCR en tiempo real fuera específica para *rpoS* y que la expresión de algún otro factor sigma no interfiriera significativamente. Se purificaron ARNs de cultivos de SW136 a diferentes tiempos de crecimiento (8, 24, 40 y 48 horas) en medio de crecimiento vegetativo (BS), se sintetizó ADN complementario y se determinó la expresión de *rpoS*. La figura 22 gráfica la expresión de *rpoS* en la cepa SW136 a diferentes tiempos de crecimiento. Como se esperaba, la expresión de *rpoS* fue baja a las 8 horas cuando las células se encontraban en fase exponencial de crecimiento, y aumentó (8 veces) en la fase estacionaria (48 horas)

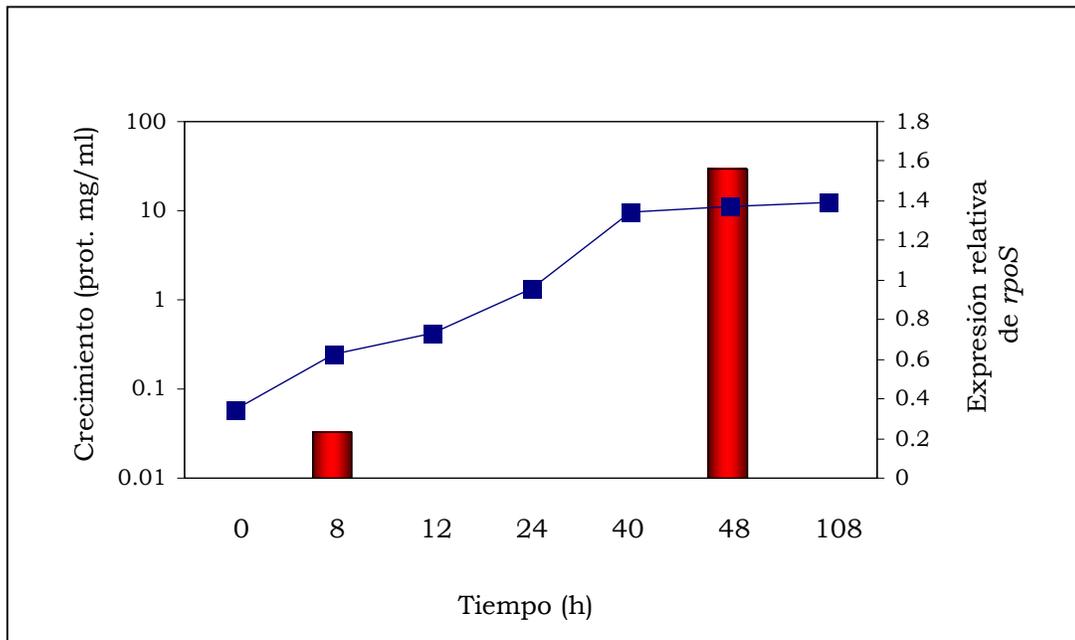


Fig. 22. Crecimiento (■) y expresión de *rpoS* (█) de la cepa SW136.

Los resultados nos indicaron que los oligonucleótidos utilizados para detectar la expresión de *rpoS* (Tabla 4) son confiables para monitorear la cantidad de mensajero de este gen. Para determinar si GacA regula la expresión de *rpoS* en la cepa SW136 se utilizaron ARNs de cultivos de SW136 y YRG5 en fase estacionaria (48 h) y se cuantificaron los mensajeros de *rpoS*. La mutación en *gacA* no afectó la expresión de *rpoS*, ya que presentó el mismo nivel de expresión que la cepa silvestre (Fig. 23), lo que sugiere que *rpoS* no es regulado por GacA en esta cepa. Se realizó el un experimento similar pero en medio de inducción y se obtuvieron los mismos resultados que los mostrados en la figura 23.

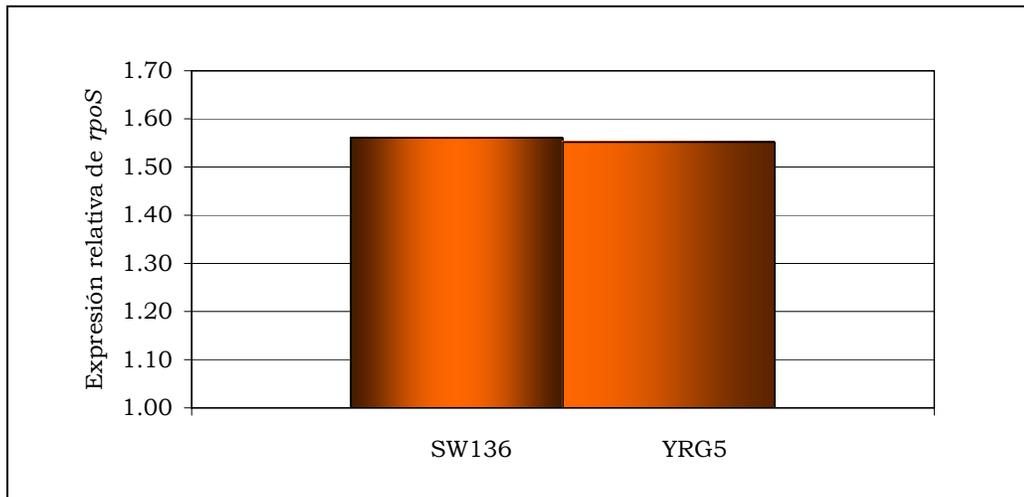


Fig. 23. Expresión de *rpoS* en SW136 (WT) y cepa mutante YRG5 (*gacA*). Los valores fueron obtenidos de cultivos en fase estacionaria (48 h).

Con los datos anteriores fue descartada la posibilidad de que GacA regulara la expresión de *arsA* y *arsR* a través del control de la expresión de *rpoS*.

VIII.8 El sistema de regulación postranscripcional RsmA/RsmB controla la síntesis de alquilresorcinoles.

En *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, GacA regula dos sistemas globales; *rpoS* (8) y *rsmB* (Castañeda M., datos no publicados). Habiendo demostrado que en la cepa SW136 GacA no regula a *rpoS* (Fig. 23), se consideró que el efecto de GacA en la regulación de *arsR* y *arsA* podría ser a través de *rsmB*. El sistema RsmA/RsmB regula los procesos de biosíntesis de alginato y PHB en *A. vinelandii*. RsmA regula de manera negativa, y RsmB positivamente (Castañeda M., datos no publicados). Por lo tanto se planteó estudiar el efecto de los reguladores RsmA y RsmB en la producción de AR´S, pues éstos se encuentran relacionados con la regulación ejercida por GacA en otros organismos como *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Erwinia carotovora* (3, 18). Para ello se transfirieron las mutaciones *rsmA* y *rsmB*, que se encontraban en la cepa UW136 (UW136/*rsmA* y UW136/*rsmB* respectivamente, Castañeda M., Datos no publicados), a la cepa SW136, de la misma manera en que se transfirieron las demás mutaciones. Se obtuvieron las cepas YRA11 (*rsmA*⁻) y YRB13 (*rsmB*⁻). Los fenotipos de producción de alquilresorcinoles que presentaron las mutantes YRA11 (*rsmA*⁻) y YRB13 (*rsmB*⁻) se muestran en la figura 24. Notamos que YRA11 presentó un fenotipo rojo más intenso, indicando una sobreproducción con respecto a la cepa SW136, en cambio, YRB13 mantuvo un fenotipo blanco que sugirió que la síntesis de AR´S se encuentra bloqueada.



Fig. 24. Fenotipos de producción de alquilresorcinoles de la cepa SW136 (WT) y de las mutantes YRA11 (*rsmA*) y YRB13 (*rsmB*).

La cuantificación de alquilresorcinoles en YRA11 y YRB13 inducidas a enquistamiento, en comparación con la cepa silvestre SW136, reflejó lo observado en sus fenotipos. La cepa YRA11 sobreprodujo AR´S alcanzando 13.5 μg de AR´S por mg de proteína, 1.5 veces más a lo producido por la cepa SW136. En cambio, en la cepa YRB13 no se detectaron alquilresorcinoles (Fig. 25). Los resultados nos indicaron que el sistema RsmA/RsmB regula también la síntesis de AR´S. RsmA regula de manera negativa la producción de alquilresorcinoles, mientras que RsmB lo hace de manera positiva.

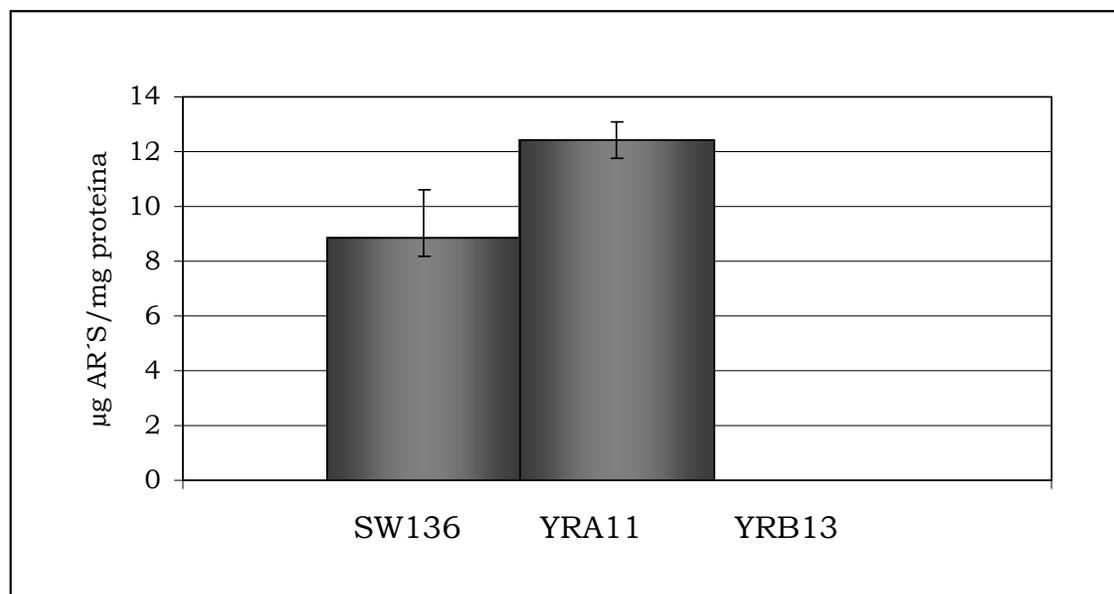


Fig. 25. Cuantificación de alquilresorcinolos de SW136 (WT) y las cepas mutantes YRA11 (*rsmA*) y YRA13 (*rsmB*). Los valores son el promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

Se sabe que el sistema CsrA/CsrB de *E. coli*, homólogo de RsmA/RsmB regula postranscripcionalmente, a nivel del control de la traducción del mensajero blanco. En ese sistema, CsrA es una proteína capaz de unirse a los mensajeros de los genes blanco, impidiendo su traducción y modificando su estabilidad. CsrB es un RNA que puede unirse a CsrA titulándolo y liberando de la regulación negativa a los mensajeros (33). Es probable que RsmA/RsmB de *A. vinelandii* actúen de la misma manera sobre el mensajero de algún gen biosintético de AR'S o de uno de sus reguladores, ya que los resultados de la inactivación de *rsmA* y *rsmB* son compatibles con esta hipótesis. Sin embargo, hasta el momento no hemos demostrado el mecanismo ni hemos identificado el blanco. Al cuantificar el mensajero de *arsR* en la mutante YRG5 (*gacA*) observamos una

disminución de un 50% con respecto a la cantidad detectada en la cepa silvestre. Si el efecto de la mutación *gacA*⁻ sobre los niveles de mensajero de *arsR* se dan a través del sistema RsmA/RsmB, esta disminución podría deberse a la inestabilidad del ARNm de *arsR* causada por RsmA, ya que en la mutante YRG5 (*gacA*⁻) no habría expresión de su antagonista (RsmB). Al igual que CsrA en *E. coli* (3, 35) y RsmA en *Pseudomonas* (18), RsmA en *A. vinelandii* estaría modulando la estabilidad de los ARNm de sus genes blanco. Para determinar si el sistema RsmA/RsmB regula postranscripcionalmente a *arsR* o *arsA*, se deberán estudiar los resultados de expresión de fusiones transcripcionales y traduccionales a un gen reportero, ensayos tipo Western blot, y ensayos de unión de RsmA a los mensajeros de estos genes, sin embargo, estos puntos quedan como perspectivas.

VIII.9 Modelo propuesto de regulación genética de *arsA* en *Azotobacter vinelandii*.

La figura 26 representa el modelo que proponemos sobre la regulación genética de *arsA* de acuerdo a los resultados que fueron obtenidos. La síntesis de ARN^S es regulada por tres sistemas globales; GacS/GacA, RpoS y AlgU (Fig. 18 y 19). Además, la transcripción de *arsA* depende de ArsR. Aunque los ensayos de retardamiento de la región promotora de *arsA* por la proteína ArsR no pudieron completarse (materiales y métodos), este regulador es probablemente un activador directo de la expresión de *arsA*

(Fig. 20), puesto que la inactivación de *arsR*, además de lo concerniente a la síntesis de AR[´]S, no tiene otros fenotipos (crecimiento, enquistamiento, producción de alginato, PHB). ArsR sería el regulador específico de la síntesis de alquilresorcinoles. Su gen es el blanco a través del cual los sistemas GacS/GacA, RpoS y AlgU ejercen el control de la síntesis de AR[´]S, ya que el mismo efecto que se observa en la expresión de *arsA* (Fig. 20) al inactivar los genes de estos reguladores, se presenta en la transcripción de *arsR* (Fig. 21). El factor sigma RpoS regula positivamente a *arsR*. Sin embargo, los resultados muestran que RpoS podría ejercer un efecto adicional sobre la expresión de *arsA*, pues la mutante *rpoS* presentó niveles de expresión de *arsA* más bajos que los de la mutante *arsR*. Por otro lado se determinó que GacA no regula la expresión de RpoS en la cepa SW136 de *A. vinelandii* (Fig. 23), por lo que el efecto de la mutación *gacA* sobre la transcripción de *arsR* y *arsA* no es a través de este factor sigma. Adicionalmente, dado que mutaciones en *rsmA* afectan la producción de AR[´]S de manera positiva y *rsmB* negativamente (Fig. 25), este sistema forma parte de esta red de regulación. Se sabe que GacA controla la expresión *rsmB* en *A. vinelandii* ATCC 9046 (Castañeda M., Datos no publicados), así que el efecto que se observa en la cepa YRG5 (*gacA*⁻) sobre la expresión de *arsA* y *arsR* podría ser a través del sistema RsmA/RsmB, quienes estarían regulando postranscripcionalmente el RNAm de *arsR*, aunque aun falta demostrar que el regulador GacA regule la expresión de RsmB en *A. vinelandii* SW136. Por ultimo, el factor sigma AlgU regula a

arsA probablemente a través de controlar la expresión de algún intermediario que regule negativamente la expresión de *arsR*, ya que el efecto de la inactivación del gen *algU* sobre la expresión de *arsA* y *arsR* es positivo, aumentando hasta 6.7 y 4.8 veces sus expresiones respectivamente (Fig. 20 y 21) y no existen ejemplos de este tipo de factores sigma actuando como reguladores negativos directos. En *A. vinelandii* hay antecedentes de que AlgU regula positivamente la expresión de CydR, un regulador negativo que controla la movilidad de la bacteria (Leon R., Datos no publicados) y biosíntesis de PHB (47), es probable que este regulador sea el intermediario negativo entre AlgU y *arsR*. La coordinación de ArsR y los reguladores globales GacS/GacA, RpoS y AlgU, junto con la regulación postranscripcional de alguno de los RNAm por parte de RsmA/RsmB, controlaría probablemente la expresión de *arsA* y de *arsB*, *arsC* y *arsD* para generar las enzimas involucradas en la síntesis de AR'S. Si bien este modelo de regulación aún no se ha descifrado totalmente, se logró determinar la relación entre los distintos reguladores que pudieran estar participando en la regulación de la expresión de *arsA* y promover la síntesis de alquilresorcinoles. Otro punto importante que se confirmó en este trabajo es que en la cepa SW136 no se conserva la regulación observada en la cepa ATCC 9046 de *rpoS* por parte de GacA. Se integró a esta red de regulación a RsmA y RsmB; componentes de un sistema de regulación postranscripcional. Faltaría determinar si el sistema RsmA/RsmB estaría regulando a *arsA* de manera directa o indirecta a

través de regular postranscripcionalmente al RNAm de *arsR* y qué componentes están involucrados en activar la expresión de *rpoS* en la cepa SW136.

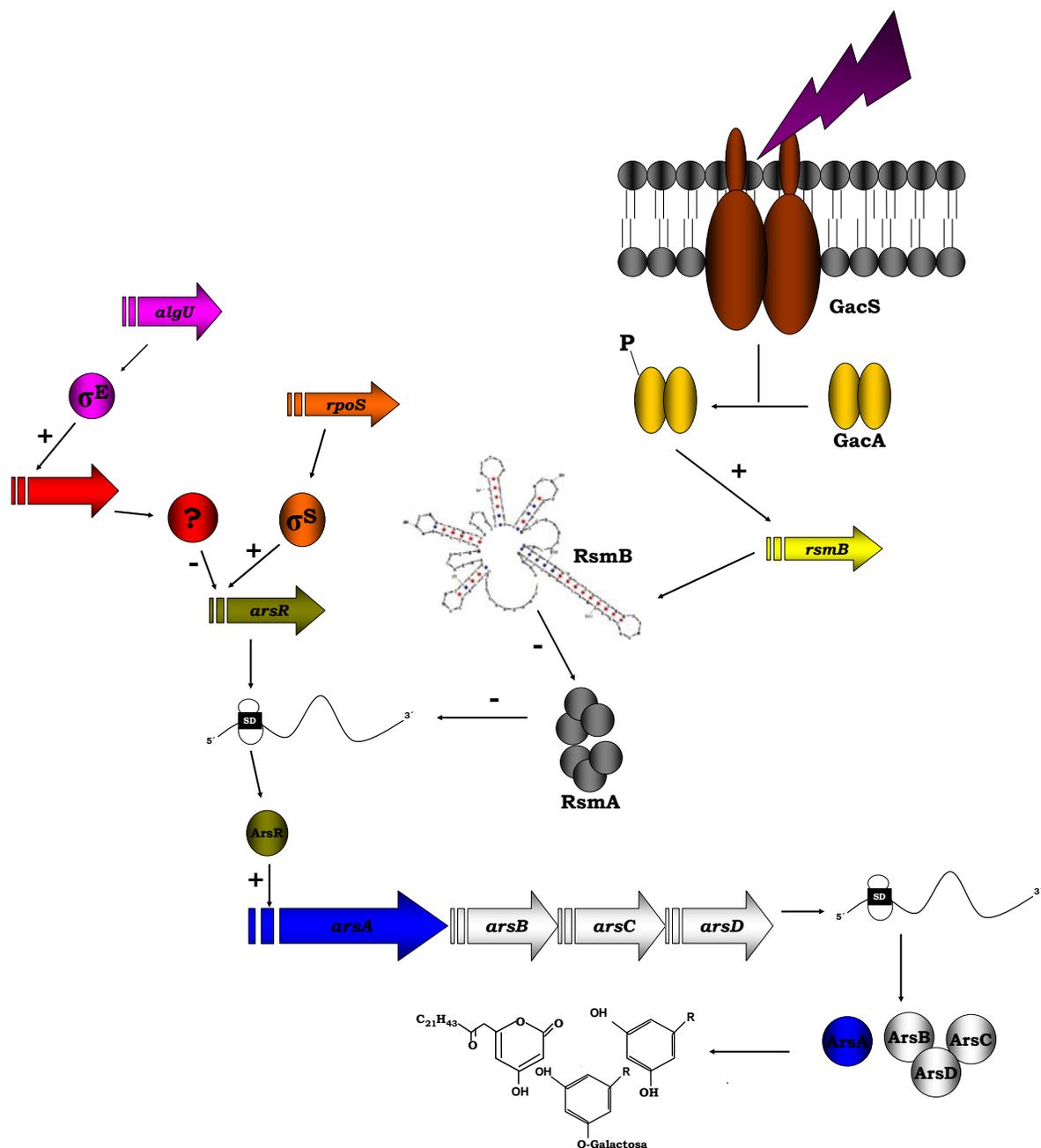


Fig. 26. Modelo de regulación genética de *arsR* y *arsA* propuesto. Ver texto VIII.9 para explicación.

IX. Conclusiones.

- El control de la síntesis de AR´S se da principalmente a nivel transcripcional.
- La expresión del gen *arsA* es diferencial y se da en correspondencia con el enquistamiento.
- ArsR es un activador de la transcripción de *arsA*.
- GacS/GacA y RpoS regulan positivamente la expresión de *arsA*, a través del control de la expresión de *arsR*.
- AlgU regula negativamente la expresión de *arsR*, probablemente de manera indirecta a través su participación en la transcripción de un regulador negativo.
- GacS/GacA no regulan la expresión de *rpoS* en la cepa SW136.
- RsmA/RsmB controlan la síntesis de alquilresorcinoles.

X. Perspectivas.

- Demostrar que *arsR* es un activador directo de la transcripción de *arsA*, a través de ensayos de retardamiento.
- Determinar si GacA regula a *rsmB* en la cepa SW136 como sucede en ATCC 9046, midiendo la expresión de *rsmB* en una mutante afectada en el gen *gacA*.
- Determinar si el sistema RsmA/RsmB regula postranscripcionalmente la expresión de *arsR* de acuerdo con el modelo propuesto para homólogos de este sistema. Esta determinación puede realizarse a través de experimentos de retardo utilizando RNAm de *arsR*, ensayos de footprinting o toeprint.
- Determinar como se controla la expresión de *rpoS* en la cepa SW136, a través de mutagénesis dirigida sobre una cepa llevando una fusión transcripcional *rpoS::gusA* en cromosoma.
- Identificar cuál es el factor negativo que funcionaría como intermediario entre AlgU y ArsR.

XI. Bibliografía.

1. Altier C., Suyemoto M and Lawhon D. S. 2000. Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Thyphimurium Invasion Genes by *csrA*. Infect and Immun. **68** (12): 6790-6797.

2. Akimasa M., Nobutaka F., Takayoshi A and Sueharu H. 2008. Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. **105** (3): 871-876.

3. Babitzke P and Romeo T. 2007. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. Curr Opin Microbiol. **10**: 156-163.

4. Bertani L., Sevo M., Kojic M and Ventura V. 2003. Role of GacA, LasI, RhII, PpK, PsrA, Vfr and CLpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS*/*RpoS* in *Pseudomonas*. Arch Microbiol. **180**: 264-271.

5. Bishop, P. E., Brill, W. J. (1977). Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. J Bacteriol. **130**: 954-956.

6. Campos E, Martínez J, Lloret L, Moreno S, Nuñez C, Espín G and Soberón G. 1996. Characterization of the Gene Coding for GDP-Mannose Dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. **178** (7): 1793-1799.

7. Castañeda M, Guzmán J, Moreno S and Espín G. 2000. The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. **182** (9): 2624-2628.

-
- 8. Castañeda M, Sanches J, Moreno S, Nuñez C and Espín G.** 2001. The Global regulators GacA y σ^S Form Part of a cascade that Controls Alginate Production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* **183** (23): 6787-6793.
- 9. Corbell N and Loper E.** 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol.* **172**: 6230-6236.
- 10. Cui Y., Chatterjee A and Chatterjee K. A.** 2001. Effects of the Two-Component System Comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* on the Production of Global Regulatory *rsmB* RNA, Extracellular Enzymes, and Harpin_{Ecc}. *Mol Plant Microbe Interact.* **14** (4): 516-526.
- 11. Damon W and Miller V.** 2006. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol.* **9** (2): 153-159.
- 12. Erickson J. and Gross C.** 1989. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* **3**: 1462-1471.
- 13. Farr S and Kogoma T.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.* **55**: 561-568.
- 14. Gaona G, Núñez C, Goldberg J, Linford A, Nájera R, Castañeda M, Guzmán J, Espín G and Soberón G.** 2004. Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *Microbiol Rev.* **238**: 199-206.

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

16. Heeb S, Haas D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* **14**: 1351-1363.

17. Jarman, T. R; L. Deavin, S. Slocombe, and R. C. Righelato. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol.* **107**: 59-64.

18. Kay E., Humair B., Denervaud V., Riedel K., Spahr S., Eberl L., Valverde C and Haas D. 2006. Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **188** (16): 6026-6033.

19. Kennedy C., and Bishop, P. 2004. Genetics of Nitrogen Fixation and Related Aspects of Metabolism in Species of *Azotobacter*: History and Current Status. In: Klipp, W.; Masepohl, B.; Gallon, J.R.; Newton, W.E. (Eds.). *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria*, 72-52. Kluwer Academic Publishers.

20. Kitten T, Kinscherf J, Mcevoy L and Willis D. 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol.* **28** : 917-929.

21. Kozubek A. and Tyman J. 1999. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiles and their biological activity. Chem Rev. **99**(1): 1-25.

22. Lavilla J, Voisard C, Keel C, Maurhofer M, Défago G and Haas D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root of tobacco. Proc Natl Acad Sci USA. **89** (9): 1562-1566.

23. Lin L. P. and Sadoff H. A. 1968. Encystment and polymer production by *A. vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. J Bacteriol. **95**: 2336-2343.

24. Loewen P, Strutinsky J. And Sparling R. . 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. Can J Microbiol. **44**: 707-717.

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

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

27. Moreno S, Nájera R, Guzmán J, Soberón G and Espín G. 1998. Role of Alternative α Factor AlgU in Encystment of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. **180** (10): 2766-2769.

-
- 28. Mukhopadhyay S., Audia P. J., Roy N. R and Schellhorn E. H.** 2000. Transcriptional induction of the conserved alternative factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two component regulator. Mol Microbiol. **37**: 371-381.
- 29. Nobutaka F, Hiroki O, Aiko H and Suehara H.** 2006. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. Proc Natl Acad Sci USA. **103**: 6356-6361.
- 30. Ovadis M, Liu X, Ismailov Z, Chet I and Chernin L.** 2004. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. J Bacteriol. **186** (15): 4986-4993.
- 31. Peralta M, Segura D, Guzmán J, Servín L and Espín G.** 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. J Bacteriol. **184**(20): 5672-5677.
- 32. Reusch N. R. and Sadoff H.T.** 1979. 5-n alquilresorcinols from encysting *A. vinelandii* isolation and characterization. J Bacteriol. **139**(2): 448-453.
- 33. Reusch R. N. and Sadoff H. L.** 1981. Lipid Metabolism During Encystement of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. **145**(2): 889-895.

34. Reusch N. R. and Sadoff H.L. 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. Nat. **302**: 268-270.

35. Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol Microbiol. **29**(6): 1321-1330.

36. Romero Y. 2005. Caracterización de genes que codifican para posibles Chalcona Sintasa y Glicosil Transferasa y su papel en la Síntesis de Lípidos Fenólicos en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1-99.

37. Sadoff H.L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol Rev. **39**: 516-539.

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

39. Schell M. 1993. Molecular Biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol. **47**: 597-626.

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

41. Stevenson, L. H; and M. D. Socolofsky. 1966. Cyst formation and polyhydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. J Bacteriol. **91**: 304-310.

42. Tluscik F., Kozubek A., Mejbaum W. 1980. Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale L.*) grains. VI Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B.. Act Soc Bot Pol. **50** (4): 645-651.

43. Vela G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. Appl Microbiol. **28**: 77-79.

44. Vite O. 2003. Identificación y caracterización de genes involucrados en la síntesis de lípidos alquilresorcinoles en *Azotobacter*. Tesis Licenciatura Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1-52.

45. Whistler CA, Corbell NA, Sarniguet A, Ream W, Loper JE. 1998. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J Bacteriol. **180** (24): 6635-6641.

46. Winogradski S. 1983. Sur la morphologie et l'écologie des *Azotobacter*. Ann Inst Pasteur Paris. **60**: 351-400.

47. Wu G, Moir A, Sawers G, Hill S and Poole R. 2001. Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiol Lett. **194**: 215-220.

48. Wyss O, Neumann G and Scolofsky M. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. J Biophys Biochem Cytol. **10**: 555-565.

XII. Apéndice.

XII. 1 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%.

Solución amortiguadora de acetatos 10X para 1 litro.

Reactivo	Cantidad
Tris Base	48.4 g
Ácido acético glacial	22.48 ml
EDTA hidratado	37.22 g
H ₂ O	988 ml
Agarosa al 1%	1 gramo de agarosa por cada 100 ml de tris acetato a 1X

XII. 2 Determinación de actividad β -glucuronidasa.

Solución amortiguadora Z 50 ml.

Reactivo	Stock	ml del stock*
K ₂ HPO ₄	0.5 M	3
KH ₂ PO ₄	0.5 M	2
EDTA	0.25 M	0.2
DTT	0.25 M	1

*Aforar con H₂O a 50 ml.

XII. 3 Cuantificación de proteína por método de Lowry.

Solución reactiva, preparación de 100 ml.

Reactivo	Stock	Proporciones
Na ₂ CO ₃ *	2%	98
tartrato de Na y K	2%	1
CuSO ₄	1%	1

*La solución stock fue preparada en NaOH al 0.1 N

XII. 4 Cuantificación de alquilresorcinoles.

Solución azul rápido B-Propanol 100 ml.

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

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

Solución reveladora de placas 50 ml.

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

XII. 5 Extracción de ADN cromosomal de *A. vinelandii*.

Solución amortiguadora TE (g/l).

Reactivo	Cantidad
Tris. Cl (10 mM)	1.57 g
EDTA (1mM)	0.372 g

Se aforó a un litro y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH.

Solución CTAB 10%/NaCl 0.7 M (g/l)

Reactivo	Cantidad
CTAB 10%	100 g
NaCl (0.7M)	40.9 g

Se aforó a un litro.

XII. 6 Expresión de ArsR en *E. coli*.

Diluciones de arabisosa utilizadas.

Tubo	Volumen (ml)	Stock	Concentración Final
1	0.1	20%	0.20%
2	0.1	2%	0.02%
3	0.1	0.2%	0.002%

XII. 7 Electroforesis de proteína en gel de acrilamida al 12%.

Buffer tratamiento 2X para 10 ml.

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

Solución amortiguadora Tank 1X para 1 litro.

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

Mezcla para gel de acrilamida al 12%.

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

Solución para teñir el gel de acrilamida.

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

Solución para desteñir gel de acrilamida.

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

Buffer de carga.

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

XII. 8 Western Blot.

Buffer de Transferencia para 1 litro.

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

Buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

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

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