



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

GENES *lea1* Y *lea2* DE *Azotobacter vinelandii* Y SU PAPEL EN LA TOLERANCIA A LA DESECACIÓN Y OTROS TIPOS DE ESTRÉS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

SELMA JULIETA RODRÍGUEZ SALAZAR

TUTOR PRINCIPAL

Dra. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE
Instituto de Biotecnología, UNAM

SUSANA BROM KLENNER
Centro de Ciencias Genómicas,
UNAM

Cuernavaca Morelos, Diciembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la dirección de la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo.

Se contó con el apoyo económico de CONACYT

Agradezco al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por los apoyos económicos para mi asistencia a congresos Nacionales e Internacionales.

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE: Gracias, Abigaíl por ser una mujer que me hace llenar de orgullo y por demostrarme que la decisión, valentía, fortaleza, constancia, dedicación, valor, actitud y respeto son actitudes que nos pueden llevar a realizar cualquier objetivo en esta vida. Por tener su apoyo incondicional para cualquier situación en mi vida, por querer siempre mi felicidad y brindarme el amor más puro y sincero que una madre le puede dar a su hija.

A MIS HERMANOS: Alondra, Dante, Ismahab y a mis sobrinos por estar siempre para mí en cualquier situación, agradable, desagradable, triste, etc. Como siempre he dicho, los quiero y admiro mucho a cada uno, porque cada uno de nosotros es diferente y cada quien tiene un significado personal de la felicidad y el éxito y sé que todos somos felices y exitosos con cada una de las decisiones que hemos tomado. Saben que cuentan conmigo y sé que cuento con ustedes para cualquier situación.

A MI NOVIO: Irving, agradezco por todo este tiempo que hemos estado juntos, por todo el cariño y paciencia que me has brindado, por cada comida, cada aventura, cada risa y lágrima, mil gracias por todo el apoyo que me has dado cuando más lo he necesitado, por estar ahí para mí en cualquier situación, por todos tus muy sabios consejos, por hacerme reír cuando estoy triste, por conocer cada detalle de mi personalidad, te amo.

A MI TUTORA: Muchas gracias, doctora Guadalupe Espín por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación en su laboratorio y darme la libertad de plantear diferentes situaciones, aprendí mucho de usted y me llevo uno de los mejores recuerdos de su actitud, grupo de trabajo y compañía.

A MI COMITÉ TUTORAL: Al Dr. Víctor Bustamante y a la Dra. Susana Brom por brindarme su apoyo y estar siempre dispuestos a colaborar, opinar y para hacer de este un mejor trabajo. Gracias por las horas invertidas en la revisión de cada uno de mis tutorales, por sus muy valiosas opiniones y críticas constructivas. Este trabajo no sería lo mismo sin su apoyo.

A SOLEDAD MORENO Y JOSEFINA GUZMÁN: Por su constante apoyo en los procedimientos de laboratorio pero sobre todo por su excelente calidad humana, son y seguirán siendo una segunda familia no sólo para mí, sino para muchos de los chicos del laboratorio, les agradezco infinitamente la solidaridad que han tenido para con cada uno de nosotros y en especial conmigo, no tengo palabras para expresar el cariño que les tengo, muchísimas gracias por todo.

A LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO ESPÍN-MERINO: Leidy, Elva, Luis Felipe, Chantal, Leonel, Libertad, Claudia, Adriana, Adán, Ana, Armando, María Tabche y todos los demás chicos que estuvieron, y están ahí, gracias por hacer mis mañanas y tardes amenas, gracias por alegrar el día con sus ocurrencias, por cada fiesta organizada, por cada palabra de aliento que me dieron, por cada ayuda que recibí de parte de cada uno de ustedes durante toda mi estancia en el laboratorio. Sé que la amistad que tenemos seguirá por mucho tiempo.

RESUMEN

Las proteínas LEA (Del inglés, Late Embryogenesis Abundant Proteins) son un grupo de proteínas asociadas con la resistencia al estrés abiótico en múltiples organismos que protegen a las células contra desecación y otros tipos de estrés. *Azotobacter vinelandii* es una gama-proteobacteria que bajo condiciones adversas, tiene la capacidad de formar quistes, cuya principal característica es ser resistentes a la desecación. En este trabajo se analizó el papel que desempeñan las proteínas LEA en la adaptación de *A. vinelandii* a diferentes condiciones de estrés

El análisis del genoma de *A. vinelandii* mostró la presencia de cuatro genes del grupo 1; de los cuales se analizaron dos, aquí denominados *Lea1* y *Lea2*, cuyos productos proteicos avLEA1 y avLEA2 presentan homología con proteínas LEA de plantas. Un análisis “*in silico*” demostró que las proteínas codificadas por estos genes presenta un índice de hidropatía negativo, consistente con la baja presencia de aminoácidos hidrofóbicos y una estructura parcialmente desordenada, característica de la mayoría de las proteínas LEA.

Una mutación en el gen *Lea1* ocasionó una pérdida de la viabilidad de los quistes después de 6 meses de desecación. Las células vegetativas de esta mutante fueron significativamente más sensibles al estrés osmótico en un medio suplementado con 0.3M de NaCl o 0.4M de sorbitol y a shock térmico cuando los cultivos vegetativos y quistes fueron expuestos a temperaturas en un rango de 40 a 65°C. En *Escherichia coli*, la expresión de la proteína AvLEA1 ocasionó un aumento en la tolerancia al estrés salino.

Utilizando el gen reportero *gusA*, determinamos que la expresión del gen *Lea1* se induce casi 2.5 veces más en condiciones de enquistamiento, mientras que el gen *Lea2* parece expresarse de manera constitutiva. Los ensayos “*in vitro*” mostraron que la proteína AvLEA1 de *A. vinelandii* confiere protección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al ser sometida a ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Con base en los resultados obtenidos, determinamos que la proteína avLEA1 es necesaria para la supervivencia en condiciones de estrés, tales como desecación, altas temperaturas e hiperosmolaridad en *A. vinelandii*; además de tener la capacidad de proteger la actividad “*in vitro*” de otra proteína y conferir tolerancia a salinidad en células de *E. coli*.

SUMMARY

LEA proteins (Late Embryogenesis Abundant Proteins) are a group of proteins associated with resistance to abiotic stress in multiple organisms that protect cells against desiccation and other types of stress. *Azotobacter vinelandii* is a proteobacteria that under adverse conditions, has the ability to form cysts, whose main characteristic is to be resistant to drying. In this work, the role of LEA proteins in the adaptation of *A. vinelandii* to different stress conditions was analyzed.

The analysis of the genome of *A. vinelandii* showed the presence of four genes of group 1; of which two were analyzed, here named *Lea1* and *Lea2*, whose protein products avLEA1 and avLEA2 have homology with LEA proteins from plants. An "in silico" analysis showed that the proteins encoded by these genes have a negative hydropathy index, consistent with the low presence of hydrophobic amino acids and a partially disordered structure, characteristic of most LEA proteins.

A mutation in the *Lea1* gene caused a loss of the viability of the cysts after 6 months of desiccation. The vegetative cells of this mutant were significantly more sensitive to osmotic stress in a medium supplemented with 0.3M NaCl or 0.4M sorbitol and thermal shock when vegetative cultures and cysts were exposed to temperatures in a range of 40 to 65 ° C. In *Escherichia coli*, the expression of the avLEA1 protein caused an increase in tolerance to salt stress.

Using the *gusA* reporter gene, we determined that the *Lea1* gene expression is induced almost twice under encystment conditions, while the *Lea2* gene seems to be expressed constitutively. The "in vitro" assays showed that the avLEA1 protein of *A. vinelandii* confers protection of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme when the activity was tested after being subjected to freeze-thaw cycles.

We determined that the avLEA1 protein is necessary for survival under stress conditions, such as desiccation, high temperatures and hyperosmolarity in *A. vinelandii*; in addition to having the ability to protect the "in vitro" activity of another protein and confer tolerance to salinity in *E. coli* cells.

INDICE

| | Página |
|--|---------------|
| INTRODUCCION | |
| 1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i> | 10 |
| 1.1.1 Ciclo de vida y proceso de diferenciación..... | 11 |
| 1.1.2 Enquistamiento..... | 13 |
| 1.1.3 Germinación..... | 13 |
| 1.1.4 Composición del quiste..... | 14 |
| 1.1.5 Propiedades de los quistes..... | 15 |
| 1.2 Estrés abiótico: Deseccación..... | 15 |
| 1.2.1 Respuesta de los organismos ante el estrés..... | 16 |
| 1.3 Proteínas LEA..... | 18 |
| 1.3.1 Estabilidad de proteínas..... | 18 |
| 1.3.2 Protección de membranas..... | 20 |
| 1.4 Clasificación..... | 20 |
| ANTECEDENTES..... | 21 |
| 2.1 Genes que regulan la tolerancia a desecación en quistes..... | 21 |
| 2.2 Distribución y expresión de las proteínas LEA..... | 23 |
| 2.2.1 Proteínas LEA en Eucariontes..... | 23 |
| 2.2.2 Proteínas LEA en Procariontes..... | 24 |
| JUSTIFICACION..... | 26 |
| HIPÓTESIS..... | 26 |
| OBJETIVO..... | 26 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 27 |
| 6.1 Medios de cultivo y cepas utilizadas..... | 27 |
| 6.2 Análisis “ <i>in silico</i> ” de secuencias..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3 Clonación de mutantes en genes <i>Lea1</i> y <i>Lea2</i> | 27 |
| 6.4 Ensayo de enquistamiento..... | 30 |
| 6.5 Fusiones transcripcionales de genes <i>Lea1</i> y <i>Lea2</i> | 30 |
| 6.6 Ensayos de tolerancia..... | 31 |
| 6.6.1 Estrés osmótico..... | 31 |
| 6.6.2 Termotolerancia..... | 32 |
| 6.7 Expresión y purificación de la proteína avLEA1..... | 32 |
| 6.8 Ensayos de protección enzimática..... | 35 |
| RESULTADOS..... | 35 |
| 7.1 Las proteínas avLEA1 y avLEA2 de <i>A. vinelandii</i> cumplen con las características estructurales de las proteínas G1LEA..... | 36 |
| 7.2 Obtención de mutantes en los genes <i>lea</i> en <i>A. vinelandii</i> | 38 |
| 7.3 El gen <i>Lea1</i> es necesario para contrarrestar la desecación en quistes de <i>A. vinelandii</i> | 39 |
| 7.4 El gen <i>Lea1</i> se expresa mayoritariamente en los quistes de <i>A. vinelandii</i> | 41 |
| 7.5 avLEA1 es necesario para tolerar el estrés osmótico en <i>A. vinelandii</i> | 42 |
| 7.6 El gen <i>Lea1</i> es necesario para la tolerancia a altas temperaturas en <i>A. vinelandii</i> | 44 |
| 7.7. avLEA1 tiene un efecto protector sobre la actividad de la LDH bajo ciclos de congelamiento descongelamiento “ <i>in vitro</i> ”..... | 46 |
| 7.8 avLEA1 ayuda a tolerar estrés osmótico por NaCl en <i>E. coli</i> | 47 |
| DISCUSIÓN..... | 49 |
| CONCLUSIONES..... | 52 |
| ANEXO A y B: MATERIAL Y MÉTODOS..... | 53 |
| LITERATURA CITADA..... | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Célula vegetativa de *A. vinelandii* en división celular
- Figura 2.** Ciclo de vida de *A. vinelandii*
- Figura 3.** Quiste de *A. vinelandii*
- Figura 4.** Plantas resistentes a la desecación
- Figura 5.** Organismos anhidrobióticos
- Figura 6.** Mecanismos de acción propuestos de una proteína LEA
- Figura 7.** Mapa genético de la región de los genes *Lea1* y *Lea2* en el cromosoma de *A. vinelandii*
- Figura 8.** Producto de PCR de la amplificación de los genes *Lea1* y *Lea2*
- Figura 9.** PCR de mutantes en los genes *Lea* de *A. vinelandii*.
- Figura 10.** Expresión y purificación de la proteína avLEA1 en *E. coli*.
- Figura 11.** Expresión y purificación de la proteína avLEA1 en *E. coli*.
- Figura 12.** Alineamiento de la secuencia del 20-mero de proteínas LEA de *A. vinelandii*
- Figura 13.** Análisis “*in silico*” de avLEA1 y avLEA2.
- Figura 14.** Representación esquemática de los plásmidos para la construcción de los mutantes en los genes *Lea* de *A. vinelandii*
- Figura 15.** Microscopía óptica de quistes de *A. vinelandii*.
- Figura 16.** Actividad β - Glucoronidasa de cepas *lea1-gusA* y *lea2-gusA*
- Figura 17.** Tolerancia al estrés osmótico de los mutantes *Lea1* y *Lea2* de *A. vinelandii*.
- Figura 18.** Ensayos de termo tolerancia en células vegetativas y quistes de las mutantes *Lea1* y *Lea2* de *A. vinelandii*
- Figura 19.** Protección de la actividad de la LDH después de 2, 6 y 10 ciclos de congelamiento y descongelamiento
- Figura 20.** Efecto de la expresión de la proteína avLEA1 en la viabilidad de *E. coli*

INTRODUCCIÓN

1.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria poliploide, pleomórfica, variando su morfología desde bacilos hasta cocos (Fig. 1), Gram-negativa y fijadora de nitrógeno. Se reproduce por fisión binaria, su tamaño varía de 1.5 a 2.0 μm de diámetro. Utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Se mueve por flagelos peritricos, es aerobia, pero puede crecer en concentraciones de oxígeno bajas (Buchanan and Gibbons, 1974). Crece con tiempos de generación de 2.5 a 3 h en medio Burk (Wilson and Knight 1952) suplementado con sacarosa al 1%. Los cultivos de *A. vinelandii* crecen en fuentes de carbono como manitol, ramnosa y otros carbohidratos así como en una variedad de ácidos orgánicos y ciertos alcoholes.

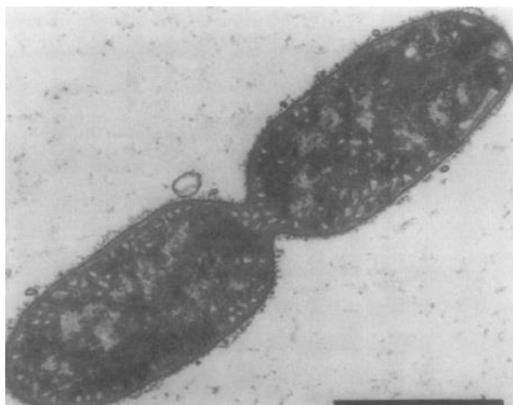


Figura 1. Célula vegetativa de *A. vinelandii* en división celular (marcador, 1 μm). Tomado de Hitchins y Sadoff, 1970

A. vinelandii cuenta con tres sistemas de nitrogenasas, cuya expresión se regula diferencialmente por la disponibilidad de metales del medio (Frazzon and Dean, 2002). El crecimiento diazotrófico bajo condiciones aeróbicas es posible debido a que *A. vinelandii* posee un sistema bien integrado de protección de su nitrogenasa que comprende: protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos que le permiten crecer diazotróficamente en condiciones totalmente aeróbicas (Manchal and Vanderleyden, 2000).

Produce alginato, un polisacárido lineal constituido por monómeros de ácido manurónico y gulurónico, capaz de formar geles termoresistentes en presencia de calcio; esta propiedad

hace de este biopolímero útil para diferentes aplicaciones industriales (Sutherland, 1985), por ejemplo, es utilizado como agente gelificante en la industria farmacéutica y la alimenticia utilizado para múltiples aplicaciones como estabilizante y viscosificante (Clementi, 1997).

El polihidroxitirato (PHB), se acumula en las células vegetativas. Tiene la función de constituir un material de reserva de carbono y energía que puede ser utilizado en períodos de limitación de nutrientes en el medio (Stevenson and Socolofsky, 1966). El polímero se almacena en grandes cantidades en forma de gránulos intracelulares insolubles (Laferty *et al.*, 1990) y puede ser utilizado como plástico biodegradable (Galindo *et al.*, 2007).

Las bacterias del género *Azotobacter* forman quistes cuya principal característica es ser resistentes a la desecación, la formación de quistes ocurre después del crecimiento exponencial (Sadoff, 1975). El grado de enquistamiento parece estar relacionado con los niveles intracelulares de PHB (Stevenson and Socolofsky, 1966). Cuando las células son crecidas en placas de agar con medio Burks con n-butanol al 0.2% como única fuente de carbono, se completa el enquistamiento en 120 h (Tchan *et al.*, 1962; Wyss *et al.*, 1961). Cuando se reemplaza la glucosa por β -hidroxitirato (BHB) a cultivos en fase exponencial hay una inducción del enquistamiento en 48 h (Lin and Sadoff, 1968).

1.1.1 Ciclo de vida y el proceso de diferenciación

Las bacterias poseen la capacidad de formar estructuras celulares que les permiten resistir los efectos perjudiciales del entorno físico. La más evidente de estas estructuras es la endospora, un cuerpo discreto que exhibe resistencia extrema a los agentes nocivos. Otro mecanismo de defensa, es la formación de quistes celulares, esta característica está presente en ciertos representantes de los grupos de las Mixobacterias, Chlamydo bacterias y Eubacterias. Ambos tipos de células de reposo, esporas y quistes, permiten que la célula permanezca en estado latente durante largos períodos de tiempo y germinar bajo condiciones adecuadas dando lugar a una nueva célula vegetativa (Fig. 2).

Los quistes de *A. vinelandii* son una entidad que presenta propiedades fisiológicas distintas de la célula vegetativa, presentando una mayor resistencia a condiciones deletéreas o agentes nocivos (Socolofsky and Wyss, 1962). Fisiológicamente, difieren en la velocidad

de oxidación de sustratos, reacción a agentes quelantes, y resistencia a agentes deletéreos (Socolofsky and Wyss, 1962). *A. vinelandii* es capaz de adaptar su metabolismo a distintas fuentes de nutrientes, sin embargo, la inducción del enquistamiento en *Azotobacter* en condiciones de laboratorio se produce sólo si se utilizan ciertas fuentes de carbono como *n*-butanol ó β -hidroxibutirato, formando quistes en un lapso de 3 a 7 días. (Lin and Sadoff, 1968). Células que crecen en sacarosa no forman quistes. La germinación es el proceso por el cual los quistes metabólicamente inactivos sufren los cambios necesarios para convertirse en células vegetativas; este proceso ocurre a 30°C en medio BS y dura de 4 a 8 horas. (Loperfido and Sadoff, 1973).

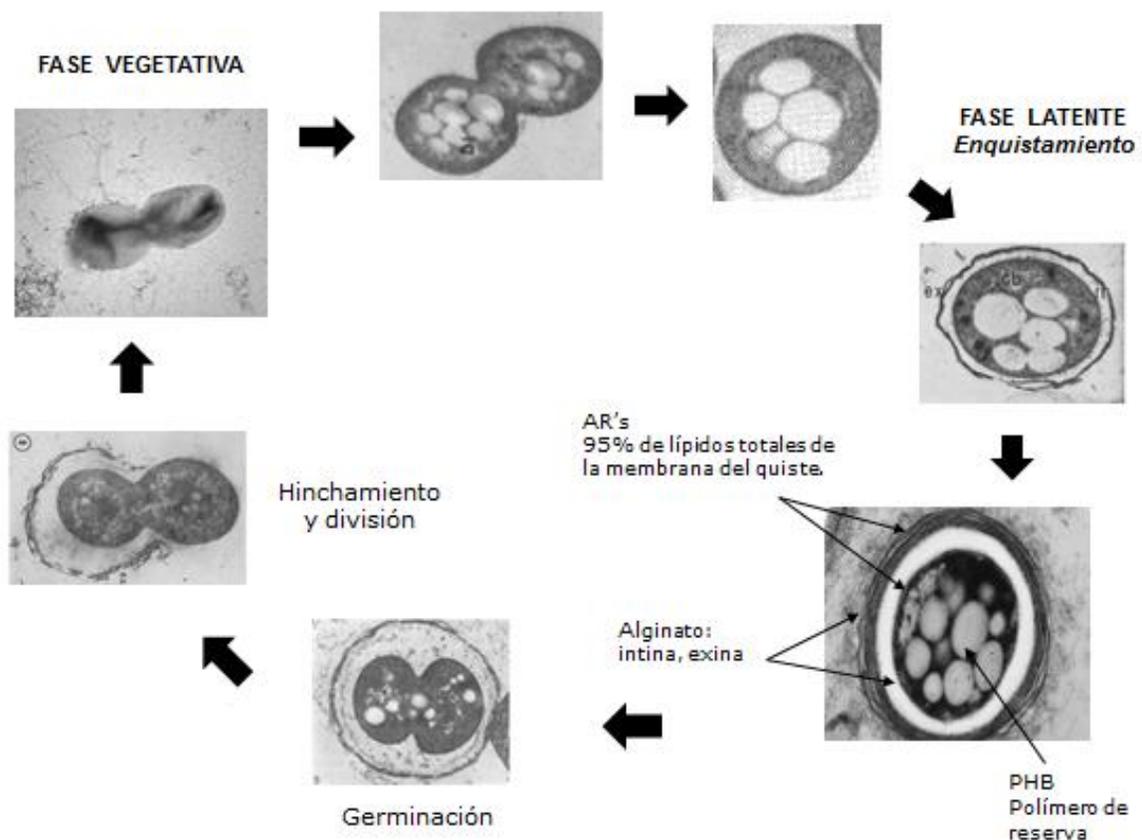


Figura 2. Ciclo de vida de *A. vinelandii*. Tomado y modificado de Wyss *et al.*, 1961.

1.1.2 Enquistamiento

Tras la inducción del enquistamiento, las células dejan de ser móviles y sufren una última división celular para dar origen a dos células completamente redondas y cubiertas del exopolisacárido alginato. A las 6 h empieza la secreción desde la superficie de las células de estructuras parecidas a membranas las cuales en aproximadamente 30 h forman la exina que es la capa más externa que rodea al quiste maduro. Posteriormente se forma la intina que es una estructura que se encuentra en el espacio entre la exina y la membrana celular externa. La culminación de estos eventos es el quiste maduro que consiste de la célula redonda y pequeña (Fig. 3). Esta célula o cuerpo central está cubierta por dos capas; intina y exina, compuestas principalmente de lipoproteínas y alginato, y dentro del cuerpo central se observan numerosos gránulos de PHB (Forsyth *et al.*, 1958; Lewis, 1937; Stevenson and Socolofsky, 1966). Los quistes son células alargadas de 1.5 a 2.0 μm , miden aproximadamente la mitad del volumen de las células vegetativas.

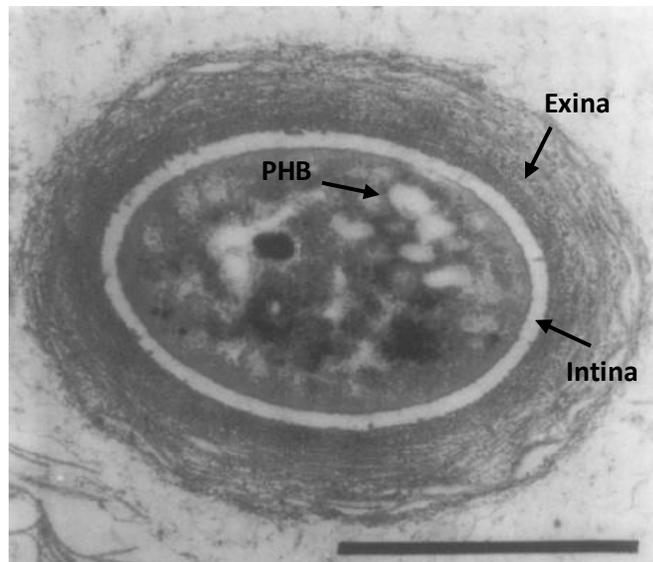


Figura 3. Quiste de *A. vinelandii* (marcador, 1 μm). Tomado y modificado de Hitchins y Sadoff, 1970.

1.1.3 Germinación

La germinación es el proceso por el cual los quistes metabólicamente inactivos sufren los cambios necesarios para convertirse en células vegetativas. Esta ocurre cuando los quistes se incuban en medio Burk sin nitrógeno en condiciones aeróbicas con una fuente de

carbono como glucosa o sacarosa. La germinación ocurre a 30°C. Microscópicamente la primera evidencia de la germinación es la pérdida gradual de refractabilidad que se observa en el microscopio de contraste de fases. Este proceso dura de 4 a 8 h, durante este tiempo, el cuerpo central se hincha y ocupa el volumen de la intina (Loperfido and Sadoff, 1973).

A las 8 h, el crecimiento del quiste dentro de la exina causa una fractura de esta capa y emerge una célula en división todavía no mótil. Los componentes de la exina no parecen ser utilizados durante la germinación ya que se pueden observar como cáscaras vacías y rotas. Las células vuelven a ganar motilidad antes de la primera división post-germinación.

1.1.4 Composición del quiste

Los quistes de *A. vinelandii* contienen el doble de lípidos y una gran variedad de ácidos grasos que las células vegetativas correspondientes (Kaneshiro and Marr, 1962; Koo, 1969).

El alginato está conformado de ácido manurónico (M), y ácido gulurónico (G) que constituyen 40% de la exina y 72% de la intina (Page and Sadoff, 1975). Los cuales existen como homo y hetero-polímeros cuya proporción en la exina e intina varía. La exina es rica en ácido poligulurónico, mientras la intina contiene altos niveles de polimanuronato (Tabla 1). Los fosfolípidos de membrana son remplazados por lípidos fenólicos: alquilresorcinoles (ARs) y alquilpironas (APs), los alquilresorcinoles también son componentes importantes de la exina (Segura *et al.*, 2009)

Tabla 1 Composición química de células vegetativas y componentes del quiste

| Material celular | Porcentaje (peso seco) | | | |
|------------------|------------------------|--------|--------|-------|
| | Célula vegetativa | Quiste | Intina | Exina |
| Carbohidratos | 28 | 45 | 44 | 32 |
| Proteínas | 52 | 26 | 9.1 | 28 |
| Lípidos | 9.2 | 16 | 36 | 28 |

Tomado de Socolofsky and Wyss 1962.

1.1.5 Propiedades de los quistes

Los quistes son células metabólicamente inactivas que son considerablemente más resistentes a condiciones deletéreas o adversas que las células vegetativas. En el laboratorio son viables por más de 10 años cuando se mantienen en suelo seco (Vela, 1974), sugiriendo que la resistencia a la desecación les permite sobrevivir en estas condiciones en la naturaleza.

Los quistes del género *Azotobacter* son más resistentes que las células vegetativas a varios tipos de agentes, no muestran resistencia marcada al calor, aunque si presentan resistencia a radiación gamma, tratamiento sónico y desecación.

Diversos estudios en *Azotobacter agilis*, demuestran que la irradiación durante 22 segundos con una lámpara de luz UV son suficientes para producir una inactivación del 90% en quistes, mientras 15 segundos son suficientes para inactivar el mismo porcentaje de células vegetativas. Para el caso de la radiación gamma, la resistencia de los quistes sobre las células vegetativas es más marcada (Socolofsky & Wyss, 1962).

Cultivos de células vegetativas y quistes expuestos a temperaturas de 40 a 60°C por un periodo de 15 min indican que los quistes no presenta tolerancia térmica más allá de los 60°C, mientras a 52°C solamente el 1% de las células vegetativas persisten (Socolofsky & Wyss, 1962). Para el caso de resistencia a la desecación, un periodo de 12 días, en membranas colocadas en cajas Petri o secadas en desecadores, redujo la viabilidad de las células vegetativas en un 99% en el primer día mientras los quistes se mantuvieron viables (Socolofsky & Wyss, 1962).

1.2 Estrés abiótico: Desecación

El estrés biológico es una fuerza adversa o una condición que inhibe el funcionamiento normal de un sistema biológico. Los organismos están continuamente expuestos a diversos tipos de estrés ambiental que influyen su desarrollo, crecimiento y productividad.

El estrés en los organismos ocasiona cambios en el volumen de la célula y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que afectan estructuras celulares, subcelulares y proteínas (Bartels y Sunkar, 2005). El estrés abiótico causado por desecación conlleva a la pérdida del agua de la membrana, ocasionando cambios en la estructura de la bicapa lipídica, lo que trae como resultado que la membrana se vuelva porosa, ocurre un desplazamiento de las proteínas de membrana, contribuyendo a la pérdida de la integridad de la misma (Zhu *et al.*, 1997). Las proteínas pueden reducir su actividad o incluso pueden desnaturalizarse completamente cuando son deshidratadas.

1.2.1 Respuestas de los organismos ante el estrés

Algunas plantas, animales y microorganismos son capaces de desecarse por completo y permanecer viables durante largos periodos de tiempo. (Browne *et al.*, 2002; Caprioli *et al.*, 2004). Este fenómeno es conocido como anhidrobiosis (“vida sin agua”). Los organismos anhidrobióticos se vuelven metabólicamente activos después de la rehidratación. Diversas especies de plantas como *Selaginella lepidophylla* son capaces de tolerar la desecación de una manera eficiente; son comúnmente llamadas plantas de “resurrección” porque pueden tolerar la deshidratación completa entrando en un estado de dormancia y se vuelven metabólicamente activas una vez que el agua se encuentra nuevamente disponible (Fig. 4).



Figura 4. Plantas resistentes a la desecación. *S. lepidophylla* en desecación y después de 20 min de ser rehidratada.

Los organismos anhidrobióticos incluyen levaduras, quironómidos, rotíferos (Fig 5), nematodos, que son capaces de permanecer en estado anhidrobiótico por largos periodos de tiempo; se sabe que invertebrados han sido revividos exitosamente después de décadas de inactividad (Guidetti and Jonsson, 2002) y plantas han sido germinadas después de 1,300 y 2,000 años (Sallon *et al.*, 2008).



Figura 5. Organismos anhidrobióticos. *Philodina roseola* recuperándose de la desecación después de la inmersión en agua.

Debido a que el agua es esencial para la vida, es de esperarse que los sistemas biológicos hayan evolucionado para permitir la desecación completa sin pérdida de viabilidad; en el estado de deshidratación, los organismos tolerantes a la desecación son altamente resistentes a diferentes tipos de estrés. Esto contrasta dramáticamente con las células y organismos sensibles a la desecación, que sufren daño en todos los componentes celulares, las proteínas pierden su conformación correcta, las membranas pasan por una transición de fase causando permeabilidad y fusión, pérdida de la estabilidad del DNA y RNA, entre otras (Kanas and Acker, 2006).

Las adaptaciones de los microorganismos ante una situación de estrés por desecación pueden ocurrir a nivel molecular, (cambios en la expresión de genes, síntesis de proteínas de estrés, etc.) y a nivel bioquímico (cambios celulares y fisiológicos).

Las plantas superiores han desarrollado estructuras especializadas, como las semillas que les permiten mantener sus funciones en un estado de deshidratación, también se sabe que distintos organismos que se encuentran bajo una condición de estrés, acumulan solutos compatibles con el metabolismo, como sacarosa, trehalosa, glicin betaína, ectoína, prolina, entre otros. Una respuesta es la producción de proteínas altamente hidrofílicas llamadas “hidrofilinas” (Battaglia *et al.*, 2008). Entre éstas, las proteínas más caracterizadas son las proteínas LEA, (Late Embryogenesis Abundant Proteins).

1.3 Proteínas LEA

Las proteínas LEA son un grupo diverso de proteínas hidrofílicas que se acumulan en altos niveles en las semillas durante la fase de maduración cuando hay deshidratación (Baker *et al.*, 1988). Su expresión está asociada a la adquisición de tolerancia por frío, estrés osmótico, por ácido abscísico exógeno o se expresan constitutivamente (Welin *et al.*, 1994). Estas proteínas fueron descritas originalmente en semillas de plantas, pero ahora se sabe que se encuentran en invertebrados y microorganismos (Tunnacliffe and Wise, 2007).

La mayoría de las proteínas LEA y otras hidrofílicas no tienen una estructura definida, es decir son intrínsecamente desordenadas durante la hidratación, se cree que las proteínas LEA pueden adoptar una estructura definida bajo las condiciones donde se supone que funcionan, por ejemplo durante la deshidratación parcial o total (Hundertmark *et al.*, 2012; Tunnacliffe and Wise 2007).

El mecanismo celular de la acción de las proteínas LEA no ha sido completamente dilucidado pero se ha visto que protegen estructuras celulares y moleculares de los efectos dañinos de la pérdida de agua debido a que mantienen la estructura de la membrana y de las proteínas, previniendo la formación de agregados (Hincha and Thalhammer, 2012; Li *et al.*, 2012; Tolleter *et al.*, 2010) actuando como escudos moleculares (Chakrabortee *et al.*, 2012; Furuki *et al.*, 2012; Hatanaka *et al.*, 2013). También secuestran iones y actúan como buffers de hidratación, evitando la pérdida de agua de las células (Tompa *et al.*, 2010).

Las proteínas LEA desempeñan principalmente funciones en la tolerancia a la deshidratación, la resistencia al estrés de toda la planta a la sequía, la sal y el frío. Se sabe que las proteínas LEA se expresan en diferentes niveles a través de todas las etapas del desarrollo en diferentes tejidos por ejemplo, en cotiledones y panículas de semillas (Zhang *et al.*, 2002), y en tejidos vegetativos como tallos, hojas y raíces (Lin and Hu, 1997; Bent, 2000; Hou and Guo, 1998; Federspiel, 2003).

1.3.1 Estabilidad de proteínas

Se sabe que las proteínas LEA y otras hidrofílicas pueden preservar la actividad enzimática *in vitro* en algunas proteínas después de un tratamiento de desecación o congelamiento (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004). Un mecanismo de protección observado es la prevención de la agregación de proteínas sensibles inducida por estrés; la citrato sintasa (CS) y la

lactato deshidrogenasa (LDH), forman agregados insolubles cuando son desecadas o congeladas, pero la agregación es notablemente reducida en presencia de proteínas LEA (Goyal *et al.*, 2005). Probablemente debido a su estado no plegado e hidrofílico, las proteínas LEA no son susceptibles a agregarse durante la desecación, congelamiento o las altas temperaturas. La actividad anti-agregación de las proteínas LEA recuerda a las chaperonas moleculares, cuya función en la célula es facilitar el correcto plegamiento y ensamblaje de las proteínas (Fig.6).

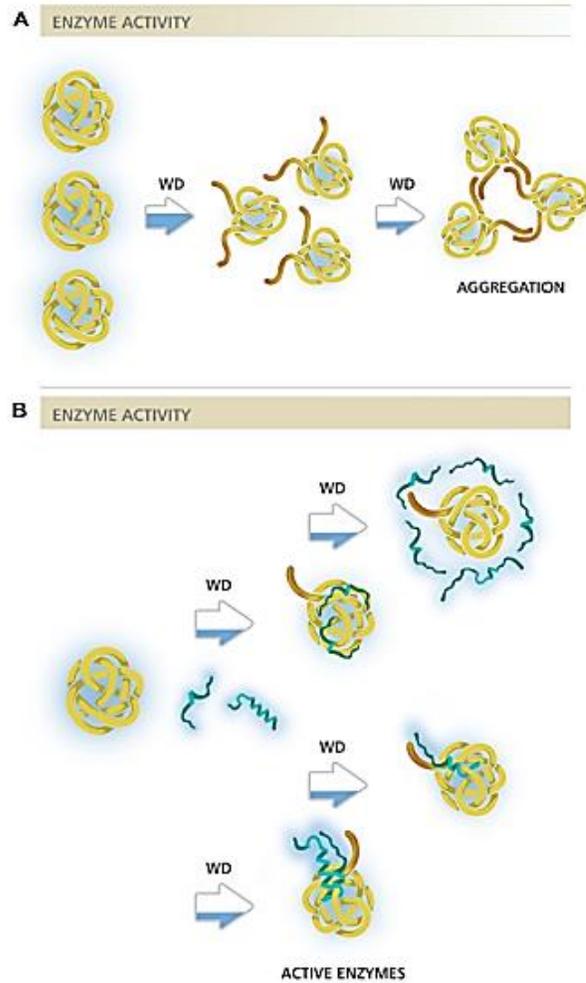


Figura 6. Mecanismos de acción propuestos de una proteína LEA. Tomado de Cuevas-Velázquez., *et al* 2014.

1.3.2 Protección de membranas

La protección de membranas es esencial para preservar la integridad celular durante la desecación. Debido a su carácter hidrofílico, las proteínas LEA son polipéptidos solubles, que por lo tanto no se espera que interaccionen directamente con las membranas. Podrían jugar un papel parecido al de los azúcares protectores, que debido a su carácter también hidrofílico contribuyen a mantener la membrana al proveer sus grupos H para formar puentes de hidrógeno con los grupos polares de los fosfolípidos, lo que ayuda a mantener el orden de la membrana. Se sabe que proteínas LEA de rotíferos mantienen la integridad de la membrana asociándose con la bicapa de fosfolípidos (Pouchkina-Stantcheva *et al.*, 2007).

1.4 Clasificación

Las proteínas LEA se han clasificado en 7 grupos de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos y motivos específicos (Battaglia *et al.*, 2008) o por similitud de composición de péptidos más que por similitud de secuencia de proteínas (Wise and Tunnacliffe, 2004).

Las proteínas del Grupo 1 (G1LEA) de plantas, contienen una secuencia de 20 residuos de aminoácidos (20-mero) en diferente número de copias, las proteínas de este grupo desempeñan un papel importante en el desarrollo del endosperma y en la protección osmótica de los órganos vegetativos (Swire-Clark y Marcotle, 1999).

Otro grupo que se ha estudiado ampliamente es el 2 (G2LEA); las proteínas LEA de éste grupo son también llamadas dehidrinas (Rohrig *et al.*, 2006). Las proteínas del Grupo 2, contienen una secuencia conservada de 15 aminoácidos (EKKGIMDKIKEKLPG) en el C-terminal, y desempeñan un papel importante en el metabolismo como chaperonas moleculares, también juegan un papel importante en la resistencia a la sequía (Chen *et al.*, 2003; Wisniewski and Zagdanska 2001; Rizhsky and Mittler, 2002).

En el Grupo 3 (G3LEA) se encuentran las proteínas que están constituidas por una secuencia de 11 aminoácidos (TAQAAKEKAGE), cuya secuencia puede formar una hélice anfipática que podría participar en el secuestro de iones durante la deshidratación (Zhang and Zhao, 2003). En el Grupo 4 (G4LEA) se encuentran proteínas que están desprovistas

de secuencias con motivos repetidos, sin embargo, contienen una región conservada en el extremo N terminal cuya estructura forma una hélice anfipática, se sabe que su principal función está involucrada en mantener la integridad de la membrana plasmática durante la deshidratación (Li *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 2003).

En el grupo 5 (G5LEA) se encuentran las proteínas LEA “atípicas”, en las cuales hay una baja especificidad de residuos de aminoácidos y estos tienen la característica de ser hidrofóbicos, se sabe que juegan un papel importante en la maduración de la semilla y la deshidratación (Han and Kermode, 1996; Chen *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

La mayoría de las proteínas LEA de animales descubiertas pertenecen al grupo G3LEA, aunque embriones de *Artemia franciscana* y tardígrados expresan algunas proteínas LEA del grupo I (G1LEA). Diversas proteínas LEA se han encontrado en animales como nematodos, rotíferos, quironómidos, crustáceos y tardígrados (Campos *et al.*, 2003)

ANTECEDENTES

2.1 Genes que regulan la tolerancia a la desecación en quistes

En *A. vinelandii* se ha estudiado ampliamente el enquistamiento y los factores que afectan dicho proceso, se conocen ya algunos reguladores globales que coordinan una respuesta en diferentes genes que está involucrados en la formación estructural del quiste, así como en su tolerancia a la desecación. Entre los genes y reguladores ya descritos se encuentran genes para la biosíntesis del alginato (*algC* y *algD*), reguladores como RpoS, AlgU y una chaperona pequeña de choque térmico Hsp20, entre otros.

El factor sigma AlgU y su proteína antisigma MucA están implicados en el control de la síntesis de alginato en *A. vinelandii*, se requiere a AlgU para la transcripción del gen *algD* de uno de sus tres promotores (Nuñez *et al.*, 2000). El gen *algC*, que participa en la producción de alginato y lipopolisacáridos, se transcribe a partir de dos promotores, uno de los cuales, P1, depende de AlgU. Similar a las cepas que llevan mutaciones en los genes biosintéticos de alginato que es esencial para el enquistamiento, las mutantes en *algU* son incapaces de producir alginato y formar quistes resistentes a la desecación (Moreno *et al.*, 1998). Por microscopía electrónica se determinó que al igual que las mutantes en los genes biosintéticos de alginato, las mutantes en *algU* carecen de las capas de cápsula intina y exina (Moreno *et al.*, 1998).

El factor sigma RpoS es un regulador central durante la fase estacionaria en bacterias (Navarro Llorens *et al.*, 2010). En *A. vinelandii*, RpoS regula la formación de quistes y activa varios genes implicados en la síntesis de los componentes del mismo como alginato, PHB y ARs. La inactivación de *rpoS* no perjudica la síntesis de alginato, pero se ha demostrado que reduce significativamente la producción de PHB y anula la síntesis de ARs (Castaneda *et al.*, 2001; Cocotl-Yañez *et al.*, 2011; Hernandez- Eligio *et al.*, 2011).

Una mutante en *rpoS* es incapaz de formar quistes resistentes a la desecación. El análisis mediante microscopía electrónica de los quistes formados por esta mutante reveló que carecen de las capas intina y exina del quiste (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011), lo que sugiere que RpoS debe controlar los genes implicados en la formación de la estructura del quiste.

Se ha identificado una proteína pequeña de choque térmico, Hsp20 una de las proteínas más abundantes en los quistes de *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2014). Se ha confirmado que la transcripción de *hsp20* se controla a partir de un promotor RpoS dependiente y se sabe que Hsp20 también es esencial para la resistencia a la desecación de los quistes de *A. vinelandii*.

2.2 Distribución y expresión de proteínas LEA

Las proteínas LEA se identificaron por primera vez en plantas terrestres (Galau *et al.*, 1986; Dure *et al.*, 1981) y su expresión está asociada con tolerancia a la desecación en las semillas (Bartels, 2005).

Durante los últimos años, una serie de hallazgos han demostrado que estas proteínas están presentes en bacterias (Dure, 2001; Stacy and Aalen, 1998; Battista *et al.*, 2001), cianobacterias (Close and Lammers, 1993), mohos (Eichinger *et al.*, 2005) y hongos (Sales *et al.*, 2000). (Campos *et al.*, 2003)

Sin embargo, únicamente han sido encontradas proteínas LEA de los grupos G1LEA y G3LEA en organismos diferentes de plantas.

2.2.1 Proteínas LEA en eucariontes

En *Artemia franciscana*, se han encontrado proteínas LEA y LEA-like (Menze *et al.*, 2009; Sharon *et al.*, 2009; Hand *et al.*, 2007). AfrLEA1 es altamente hidrofílica y presenta similitud de secuencia con una proteína LEA de *C. elegans* (CeLEA). AfrLEA2, presenta homología con proteínas G3LEA de plantas (*Brassica napus*). Se ha estudiado la función de diferentes genes *lea* en la respuesta al estrés hipersalino en el desarrollo embrionario y se sabe que al menos 3 genes que codifican para proteínas LEA están altamente expresados en quistes y en embriones post-diapausicos, indicando que juegan un papel importante en la respuesta al estrés salino (Wu *et al.*, 2011).

En el rotífero *Adineta ricciae* (Pouchkina-Stantcheva *et al.*, 2007) se encontraron dos genes LEA (Arlea1A, Arlea1B) situado en dos zonas separadas del cromosoma. La expresión de ambos genes aumenta varias veces durante la desecación. La secuencia de las proteínas de ambos genes son similares, pero su estructura en el estado hidratado difiere

significativamente ArLEA1A se encuentra intrínsecamente desordenada en el estado hidratado, y adquiere una conformación de α -hélices tras la desecación, ArLEA1B, en contraste, presenta una estructura de α -hélices en el estado hidratado.

También se sabe que LEA1A previene la agregación de la enzima citrato sintasa (CS) probablemente interactuando con los fosfolípidos, mientras que ArLEA1B aumenta la agregación de esta enzima.

Por otro lado en otro rotífero, *Brachionus plicatilis* se reportaron 3 secuencias EST que presentaban homología en secuencia con proteínas G3LEA (BpaLEA1 y BpaLEA2). Ambas proteínas son altamente hidrofílicas pero difieren en tamaño por aproximadamente 360 aminoácidos. BpaLEA1 muestra alta similitud con CeLEA1 de *C. elegans* y con una proteína G3LEA de soja. BpaLEA2 exhibe similitud con una proteína que contiene dominio LEA de *A. thaliana* (Denekamp *et al.*, 2009). Se analizó la expresión de las secuencias y se sabe que se encuentran principalmente en hembras que producen embriones diapausicos y quistes, pero no se encontraron en otras hembras ni en machos y desaparecen durante la eclosión, sugiriendo una expresión programada durante el desarrollo, formación del quiste y la germinación del mismo ya que los transcritos de las proteínas LEA se degradan durante la germinación (Denekamp *et al.*, 2010).

En el 2012, Browne y colaboradores, reportaron la expresión de una proteína G3LEA inducida por desecación en el nematodo *Aphelenchus avenae*, la proteína está compuesta por 143 aminoácidos, es altamente hidrofílica (con una hidropatía de -1.58), y presenta cuatro copias de un motivo 11-mero que es característico de las proteínas LEA del grupo 3.

2.2.2 Proteínas LEA en procariontes

En *Bacillus subtilis*, se ha reportado la similitud entre un motivo hidrofílico repetido presente en una proteína relacionada con el estrés salino, choque térmico y limitación de oxígeno (GsiB) y un motivo interno repetido del grupo G1LEA (Stacy and Aalen, 1998)

En *Deinococcus radiodurans* se encontró el gen DR1172, un homólogo de la familia LEA76 y DRB0118, un homólogo de una proteína asociada con la tolerancia a la desecación en *Craterostigma plantagineum*. La inactivación de estos genes por transposición “*in vitro*”

ocasionó una pérdida de viabilidad del 75% cuando los cultivos fueron expuestos a desecación por un período de 2 semanas. Esto demuestra que los genes DR1172 y DRB0118 codifican para proteínas necesarias para la resistencia a la desecación en esta especie (Batista *et al.*, 2001).

En el 2013, Campos y colaboradores, realizaron un análisis para identificar homólogos de proteínas G1LEA en organismos diferentes de plantas, para lo cual utilizaron la base de datos de NCBI y realizaron un BLAST con las secuencias AtEM1 de *Arabidopsis*, y el 20-mero de la proteína GsiB de *B. subtilis*.

Encontraron secuencias que codifican proteínas que contienen el motivo G1LEA, para 32 genomas bacterianos y 2 Arqueas. Entre los genomas bacterianos se incluyen 22 especies del phylum Firmicutes, 10 Especies del phylum Proteobacteria y uno del phylum Chloroflexi. También determinaron que el número de genes *lea* encontrados, varía ampliamente entre las especies.

En *A. vinelandii* se identificaron cuatro genes, *Lea1*, *Lea2*, Avin2300, Avin44390 (anotados en el genoma como Avin11010 y Avin11020, Avin2300, Avin44390 respectivamente) que comparten identidad con proteínas LEA de plantas y con una proteína presente en *Bacillus sp* que se induce bajo condiciones de estrés (Wu *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013).

Únicamente las secuencias de los genes *Lea1* y *Lea2* contienen el motivo eucarionte característico de las proteínas LEA, pero difiere de los motivos encontrados en bacterias.

JUSTIFICACIÓN

En la mayoría de los organismos, la dormancia, o la pausa metabólica, está asociada con la desecación. Como mencionamos anteriormente *A. vinelandii* sufre un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación y una vez que las condiciones son favorables, los quistes germinan a células vegetativas.

Para entender el mecanismo de regulación del proceso de enquistamiento y de su tolerancia a desecación así como otros tipos de estrés en *A. vinelandii*, se pretende determinar el papel que juegan los genes *lea1* y *lea2* en la tolerancia a la desecación de los quistes y en la tolerancia a otros tipos de estrés abiótico en células vegetativas. Estos genes presentan homología con proteínas LEA, que son expresadas en plantas y otros organismos en respuesta a diversos tipos de estrés como desecación, entre otros.

HIPÓTESIS

Los genes *Lea1* y *Lea2* están involucrados en la tolerancia a la desecación y otros tipos de estrés abiótico en quistes y células vegetativas de *A. vinelandii*.

OBJETIVO

Analizar el papel que desempeñan los genes *Lea1* y *Lea2* bajo distintas condiciones de estrés abiótico en quistes y células vegetativas de *A. vinelandii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si los genes *Lea1* y *Lea2* están involucrados en el proceso de la formación del quiste y en la tolerancia a la desecación en *A. vinelandii*.
- Determinar si los genes *Lea1* y *Lea2* están involucrados en la resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico como salinidad y altas temperaturas en quistes y células vegetativas.
- Analizar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas LEA de *A. vinelandii* en *E. coli*
- Determinar la actividad protectora de las proteínas LEA sobre la enzima lactato deshidrogenasa “*in vitro*”

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Medios de cultivo y cepas utilizadas

Para todos los experimentos se utilizó la cepa AEIV de *A. vinelandii*, el medio utilizado para el crecimiento de células vegetativas fue Burks sacarosa (BS) (Kennedy *et al.*, 1986), para la producción de quistes se utilizó el medio BB, utilizando como fuente de carbono butanol al 0.2% (Sadoff *et al.*, 1971) esterilizado por filtración.

Se utilizaron las cepas DH5 α y BL21 (DE3) de *Escherichia coli* para transformar y expresar los genes y la proteína LEA recombinante respectivamente.

6.2 Análisis “*in silico*” de secuencias

Se realizó un BLAST utilizando la secuencia de los genes Avin11010 y Avin11020, se decidió renombrar a los genes como *Lea1* y *Lea2*, respectivamente. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando secuencias codificantes para proteínas LEA en diferentes organismos utilizando el programa en línea CLUSTAL OMEGA. Se construyeron curvas de hidropatía utilizando el algoritmo Kyte & Doolittle para predecir el grado de hidrofobicidad de las proteínas y PONDR (Predictor of Natural Disordered Regions, <http://www.pondr.com/>) para determinar el grado de desorden de las proteínas analizadas.

6.3 Clonación de genes *Lea1* y *Lea2*

El gen *Lea2* se localiza río arriba del gen *Lea1* (Fig. 7). Se diseñaron los oligonucleótidos Av1020F1 / Av1020R1 para amplificar mediante PCR una región de 1.12 Kb (Fig. 8a) que contenía la región codificante de ambos genes, utilizando como templado ADN cromosomal de *A. vinelandii*, AEIV (WT). El ciclo de amplificación de PCR fue el siguiente: 98°C 10”, 98°C 30”, 56°C 30”, 72°C 40”. El fragmento amplificado se ligó en el vector de clonación pJET1.2 / blunt (Fig. 8b) para producir el plásmido pLEA11012. Posteriormente se transformaron células de *E.coli*, se confirmó la identidad de las clonas mediante secuenciación.

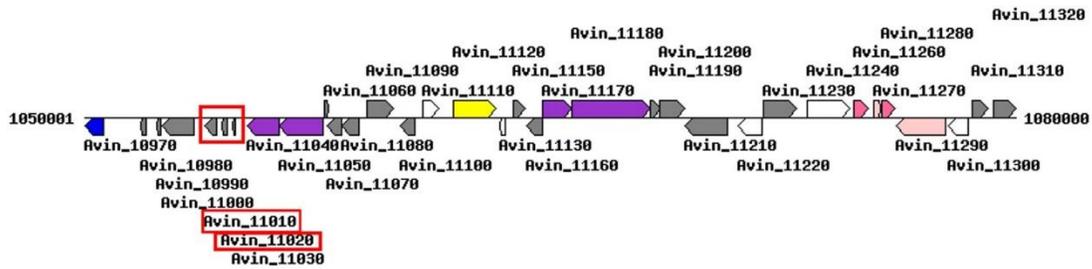


Figura 7. Mapa genético de la región de los genes *Lea1* y *Lea2* en el cromosoma de *A. vinelandii*.

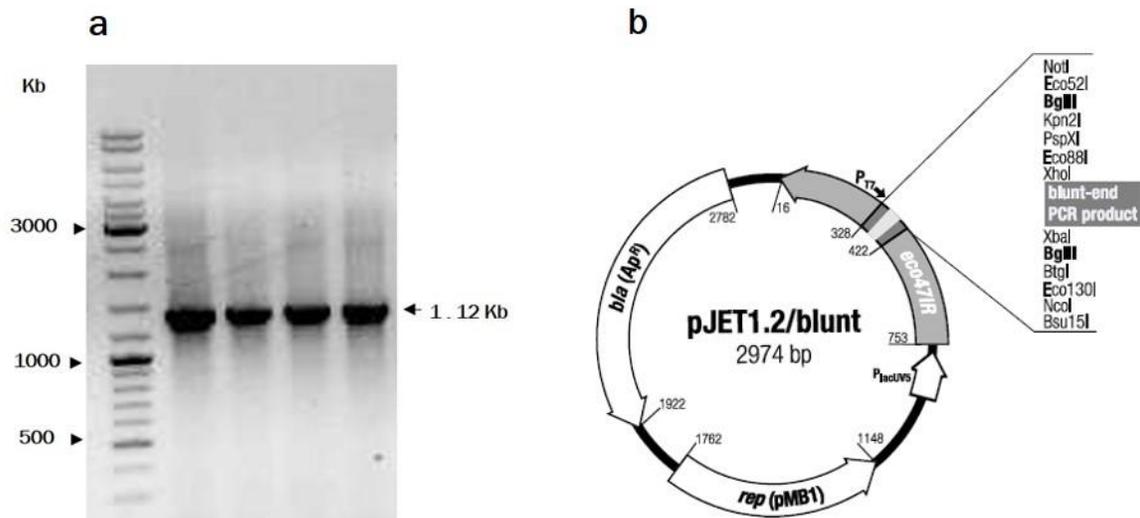


Figura 8. Producto de PCR de la amplificación de los genes *Lea1* y *Lea2* (a). Carriles: (1) Marcador de peso molecular; (2-5) clonas de *E. coli* con el fragmento deseado. (b) Vector de clonación pJET1.2/blunt.

Para deletar el gen *Lea1* se diseñaron los oligonucleótidos Av10invF1/Av10invR1 que se utilizaron para eliminar mediante PCR inversa un fragmento de 299 pb de la región codificante *Lea1* del plásmido pLEA11012. El ciclo de amplificación de PCR fue el siguiente: 98°C 10", 98°C 30", 56°C 30", 72° 40". El plásmido linearizado obtenido se ligó a un cassette de resistencia a gentamicina (Gm^r), para producir el plásmido pLEA1101, en el cual el gen *Lea1* fue reemplazado por el Gm^r .

De la misma forma, los oligonucleótidos Av20invF1/Av20invR1 se utilizaron para eliminar por PCR inversa 89 pb del gen *Lea2* del plásmido pLEA11012 mediante el siguiente ciclo

de amplificación: 98°C 10", 98°C 30", 56°C 30", 72° 40". El fragmento resultante se clonó a un cassette de resistencia a kanamicina (Km^r) para producir el plásmido pLEA1102.

Para eliminar ambos genes *Lea1* y *Lea2* del plásmido pLEA11012, se eliminó mediante PCR inverso un fragmento de 636 pb que contenía región codificante de ambos genes utilizando los oligonucleótidos Av10invF1/Av20invR1. Los genes *Lea1-Lea2* fueron reemplazados por un cassette de resistencia a espectinomicina (Sp^r) para producir el plásmido pLEADC. El ciclo de amplificación de PCR para deletar ambos genes fue el siguiente: 98°C 10", 98°C 30", 56°C 30", 72° 40".

Para construir la cepa complementante *Lea1-2-pLea1-2*, se transformó el plásmido pLEA11012 en la doble mutante *Lea1-Lea2* para su integración en el cromosoma de *A. vinelandii* como resultado de un evento de recombinación homóloga. Se prepararon células competentes de *A. vinelandii* AEIV (Anexo B) y se transformaron con los plásmidos pLEA1101, pLEA1102 y PLEADC, como se describió anteriormente por Bali *et al.*, 1992 (Anexo B). Las transformantes fueron seleccionadas mediante resistencia a gentamicina, kanamicina y espectinomicina y tetraciclina. Las cepas mutantes en los genes *Lea1*, *Lea2* y la doble mutante se denominaron *Lea1*, *Lea2* y *Lea1-Lea2*, respectivamente. La complementante se denominó *Lea1-2-pLea1-2* y se utilizó para confirmar que el fenotipo observado se debía a la ausencia de los genes *Lea1* y *Lea2*. Las mutaciones en los genes se confirmaron mediante PCR (Fig. 9). Con la interrupción de los genes y la inserción de los cassettes de resistencia, esperábamos una banda de 2,343 pb para la mutante en el gen *Lea1*, una de 3,311 pb para la mutante del gen *Lea2* y una de 1,571 pb para la doble mutante *Lea1-Lea2*.

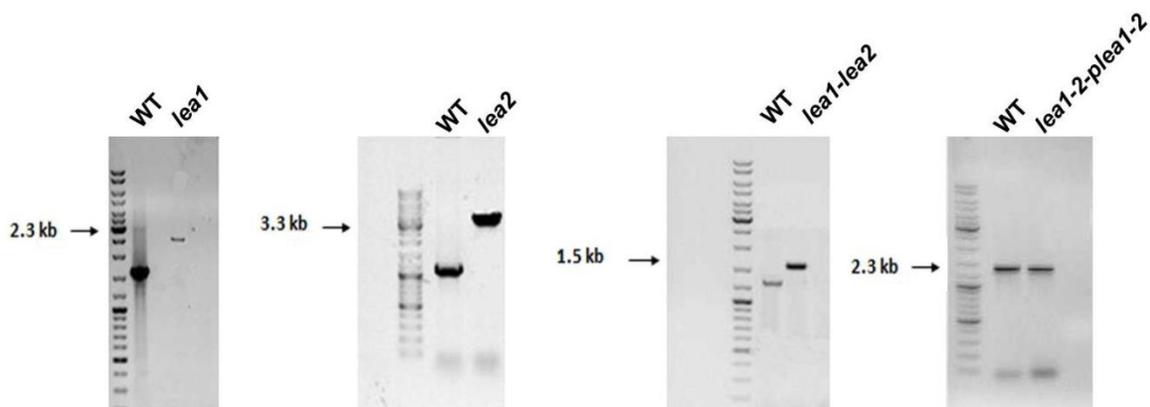


Figura 9. PCR de mutantes en los genes *Lea* de *A. vinelandii*. De izquierda a derecha: mutante en gen *Lea1* (*lea1*), mutante en gen *Lea2* (*lea2*), doble mutante (*lea1-lea2*), complementante (*lea1-2-plea1-2*).

6.4 Ensayo de enquistamiento

Para demostrar si la interrupción de los genes *Lea1* y *Lea2* en las mutantes de *A. vinelandii* tenía un efecto en el proceso de formación del quiste, se crecieron las cepas en agar con medio BB y se incubaron las placas por un lapso de 5 días. Transcurrido el tiempo, se levantó el tapete bacteriano, se tomó una muestra y se observó el fenotipo de los quistes en las mutantes mediante microscopía óptica.

Para determinar la tolerancia a la desecación de los quistes producidos por las mutantes se realizó el ensayo de resistencia a la desecación, (anexo B) para esto se utilizaron cultivos crecidos durante 24 h en medio líquido BS, se indujo el enquistamiento con 0.2% de n-butanol y se incubaron durante 5 días a 30°C (Campos *et al.*, 1996).

Se colocaron aproximadamente 10^6 CFU de cada cepa en membranas Millipore de 0.2 mm y se colocaron en cajas Petri estériles a 30°C durante tiempos prolongados desde 5 días hasta seis meses. Transcurrido el tiempo, se tomaron muestras para determinar la tolerancia a la desecación de los quistes, para lo cual cada muestra se resuspendió en 1 ml de medio BS. Se sembraron placas de medio BS con diferentes diluciones para determinar el número de CFU obtenidas. Las células capaces de germinar se consideraron tolerantes a la desecación. La cepa *gacA* se utilizó como control negativo, no es capaz de formar quistes debido a una mutación en el sistema GacS-GacA, un regulador del enquistamiento.

6.5 Fusiones transcripcionales de genes *Lea1* y *Lea2*.

Para determinar las condiciones de expresión de los genes, bajo condiciones vegetativas y de enquistamiento se construyeron fusiones transcripcionales para ambos genes *Lea*.

Para amplificar un fragmento de PCR de 178 pb que contenía la región promotora del gen *Lea1* se utilizaron los oligonucleótidos AvFTLEA1F1/AvFTLEA1R1, que contenían sitios de restricción *SacII* y *PstI*. Para amplificar la región promotora de 195 pb del gen *lea2* se utilizaron los oligonucleótidos AvFTLEA2F1/AvFTLEA2R1 con los mismos sitios de restricción. Los ciclos de amplificación usados fueron los siguientes:

Una vez obtenidos los fragmentos, se clonaron en el vector pUMATcgusAT (Muriel-Millán *et al.*, 2015), el cual contiene como reportero al gen *gusA*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa. Los plásmidos obtenidos se denominaron *pavLEA1-gusA*, para la fusión transcripcional del gen *Lea1* y *pavLEA2-gusA*, para el gen *Lea2*.

Estos plásmidos se transformaron en cepa AEIV; se seleccionaron transformantes resistentes a tetraciclina que contenían las fusiones génicas integradas al cromosoma como resultado de un evento de doble recombinación en el sitio *melA*. Las cepas de *A. vinelandii* obtenidas se denominaron *lea1-gusA* y *lea2-gusA* para el gen *Lea1* y *Lea2*, respectivamente. La presencia de las fusiones en los cromosomas de *A. vinelandii* se confirmó mediante PCR. Las actividades de β -Glucuronidasa de al menos tres cultivos independientes se determinaron siguiendo el método descrito en el anexo B. Una unidad de actividad β -glucuronidasa corresponde a 1 nmol de sustrato (X-Gluc) hidrolizado min⁻¹ mg proteína⁻¹.

6.6 Ensayos de tolerancia

Para determinar si la tolerancia a diferentes tipos de estrés en los quistes de las mutantes obtenidas de *A. vinelandii* se ve afectada por la interrupción de los genes *Lea1* y *Lea2*, se realizaron las siguientes pruebas de tolerancia en quistes y en células vegetativas.

6.6.1 Estrés osmótico

Se determinó la viabilidad de las células cuando las células fueron crecidas a diferentes concentraciones de NaCl y sorbitol. Se partió de un cultivo de 50 ml en medio BS de las diferentes cepas de *A. vinelandii* en matraces Erlenmeyer de 250 ml con los antibióticos correspondientes. Después de 48 h se centrifugó todo el cultivo y se lavaron las células con MgSO₄ 10 mM para eliminar el exceso de alginato, posteriormente se resuspendió la pastilla bacteriana en 1 ml de MgSO₄ y se inocularon matraces con medio BS que contenían diferentes concentraciones de NaCl y de sorbitol (0.1 y 0.5 M). La D.O. inicial se ajustó a 0.05 y transcurridas 48 h de crecimiento se sembraron 100 μ l de las diluciones apropiadas en placas de BS para determinar CFU.

Para los ensayos de estrés osmótico en *E. coli*, se partió de un precultivo de 20 ml las diferentes cepas, BL(DE3)/pET22b+, BL(DE3)/pavLEA1 y se inocularon 200 µl de estos en medio LB fresco con los antibióticos correspondientes.

Cuando los cultivos alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0.6, se adicionó Isopropil-β-D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína avLEA1 y se prolongó el crecimiento durante 2 h adicionales. 100 µl de estos Los cultivos se extendieron en placas de medio LB que contenían diferentes concentraciones de NaCl (0.1 - 0.5 M). La viabilidad celular se cuantificó como el porcentaje de CFU en las placas estresadas, con respecto al número de colonias de que aparecen en la placa control después de una incubación de a 37°C (Soto *et al.*, 1999).

6.6.2 Termotolerancia

Para investigar el efecto de las mutaciones en la tolerancia de las cepas a altas temperaturas se pusieron cultivos de 50 ml por duplicado de las diferentes células de *A. vinelandii* en medio BS durante 48 h a 30°C. La mitad de los cultivos de las cepas fueron utilizados para inducir el enquistamiento en medio BB, se lavaron y centrifugaron las células y una vez libres de alginato, se incubaron durante 5 días en medio BB líquido. Posteriormente se tomaron muestras de 1 ml en tubos de ensayo y se incubaron en baños de agua ajustados temperaturas en un rango de 40 a 65°C durante 15 min. Los tubos se retiraron y se enfriaron inmediatamente y se sembraron diferentes diluciones sobre placas de medio BS. Se determinó la viabilidad mediante CFU después de 48 h de incubación a 30° C.

6.7 Expresión y purificación de la proteína avLEA1

Para la construcción del vector de expresión pavLEA1, el cual contiene a la proteína avLEA1 fusionada a un Tag 6xHis en el C- terminal, se diseñaron los oligonucleótidos AvExpLEAF1/AvExpLEAR1 que contienen los sitios de restricción para las enzimas *NdeI*, y *XhoI*. Utilizando ADN de la cepa AEIV se amplificó un fragmento de 396 pb que correspondían al gen *lea1* sin el codón de inicio y término. Este fragmento fue clonado en el vector pET22b+ en los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* para producir el plásmido pavLEA1 (Fig. 10). Se utilizaron células de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para expresar la

proteína *avLEA1*. La cepa resultante que contenía el vector *pavLEA1* se denominó BL(DE3)/*pavLEA1*, como control se utilizó la cepa BL(DE3) que contenía el vector vacío.

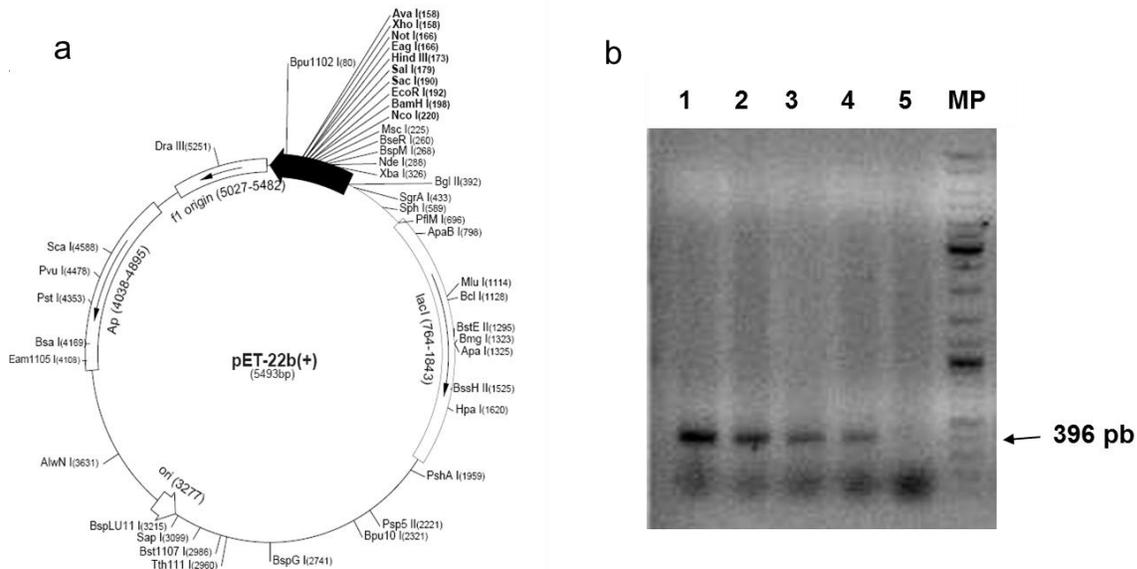


Figura 10. Expresión y purificación de la proteína *avLEA1* en *E. coli*. a) Vector de expresión pET22b+. b) Confirmación de la amplificación por PCR del gen *Lea1* clonado en el vector pET22b+ en *E. coli*, M. marcador de peso molecular; 1-5) Clonas analizadas.

La cepa BL (DE3)/*pavLEA1* se inoculó en medio LB suplementado con ampicilina y durante la noche a 37°C. Se utilizó una muestra del cultivo para inocular 100 ml de medio fresco a 0.05 OD_{600nm}. Después de 2 h a 37°C, se adicionó IPTG a una concentración de 1mM para inducir la proteína y se prolongó el crecimiento durante 2 h más.

Se centrifugaron los cultivos y los pellets bacterianos se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0) adicionando una tableta de inhibidor de proteasas por cada 50 ml de buffer. Las células se sonicaron en hielo y el extracto crudo se centrifugó por 20 min a 12, 000 rpm a 4°C. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE.

La purificación de las muestras se realizó mediante una columna Superflow Ni-NTA; se utilizaron 20 ml de buffer de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0) y 5 ml de buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 8.0).

Se confirmó la purificación de la proteína *avLEA1* en un gel de poliacrilamida al 12%. Se utilizaron muestras de las eluciones de los extractos de cultivos inducidos con IPTG después de 2 h, (Fig.11 a y b). Se confirmó la identidad de la proteína mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-His (Fig. 11c).

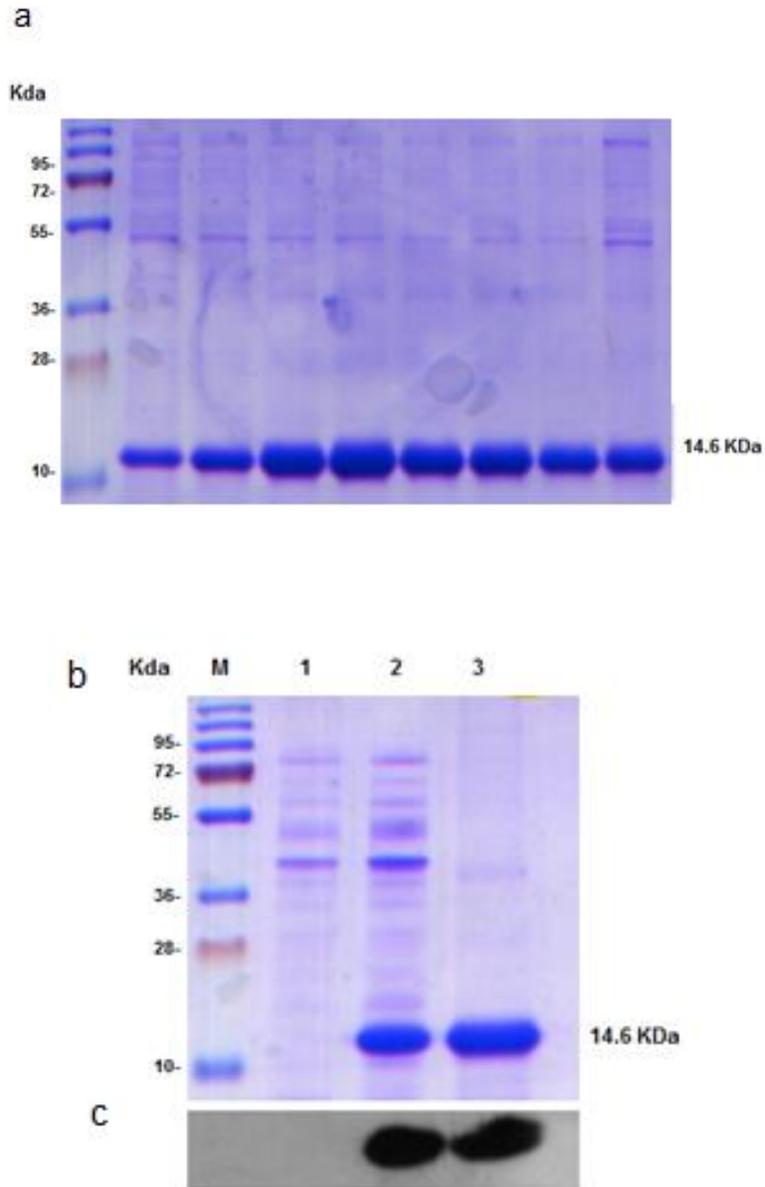


Figura 11. Expresión y purificación de la proteína *avLEA1* en *E. coli*. a) Gel de poliacrilamida de la expresión de la proteína *avLEA1* después de 2 horas de inducción con IPTG. b) M. marcador de peso molecular; 1) fracción soluble de células de *E. coli* BL21(DE3) sin IPTG. 2) fracción soluble de células de *E. coli* inducidas con IPTG después de 2 h. 3) proteína *avLEA1* purificada. c) Western Blot de la proteína *avLEA1* utilizando anticuerpo anti-His.

6.8 Ensayos de protección enzimática

Se disolvieron 0,4 mg/mL de L-lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo de conejo en buffer de ensayo que contenía 100 mM de Na_2HPO_4 (pH 7,5), piruvato 2 mM y NADH 100 mM. Para determinar la actividad enzimática de la LDH se añadieron 100 μl de la solución de LDH a 500 μl de agua desmineralizada por duplicado, a la mitad de las muestras se les agregó la proteína avLEA1 purificada a una relación molar 1:1. La mezcla de buffer con LDH que contenían o no la proteína purificada se sometieron a ciclos de congelamiento durante 15 min en hielo seco y posterior descongelamiento durante 15 min en un baño de agua a 25°C. Este ciclo se repitió hasta 10 veces, después de esto, la actividad de LDH se determinó mediante absorbancia a O.D._{340nm} durante 1 min debido a la conversión de NADH a NAD a 25 ° C. Todos los valores dados se expresaron como el porcentaje de la velocidad de la reacción medida para las muestras no tratadas. La actividad enzimática para cada muestra se determinó en al menos tres ensayos independientes. Como control positivo se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) en relación molar 1:1 debido a su actividad crioprotectora.

RESULTADOS

7.1 Las proteínas avLEA1 y avLEA2 DE *A. vinelandii* cumplen con las características estructurales de las proteínas G1LEA

El genoma de *A. vinelandii* contiene cuatro genes que codifican para proteínas LEA (Campos *et al.*, 2013). La proteína codificada por el gen Avin11010 contiene cuatro repeticiones del 20-mero, la proteína Avin11020 contiene sólo uno (Campos *et al.*, 2013). Las secuencias del 20-mero de la proteína codificada por Avin11010 similar a los 20-meros de las proteínas LEA1 de eucariontes, pero no en procariontes (Wu *et al.*, 2011).

Utilizando CLUSTAL OMEGA, se realizó una alineación múltiple de los 20-meros de las 4 proteínas LEA 1 de *A. vinelandii* y proteínas LEA 1 de otros organismos procariontes, arqueas y eucariotas (Fig. 12).



Figura 12. Alineamiento de la secuencia del 20-mero de proteínas LEA de *A. vinelandii* y proteínas LEA de otros organismos. Sub-motivos presentes en: Todos los organismos (sombreado gris); sub-motivo presente en Archaeas (subrayado); sub-motivo encontrado en bacterias (negrita); motivo en Eukarya (negro).

En el 2011, Wu *et al.*, reportó que la proteína codificada por el gen Avin11010 posee sub-motivos eucariotas. En este estudio, encontramos que el 20-mero presente en la proteína codificada por el gen Avin11020 también contiene el sub-motivo presente en las proteínas LEA eucariotas. El gen Avin44390 codifica para una proteína LEA que tiene un sub-motivo encontrado en Archeas, mientras que el Avin02300 posee el sub-motivo procariótico. La secuencia del 20-mero del gen Avin02300 comparte la mayor identidad con proteínas LEA presentes en las bacterias del género *Pseudomonas* (Fig. 12); las cuales están filogenéticamente relacionadas con *A. vinelandii* (Setubal *et al.*, 2009).

Centramos la atención en los genes Avin11010 y Avin11020 debido a que presentan los motivos repetidos característicos de las G1LEA (Campos *et al.*, 2013). De acuerdo con estos datos, denominamos a estos genes, *Lea1* y *Lea2* respectivamente y *avLEA1* y *avLEA2* a sus productos proteicos. La región codificante del gen *Lea1* es de 402 pb, generando una proteína de 133 residuos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 14,3 kDa y un pI teórico de 6.87. El gen *Lea2* codifica para una proteína de 55 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 5.9 kDa y un pI teórico de 9.9. El gen *lea2* se localiza río arriba del gen *Lea1* separado por una región intergénica de 165 nucleótidos. Las curvas de hidropatía de Kyte y Doolittle mostraron que ambas proteínas *avLEA1* y *avLEA2* son fuertemente hidrofílicas, con un índice de hidropatía de -1.6 y -1.3, respectivamente (GRAVY, Kyte y Doolittle, 1982) (Fig 13a).

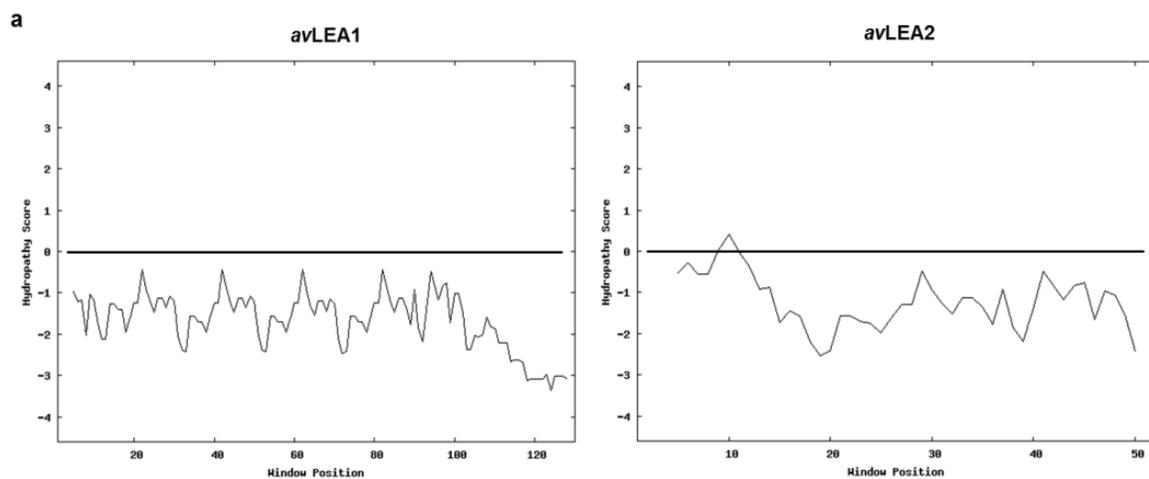


Figura 13. Análisis “*in silico*” de *avLEA1* y *avLEA2*. a) Patrón hidrofílico de *avLEA1* y *avLEA2* mediante curvas de hidropatía de Kyte-Doolittle.

Al igual que otras proteínas LEA, los programas de predicción desordenada sugieren que *avLEA1* y *avLEA2* carecen de una estructura terciaria determinada, encontrándose parcialmente desordenadas (Fig. 13b).

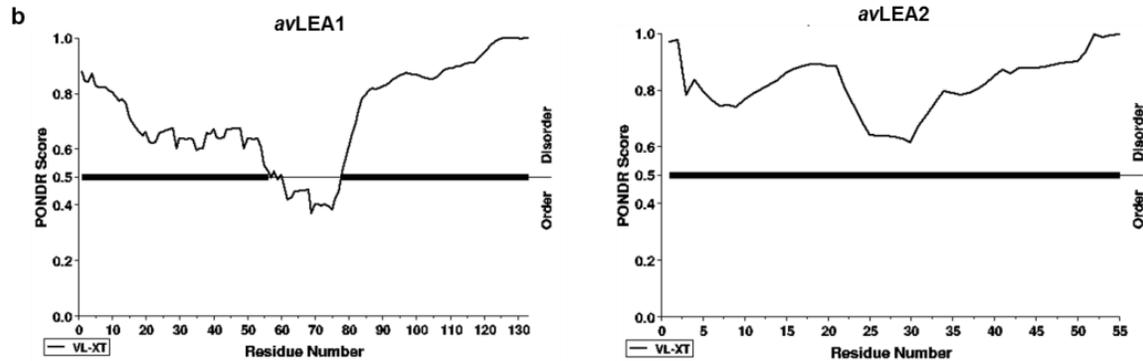


Figura 13. Análisis “*in silico*” de *avLEA1* y *avLEA2*. b) Predicción del grado de desorden de *avLEA1* y *avLEA2* usando el servidor web POND. R.

7.2 Obtención de mutantes en los genes *Lea* en *A. vinelandii*

Para la obtención de las cepas mutantes, se interrumpieron los genes *Lea1* y *Lea2* mediante PCR inversa y se ligaron con cassettes de resistencia a gentamicina (Gm^r) y kanamicina (Km^r) y espectinomicina (Sp^r) y los fragmentos se clonaron en el vector pJET 1.2/blunt.

Los plásmidos construidos fueron los siguientes: pLEA11012; contiene la amplificación del fragmento de los genes *Lea1* y *Lea2* (Fig 14a); pLEA1101, contiene la región intergénica del gen *lea1* interrumpida por un cassette de resistencia a Gm (Fig 14b); pLEA1102, contiene la región intergénica del gen *lea2* interrumpida por un cassette de resistencia a Km (Fig 14c); pLEADC, es el plásmido pLEA11012 utilizado para construir la doble mutante, el cual contiene ambos genes, *Lea1* y *Lea2* interrumpidos por un cassette de resistencia a Sp (Fig 14d); el plásmido pLEADC se utilizó para complementar la doble mutante por recombinación homóloga en el cromosoma de *A. vinelandii*.

Todas las construcciones se linearizaron con la enzima *ScaI* y se transformaron en la cepa AEIV (WT) de *A. vinelandii*.

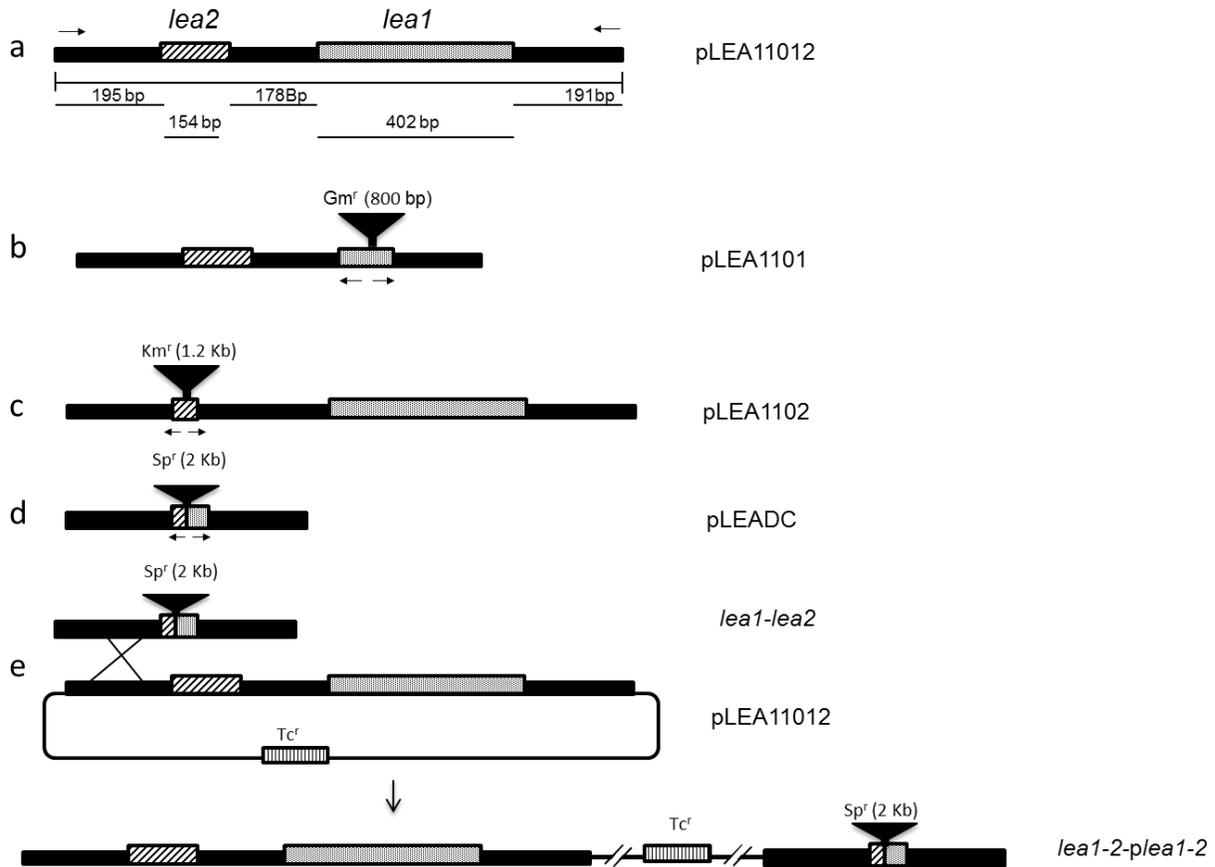


Figura 14. Representación esquemática de los plásmidos para la construcción de las mutantes en los genes *Lea* de *A. vinelandii*. a) Plásmido con la región codificante de los genes *lea1* y *lea2*. Plásmidos para construir las mutantes b) *lea1*, c) *lea2*, d) *lea1-lea2*, e) Integración del plásmido pLEA11012 en el cromosoma de la cepa *lea1-lea2* para construir la cepa complementante.

7.4 El gen *Lea1* es necesario para contrarrestar la desecación en quistes de *A. vinelandii*

Para determinar si la interrupción de los genes *Lea* de *A. vinelandii* tenía un efecto en el proceso de enquistamiento, se construyeron cepas que portaban mutaciones en los genes *Lea1* o *Lea2*, así como un doble mutante *Lea1-Lea2*. Las cepas mutantes y la cepa AEIV se crecieron en placas de medio BB durante 5 días. Se recogieron muestras de estas

células (quistes) y se usaron para la visualización de microscopía óptica, la cepa *gacA* se utilizó como control negativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos por microscopía óptica, observamos que tanto las mutantes en los genes *Lea*, así como la doble mutante fueron capaces de formar quistes y no observamos diferencias fenotípicas de los quistes formados por las mutantes con respecto a la cepa AEIV (Fig. 15).

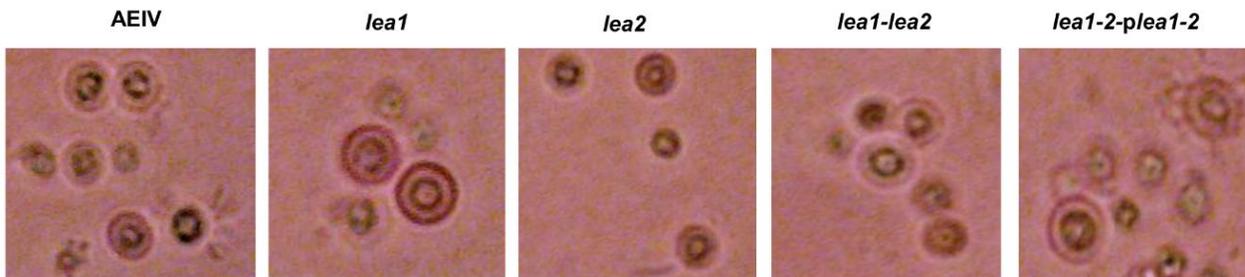


Figura 15. Microscopía óptica de quistes de *A. vinelandii*. AEIV (WT) y mutantes *lea* después de 5 días de incubación en placas de medio BB teñidos con Fast Blue.

Las proteínas LEA están asociadas con la tolerancia a la desecación en organismos procariontas y eucariotas. Los quistes producidos por *A. vinelandii* tienen la característica de ser resistentes a la desecación. Por lo tanto, una vez determinado que los genes *lea* no son necesarios para la formación del quiste, decidimos investigar si la interrupción de estos genes tenía un efecto en la tolerancia de los quistes a la desecación.

De forma similar a los quistes formados por la cepa AEIV, los quistes desarrollados por las tres mutantes en los genes *Lea* mostraron ser resistentes a la desecación después de 5 días; sin embargo, la resistencia de los quistes se vio severamente afectada y disminuyó a los dos meses de tratamiento y se perdió por completo después de tres meses en la cepa mutante *Lea1*.

Por el contrario, los quistes formados por la cepa AEIV y la mutante *Lea2* mostraron resistencia a la desecación incluso después de 6 meses (Tabla 2).

Con los datos obtenidos, podemos concluir que los genes *Lea1* y *Lea2* no son necesarios para el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*, sin embargo, el gen *Lea1* está involucrado en la tolerancia a la desecación del quiste, siendo necesario para que los quistes sean capaces de soportar largos períodos de desecación.

| Cepa | Genotipo | Resistencia a la desecación (%) | | | |
|-----------------------|------------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|
| | | 5 días | 1 mes | 3 meses | 6 meses |
| AEIV | WT | 9.7± 5.3 | 11.2 ± 4.1 | 13.1 ± 8.4 | 17.5 ± 3.2 |
| <i>lea1</i> | Avin1101::Gm | 10.1 ± 3.9 | 4.2 ± 2.2 | 1.5 ± 1.3 | <0.0001 |
| <i>lea2</i> | Avin1102::Km | 15.6 ± 3.5 | 10.3 ± 3.1 | 9.5 ± 6.1 | 18.3 ± 2.6 |
| <i>lea1-lea2</i> | Avin1101/1102::Sp | 7.4 ± 4.6 | 3.5 ± 2.3 | 2.5 ± 1.3 | <0.0001 |
| <i>lea1-2-plea1-2</i> | Avin1101/1102::Sp+pUMA | 11.5 ± 3.8 | 17.1 ± 6.5 | 21.4 ± 3.2 | 15.4 ± 4.1 |
| AEIV- <i>gacA</i> | <i>gacA</i> ::Gm | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |

Tabla 2. Porcentaje de quistes resistentes a la desecación después de 5 (a), 30 (b), 90 (c) 180 (d) días de tratamiento.

7.4 El gen *Lea1* se expresa mayoritariamente en los quistes de *A. vinelandii*

De los resultados anteriores concluimos que *Lea1* pero no *Lea2* contribuye a la resistencia del quiste a la desecación. Para determinar bajo qué condiciones se expresan los genes *Lea1* y *Lea2*, se construyeron fusiones transcripcionales, y se determinó la actividad de β -glucuronidasa en células vegetativas y quistes.

Primeramente, observamos que hay una expresión diferencial entre ambos genes, expresándose 2.5 veces más el gen *Lea1* sobre el gen *Lea2* para las dos condiciones probadas. La expresión de la fusión *lea1-gusA* en quistes fue el doble que la expresión de la misma fusión para las células vegetativas (Fig.16a). Interesantemente, la expresión de *lea1-gusA* aumentó de manera gradual durante los 5 días del proceso de enquistamiento mientras que para la fusión *lea2-gusA* la expresión se mantuvo constante a lo largo del proceso (Fig. 16b).

Esto nos indica que los genes que codifican para proteínas LEA en *A. vinelandii*, se expresan diferencialmente dependiendo del estado en el que se encuentra la célula y que el gen *Lea1* se expresa mayoritariamente en condiciones de enquistamiento, mientras que el gen *Lea2* parece expresarse de manera basal y constitutiva. La expresión del gen *Lea1* bajo condiciones de estrés, en este caso, enquistamiento, concuerda con el hecho de que en plantas, las proteínas LEA se expresan y acumulan de forma abundante en las semillas justamente antes del proceso de germinación cuando la semilla está en un estado deshidratado.

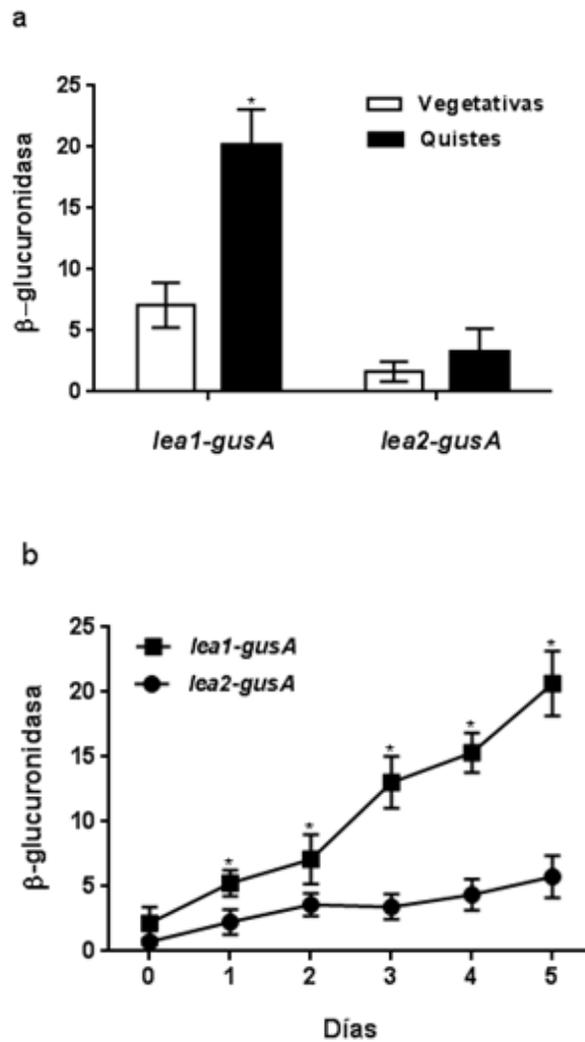


Figura 16. Actividad β - Glucuronidasa de cepas *lea1-gusA* y *lea2-gusA* durante el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*. a) Expresión de *lea1* y *lea2* en medio BS y BB; b) Expresión de *lea1* y *lea2* durante 5 días en medio BB. Las desviaciones estándar están basadas en tres experimentos independientes. (*) Indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.5 El gen *Lea1* es necesario para tolerar el estrés osmótico en *A. vinelandii*.

Varios reportes indican que la sobreexpresión de los genes *Lea* en diferentes organismos ocasiona un aumento en la tolerancia a distintas condiciones de estrés osmótico. Para determinar el efecto de la mutación de los genes *lea* en el crecimiento y supervivencia de *A. vinelandii* bajo condiciones de estrés, se crecieron cultivos de las diferentes mutantes a diferentes concentraciones de NaCl y sorbitol y se realizaron cuentas viables después de 48 h.

La mutante *Lea1* fue significativamente más sensible que la cepa AEIV y la mutante *Lea2* al estrés osmótico cuando se creció a una concentración de 0.15 M de NaCl (Fig. 17a). Cuando la concentración de NaCl en el medio se aumentó a 0.3 M, la mutante *Lea1* fue incapaz de sobrevivir, mientras que la mutante *Lea2* mostró una tolerancia similar a la de la cepa AEIV.

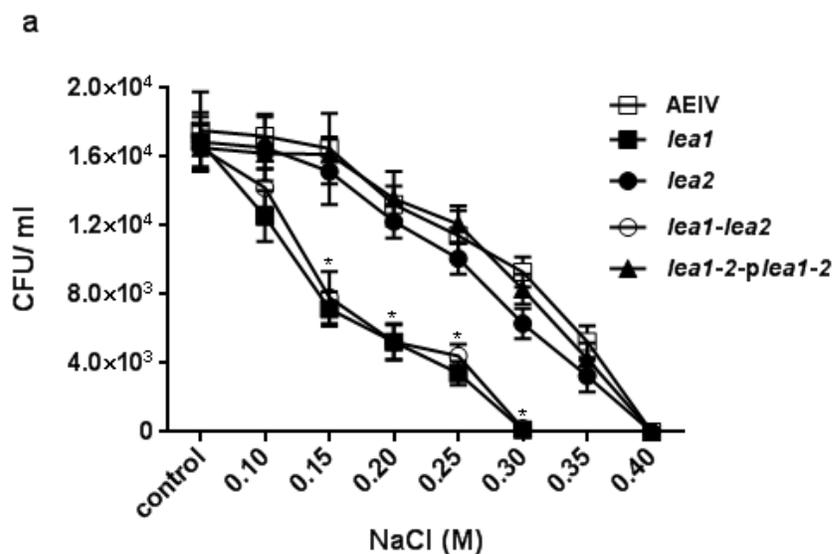


Figura 17. Tolerancia al estrés osmótico de los mutantes *Lea1* y *Lea2* de *A. vinelandii*. Crecimiento de mutantes de *A. vinelandii* a 24 h en medio líquido BS en presencia de NaCl, Las barras de error representan desviaciones estándar de tres experimentos independientes. (*) Indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Se obtuvieron resultados similares cuando se agregó una concentración de sorbitol osmóticamente equivalente al medio de crecimiento (1 M). Nuevamente, la mutante *Lea1* fue la más afectada al crecimiento en este medio cuando el medio fue suplementado con 0.4 M de sorbitol (Fig. 17b).

Estos resultados indican que el gen *Lea1* es necesario para la supervivencia de *A. vinelandii* en altas concentraciones de agentes osmóticos tales como NaCl y sorbitol.

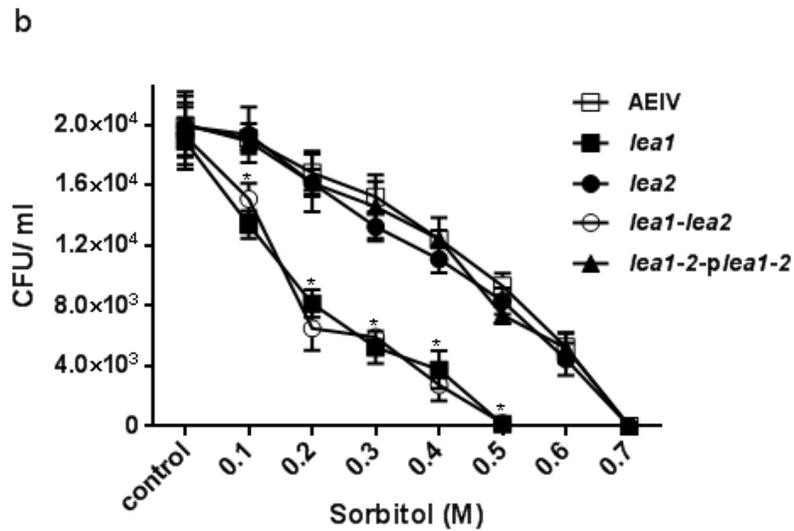


Figura 17. Tolerancia al estrés osmótico de los mutantes *Lea1* y *Lea2* de *A. vinelandii*. Crecimiento de mutantes de *A. vinelandii* a 24 h en medio líquido BS en presencia de Sorbitol. Las barras de error representan desviaciones estándar de tres experimentos independientes. (*) Indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

7.6 El gen *Lea1* es necesario para la tolerancia a altas temperaturas en *A. vinelandii*

Al observar que la interrupción del gen *Lea1* ocasionaba una disminución en la tolerancia al estrés osmótico, nuestro siguiente objetivo fue determinar si las mutantes eran también más sensibles otros tipos de estrés. Para investigar la contribución de los genes *Lea1* y *Lea2* en la tolerancia a altas temperaturas en *A. vinelandii*, se evaluó la supervivencia de células vegetativas y quistes de las mutantes *Lea1* y *Lea2*.

Para el ensayo de tolerancia a la temperatura, se utilizaron células vegetativas (Fig. 18a) y quistes (Fig. 18b) que fueron expuestos a temperaturas en un rango de 40 a 60 °C durante 15 min, tiempo después del cual se hicieron diluciones y se determinaron cuentas viables.

Para el caso de las células vegetativas, la mutante *Lea2* se comportó de manera similar a la cepa AEIV, ya que no se obtuvieron colonias después de 15 min de exposición a 50°C. Para la mutante *Lea1*, la exposición a 45°C fue letal (Fig. 18a).

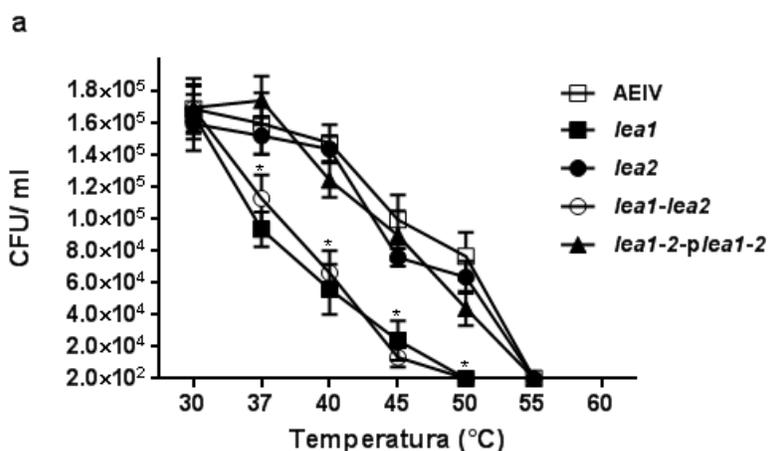


Figura 18. Ensayos de termo tolerancia en células vegetativas de las mutantes *Lea1* y *Lea2* de *A. vinelandii* crecidas en medio BS. Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. (*) Indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Bajo condiciones de enquistamiento, cuando las células fueron sometidas a temperaturas de 60°C, los quistes de la cepa AEIV fueron capaces de germinar, los quistes de la mutante *Lea2* redujeron su viabilidad germinando a 55°C, pero únicamente los quistes de la mutante *Lea1* fueron incapaces de germinar después de haber sido sujetos a 50°C (Fig. 18b).

Estos datos indican, que como se esperaba, sí existe una mayor tolerancia de los quistes sobre las células vegetativas cuando son expuesta a altas temperaturas y por otro lado, que el gen *Lea1* está involucrado en la tolerancia de *A. vinelandii* a esas mismas condiciones.

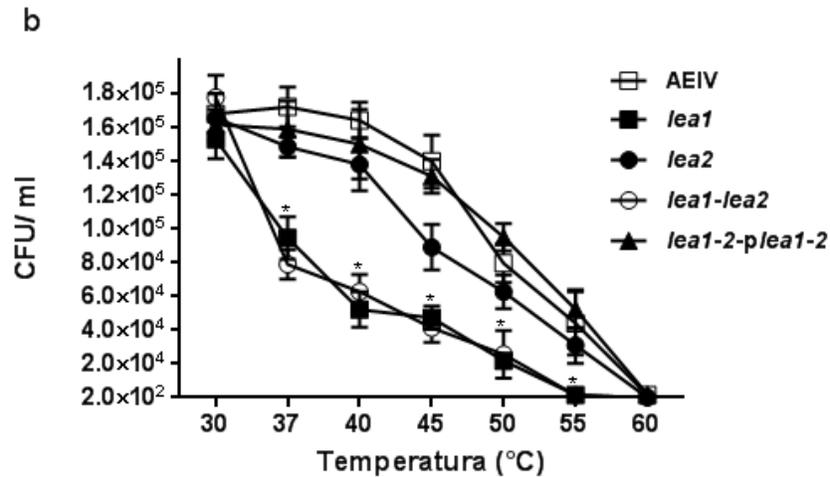


Figura 18. Ensayos de termo tolerancia quistes desarrollados por las mutantes *Lea1* y *Lea2* de *A. vinelandii* crecidos en BB. Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. (*) Indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.7. avLEA1 tiene un efecto protector sobre la actividad de la LDH bajo ciclos de congelamiento descongelamiento “in vitro”

Se sabe que la actividad enzimática de la LDH es sensible a la limitación del agua en los ciclos de congelamiento-descongelamiento (Goyal *et al.*, 2005). También se ha demostrado que algunas G1LEA protegen la actividad enzimática de la LDH (Campos *et al.*, 2013). Una vez expresada y purificada la proteína avLEA1, se evaluó su efecto protector sobre la actividad enzimática de LDH “in vitro” después de ciclos de 2, 6 y 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

La actividad de la LDH se monitoreó en presencia o ausencia de la proteína avLEA1. En presencia de la proteína avLEA1, la actividad LDH permaneció en el 52% después de 2 ciclos y 21% después de 6 ciclos, mientras que en su ausencia, la actividad correspondió a

20% y 10% respectivamente (Fig. 19). En presencia de BSA, (enzima con propiedades crioprotectoras), la actividad de la enzima se mantuvo en un 100%.

Este resultado indica que, al igual que otras proteínas LEA, *avLEA1* tiene un efecto protector sobre la actividad de la LDH.

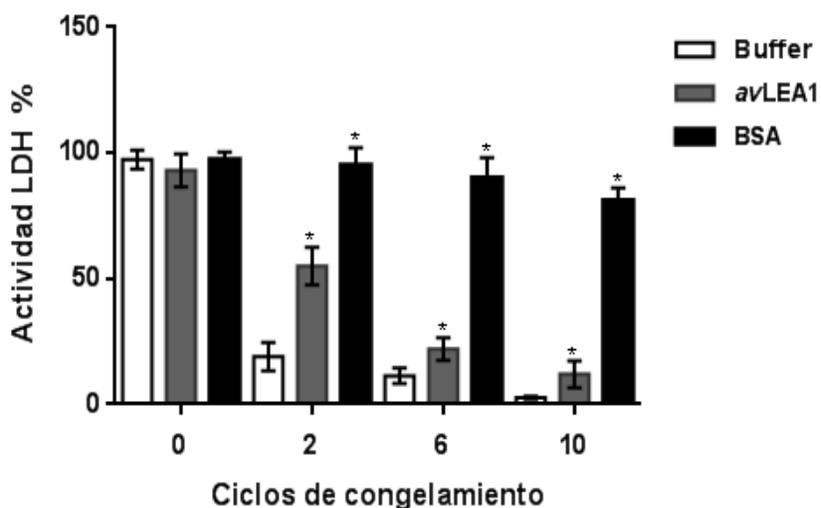


Figura 19. Protección de la actividad de la LDH después de 2, 6 y 10 ciclos de congelamiento y descongelamiento, con *avLEA1*, BSA, control. Los datos se expresaron como porcentaje (%) de actividad medido después del estrés en presencia de la proteína correspondiente. Las desviaciones estándar se basaron en tres experimentos independientes. * Indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.8 *avLEA1* ayuda a tolerar estrés osmótico por NaCl en *E. coli*.

Como se muestra anteriormente, la proteína *avLEA1* es necesaria para soportar el estrés osmótico causado por 0.3 M de NaCl en *A. vinelandii*. Para determinar si la expresión heteróloga de la proteína *avLEA1* confiere resistencia a estrés osmótico por NaCl “*in vivo*” en células de *E. coli*, se sembraron diluciones de cultivos de las cepas BL(DE3)/p*avLEA1* (cepa expresando la proteína *avLEA1*) y BL(DE3)/pET22b+ (control positivo) en placas con NaCl (de 0.2 a 0.6 M). Se indujo la expresión de la proteína con IPTG y se determinó la supervivencia.

Primeramente, observamos que en ningún caso, la expresión de la proteína *avLEA1* representó una ventaja ante el crecimiento en las diferentes concentraciones de agentes

osmóticos. Ambas cepas presentaron el mismo patrón (Fig. 20 a-b). Sin embargo, bajo condiciones osmóticas, la supervivencia de la cepa BL(DE3)/pavLEA1, fue de 91% y 60% a una concentración de 0.3M y 0.4M respectivamente, mientras que para la cepa control BL(DE3)/pET22b+ fue de 70% y 30% (Fig. 20 a-b). Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de la proteína avLEA1 también aumenta la tolerancia de *E. coli* a condiciones de alta salinidad.

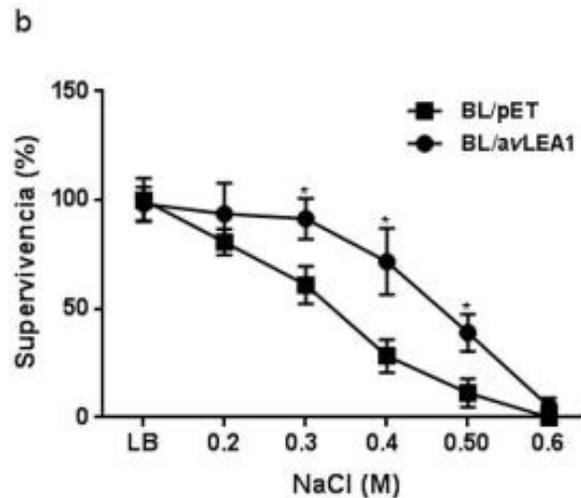
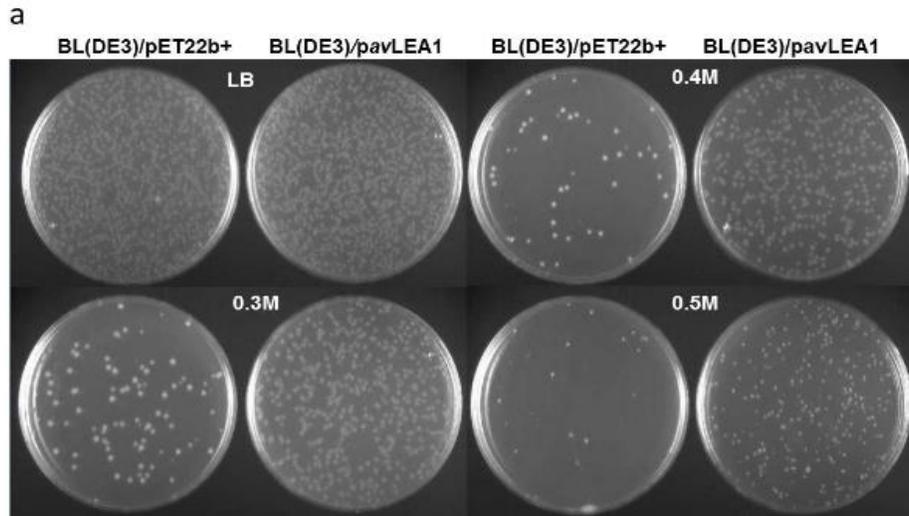


Figura 20. Efecto de la expresión de la proteína avLEA1 en la viabilidad de *E. coli* bajo estrés osmótico por NaCl. a) Crecimiento de cepas de *E. coli* BL21 (DE3)/pavLEA1 y BL21(DE3) /pET22b+ en placas de LB sin y con diferentes concentraciones de NaCl (0.2- 0.6 M). b) Supervivencia (%) de *E. coli* BL21(DE3)/pavLEA1 y BL21(DE3)/pET22b+. Las desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes. * Indica una diferencia significativa (p < 0.05).

DISCUSIÓN

Las proteínas LEA son altamente hidrofílicas e intrínsecamente no estructuradas y se ha reportado que reducen la agregación de proteínas causada por desecación y congelación “*in vitro*”. Estas proteínas se identificaron por primera vez en las plantas (Dure, 1993), pero homólogos de estas proteínas están presentes en otros eucariotas, procariotas y arqueas (Hand *et al.*, 2011, Campos *et al.*, 2013). Las proteínas GLEA se caracterizan por contener en su secuencia un motivo de 20 aminoácidos (20-mero) el cual posee un sub-motivo que difiere entre procariotas y eucariotas. Existen extensos datos que vinculan la expresión de las proteínas LEA con la tolerancia al estrés hídrico causado por la desecación, la salinidad o las bajas temperaturas en las plantas (Tunnacliffe y Wise, 2007; Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha descrito una relación entre los homólogos de LEA y el déficit hídrico en organismos eucariotas distintos de las plantas y en algunos procariotas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000, Browne *et al.*, 2002, Gal *et al.*, 2004; Stacy y Aalen, 1998, Battista *et al.*, 2001, Denekamp *et al.*, 2010, Hand *et al.*, 2011).

Un quiste es una etapa de reposo o de latencia de un microorganismo, generalmente una bacteria, un protista o un invertebrado, que ayuda al organismo a sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables. Los quistes permiten que estos organismos permanezcan en un estado de latencia por largos períodos. En *A. franciscana*, un crustáceo que produce quistes que sobreviven a la desecación ya temperaturas inferiores a -20 ° C (Crowe *et al.*, 1981, Hengherr *et al.*, 2011), se ha demostrado que proteínas G1LEA contribuyen a la desecación y a la tolerancia al congelamiento de quistes postdiapausicos (Toxopeus *et al.*, 2014). También desempeñan un papel importante en la respuesta al estrés salino, ya que los genes LEA analizados se encuentran altamente expresados en esta condición en el desarrollo embrionario (Wu *et al.*, 2011).

A. vinelandii, la bacteria del suelo estudiada aquí, produce quistes resistentes a la desecación, capaces de sobrevivir al almacenamiento en suelos secos durante más de 10 años (Vela, 1974). Esta bacteria también posee 4 genes que codifican proteínas con identidad de proteínas G1LEA, dos de ellas, *lea1* y *lea2* codifican para las proteínas *avLEA1* y *avLEA2*, que poseen secuencias de 20-meros con el sub-motivo presente en proteínas LEA de organismos eucariotas. En este estudio, se construyeron mutantes en ambos genes para investigar su papel en la tolerancia de quistes a la desecación.

Se encontró que la proteína avLEA1 contribuye a la tolerancia de los quistes a la desecación ya que la viabilidad de los quistes desarrollados por el mutante en el gen *Lea1* se perdió completamente después de seis meses de tratamiento de desecación, mientras que los quistes desarrollados por la cepa AEIV y la mutante en el gen *Lea2* permanecieron viables. Al igual que en los quistes de *A. vinelandii*, se observó en *D. radiodurans*, que la inactivación de dos genes que codifican para proteínas LEA, causó una pérdida de viabilidad del 75% después de un período de 2 semanas de desecación (Battista *et al.*, 2001). De manera similar, cuando la expresión de genes LEA es silenciada por RNA's de interferencia en *C. elegans*, hay una disminución en la supervivencia durante la inducción de la desecación, osmótica y el estrés térmico (Gal *et al.*, 2004).

Los niveles de expresión del gen *Lea1* durante el proceso de enquistamiento fueron mayores que los detectados en las células vegetativas; además, el gen *Lea2* tuvo expresión basal y constitutiva. Al igual que lo observado en *A. vinelandii*, se ha reportado una expresión diferencial de los transcritos de genes *Lea* durante el desarrollo y la formación de quistes de *A. franciscana* (Denekamp *et al.*, 2010). Por otro lado, en los genes *Lea* de *C. elegans* se induce la transcripción durante la deshidratación en la etapa juvenil resistente al estrés (Gal *et al.*, 2004).

Este estudio también mostró que avLEA1 pero no avLEA2 confería resistencia en *A. vinelandii* a condiciones osmóticas y de alta temperatura, lo que sugiere que la diferencia en el número de 20-meros, y / o el tamaño en estas dos proteínas LEA puede causar una diferencia significativa en su actividad protectora de estructuras subcelulares y membranas. Sin embargo, no hay informes que correlacionen el número de 20 meros presentes en una proteína y sus efectos protectores.

La cepa de *A. vinelandii*, AEIV fue aislada de suelos fríos de Wisconsin, EE.UU. Un BLAST utilizando el 20-mero de la proteína avLEA1 o avLEA2 reveló la presencia (además de *Azotobacter croccocum* y *A. vinelandii*) de genes que codifican para posibles proteínas LEA que tiene el sub-motivo eucariótico en otras dos especies de bacterias, *Methylocystis parvus* y *Anaeromyxobacter sp.* (Fig. 1). Curiosamente, *M. parvus* pertenece a los taxones de *Methylocystaceae*, asociados con suelos fríos (Wunderlin *et al.*, 2016), y se ha informado que tanto *M. parvus* como *Anaeromyxobacter* son capaces de formar quistes.

En general, la desnaturalización y la disfunción de las enzimas o proteínas diferentes ocurre cuando las células se someten a estrés o deshidratación a baja o alta temperatura (Goyal *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2008). Las proteínas LEA han sido propuestas para actuar como "escudos moleculares" (Goyal *et al.*, 2005), evitando la agregación de proteínas a partir de interacciones irreversibles, funciones protectoras o actividad enzimática. En el presente trabajo, se demostró que la proteína avLEA1 protege la actividad de la LDH "in vitro" contra la inactivación inducida por ciclos de congelamiento-descongelamiento; después de 2 y 10 ciclos, la actividad de LDH permaneció dos veces mayor que cuando la proteína avLEA1 purificada estuvo presente. En *Chlorella vulgaris*, se encontró que las proteínas LEA protegen a una enzima contra la inactivación por congelación (Honjoh *et al.*, 2000). Por lo tanto, proponemos que la proteína avLEA1 desempeñar un papel importante en la protección de otras proteínas y enzimas de *A. vinelandii* en condiciones de alta temperatura.

Finalmente, se ha investigado extensamente la expresión funcional de las proteínas LEA "in vivo" en *E. coli* bajo estrés abiótico. Un gen de una proteína LEA4 de *Brassica napus* fue sobreexpresado en *E. coli* y demostró conferir tolerancia a sal y temperaturas extremas en esta bacteria (Dalal *et al.*, 2009). Recientemente, la expresión heteróloga de una proteína LEA hidrofóbica atípica de *Oriza sativa* L. en *E. coli* mejoró la resistencia contra diversos estrés abióticos: alta salinidad, osmótica, congelación, calor y radiación UV (He *et al.*, 2012). En este estudio, se demostró también que la sobreexpresión de la proteína avLEA1 mejoró la tolerancia de *E. coli* a estrés osmótico ocasionado por NaCl.

En conclusión, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que la proteína avLEA1 es un determinante clave en la tolerancia de *A. vinelandii* hacia el estrés abiótico como la desecación, la osmolaridad y altas temperaturas, ya que la supervivencia de un mutante *Lea1* se vio afectada cuando el organismo fue expuesto a condiciones de estrés, además esta proteína, tiene una estructura típica de una LEA y se comporta de manera similar a las proteínas G1LEA previamente descritas.

CONCLUSIONES

- Las proteínas LEA no son esenciales para el enquistamiento en *A. vinelandii*.
- No hay diferencias morfológicas entre los quistes formados por las cepas mutantes.
- El gen *Lea1* es necesario para la viabilidad de los quistes a tiempos prolongados de desecación.
- El gen *Lea1* se expresa mayoritariamente en quistes y de forma gradual durante todo el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*.
- El gen *Lea1* está involucrado en la tolerancia al estrés osmótico causado por NaCl y altas temperaturas.
- *avLEA1* confiere protección a estrés osmótico en *E. coli*.
- *avLEA1* tiene efecto protector sobre la LDH en ciclos de congelamiento.

ANEXO A: MATERIAL Y MÉTODOS

MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS UTILIZADAS

Medio Luria-Bertani (LB)

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------------|----------|
| Peptona de caseína | 10g. |
| Extracto de levadura | 5 g. |
| Cloruro de sodio | 10 g. |
| Agua destilada c.b.p. | 1 L. |

Si se quiere preparar medio sólido agregar 15 g. de Agar Bacteriológico por litro de medio

Medio Burk-Sacarosa (BS)

| Reactivo | Cantidad |
|--|----------|
| MgCl ₂ a 160 g/L | 1 mL |
| NaMoO ₄ a 0.2 g/L | 1mL |
| FeSO ₄ a 5 g/L | 1 mL |
| CaCl ₂ a 7.3 g/L | 10 mL |
| Na ₂ SO ₄ a 18.3 g/L | 10 mL |
| Sacarosa al 20% | 100 mL |
| Buffer de fosfatos a pH 7 | 100 mL |
| Agua destilada c.b.p. | 1 L |

Al prepararse este medio se debe esterilizar por separado el agua y cada una de las sales, éstas deben estar a temperatura ambiente antes de mezclarlas, de otra manera, si se agregan las sales en agua caliente éstas se precipitarán.

Para preparar medio de competencia (CM) sólo se debe evitar agregar las sales de FeSO₄ y NaMoO₄.

Para preparar medio para enquistamiento Burk-Butanol (BOH) se sustituye la sacarosa por Butanol al 0.2% esterilizado por filtración.

Buffer de fosfatos a pH7

| | Para 200 mL | Para 300 mL | Para 600 mL |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Reactivo | Cantidad | Cantidad | Cantidad |
| K ₂ HPO ₄ | 1.6 g. | 2.4 g. | 4.8 g. |
| KH ₂ PO ₄ | 0.4 g. | 0.6 g. | 1.2 g. |

| Cepa | Antibiótico | Concentración |
|------|-------------|---------------|
|------|-------------|---------------|

| | | |
|------------------------------|-----------|------------------|
| <i>A. vinelandii</i> AEIV | 30 µg/ml | Ácido nalidíxico |
| | 2 µg/ml | Kanamicina |
| | 0.2 µg/ml | Gentamicina |
| | 100 µg/ml | Espectinomocina |
| | 30 µg/ml | Tetraciclina |
| <i>E. coli</i> | | |
| <i>DH5a</i> | 100 µg/ml | Ampicilina |
| BL21(DE3) | 100 µg/ml | Ampicilina |

ANEXO B: MÉTODOS DE TRABAJO

1.- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *E. coli*

1. Se inoculan 5 ml del medio adecuado con antibiótico de selección, incubar 18 h a 37°C a 200 rpm.
2. Se vierte el cultivo en tubos Eppendorf, se centrifuga y se desecha el sobrenadante hasta que el total del volumen del tubo sea transferido y centrifugado.
3. Lavar la pastilla con 1 mL de MgSO₄ 10 mM (resuspender), centrifugar y eliminar sobrenadante.
4. Resuspender la pastilla en 150 µl de solución I fría, dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 350 µl de solución II recién preparada. Mezclar suavemente por agitación invertida de 20 a 25 veces, dejar reposar en hielo 5 minutos.
6. Agregar 250 µl de solución III, agitar por inversión durante 10 segundos, dejar reposando en hielo por 20 minutos.
7. Centrifugar durante 10 minutos, recuperar el sobrenadante y transferirlo a un tubo Eppendorf nuevo.
8. Agregar 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), agitar en vórtex y centrifugar por 3 minutos a 12 000 rpm.

9. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo, agregar 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), agitar en vórtex y centrifugar 3 minutos a 12 000 rpm.
10. Recuperar nuevamente el sobrenadante y transferir a otro tubo, añadir 1 ml de etanol absoluto y centrifugar 10 minutos a 12 000 rpm.
11. Decantar el etanol y lavar la pastilla con etanol al 70 % 3 veces.
12. Dejar secar la pastilla y resuspender en solución RNAsa (10 mg/ml) incubar 1 h a 37°C

2.- EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE *A. vinelandii*.

1. Se inoculan 25 ml de medio adecuado con antibiótico de selección, incubar 48 h a 30°C a 200 rpm.
2. Centrifugar el cultivo celular hasta obtener una pastilla que no sobrepase los 100 μ l.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 300 μ l de Buffer TE (Tris-EDTA) 50:20 y transferirlo a un tubo Eppendorf.
4. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 450 μ l de TE 50:20.
5. Agregar 50 μ l de lisozima (10 mg/ml), mezclar e incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Agregar 50 μ l de proteasa (10 mg/ml), mezclar e incubar a 37°C por 30 minutos.
7. Agregar 50 μ l de SDS al 10 %, mezclar e incubar a 37°C por 15 minutos o hasta observar una solución viscosa.
8. Agregar 100 μ l de NaCl 5 M, mezclar e incubar a 65°C por 10 minutos.
9. Agregar 80 μ l de CTAB 10% / NaCl 0.7 M (esta solución se debe incubar previamente a 65°C por 5 minutos para facilitar su manejo).

10. Mezclar e incubar a 65°C por 20 minutos, agregar 500 µl de Cloroformo-Alcohol-Isoamílico 24:1, resuspender por vórtex y centrifugar a 12 000 rpm por 5 minutos.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo Eppendorf procurando no llevar restos de proteína.

3.- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE *A. vinelandii*.

1. Inocular 25 ml de medio adecuado con antibiótico de selección, incubar 48 h a 30°C a 200 rpm.
2. Centrifugar el cultivo celular hasta obtener una pastilla que no sobrepase los 50 ml.
3. Eliminar el alginato de las células con MgSO₄ 10 mM
4. Resuspender la pastilla en 20 µl de H₂O-DEPC 0.05% y agregar 3 µl de H₂O-DEPC 0.1%.
5. Agregar 200 µl de acetona helada, mezclar y centrifugar a 12 000 rpm durante 2 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante, resuspender la pastilla en 30 µl de H₂O-DEPC 0.05% y agregar 10 µl de proteinasa (10 mg/ml); incubar en hielo por 10 minutos.
7. Agregar 3.5 µl de H₂O-DEPC 0.05%, 200 µl de fenol (precalentado a 70°C), 150 µl de cloroformo y 120 µl de H₂O-DEPC al 0.1%; mezclar y centrifugar a 12 000 rpm por 5 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos, agregar 1 ml de etanol al 100%.
9. Precipitar el RNA incubando 1 h a -20°C, centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos.

10. Desechar el sobrenadante y secar la pastilla.
11. Resuspender la pastilla en H₂O-DEPC 0.05%

4.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

1. Poner un precultivo de 20 ml en medio LB a 37°C en agitación.
2. Inocular 100 ml de medio LB en un matraz de 250 ml con 1 ml del precultivo anterior
3. Incubar por aproximadamente 3hr a 37°C hasta que la D.O a 650_{nm} sea de 0.4 – 0.5.
4. Transferir el cultivo a tubos de 50 ml y dejar enfriar por 10 min.
5. Recuperar las células por centrifugación, 4000 rpm /10 min.
6. Resuspender el cultivo en 30 ml CaCl₂ 0.1 M frío y dejar reposar en hielo 15 minutos.
7. Centrifugar a 4000 rpm 10 min a 4°C.
8. Resuspender la pastilla en 2 ml de una solución fría de CaCl₂ 0.1M, 14% de
9. Glicerol, por cada 50ml de cultivo original.
10. Alicuotar 0.4 ml/ tubo eppendorf de 1000µL. Almacenar a -70 oC.
11. Plaquear 100 µl de cultivo en placas de agar LB adicionando el antibiótico adecuado e incubar a 37°C por 24 h.

5.- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* (CaCl₂)

1. Mezclar 0.1 µL de DNA (10-100 ng) con 0.2 ml de células competentes.
2. Dejar 30 min en hielo.

3. Dar un shock de calor de 2 min a 42 oC.
4. Agregar 1 ml de medio LB (sin antibiótico). Incubar 1hr / 37° C con agitación.
5. Platear un volumen adecuado de esta suspensión celular en el medio de selección.

6.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *A. vinelandii*.

1. La preparación de células competentes de *A. vinelandii* consiste en hacer cultivos y pases de células en medio CM:
2. Se inocula la cepa en placa de medio CM, se incuba a 30°C durante 48 h, terminada la incubación se toma un inóculo de esa placa y se siembra nuevamente en placa de medio CM que es incubada nuevamente por otras 48 h
3. Recoger todo el crecimiento celular con una espátula estéril y lavar las células recuperadas con MgSO₄ 10 mM para eliminar todo el alginato.
4. Sembrar las células en matraces con medio líquido CM e incubarlas a 30°C por 48 h a 200 rpm.

7.- TRANSFORMACIÓN DE *A. vinelandii* CON DNA DE PLÁSMIDO O DNA CROMOSOMAL.

1. Utilizar 100 µl de células competentes y agregar 5 µg de DNA de plásmido linearizado (si el plásmido es super-enrollado utilizar 10µg) o 5µg de DNA cromosomal. Realizar esto en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Colocar la mezcla sobre medio CM sólido, extender la solución células – DNA con la punta azul de la micropipeta en una superficie aproximada de 2 cm². Incubar 30°C / 24 h.
3. Recolectar el tapete con 1ml de BS o MgSO₄ 10mM.
4. Hacer diluciones si es necesario y platear en el medio de selección (por lo general no es necesario hacer diluciones pues la frecuencia no es alta).
5. Incubar a 30 oC / 2-4 días.

8.- EXTRACCION DE DNA DE PLÁSMIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DEL PERCLORATO

1. Centrifugar 1.5 ml de cultivo.
2. Resuspender en 175 μ l de TES (15% Sacarosa, 50mM TRIS pH 8.5, 50mM EDTA pH 8.0)
3. Añadir 25 μ l lisozima (10mg/ ml)
4. Incubar 20 minutos en hielo.
5. Añadir 400 μ l de agua helada.
6. Incubar 15 minutos a 73° C.
7. Centrifugar 15 min.
8. Descartar el pellet con un palillo o transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
9. Añadir 60 μ l de NaClO₄ 5M.
10. Añadir 600 μ l de isopropanol, mezclar.
11. Centrifugar 15 min.
12. Lavar pellet con etanol al 70%.
13. Secar y resuspender en 50 μ l de RNasa 20 μ g/ml

9.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE ACRILAMIDA

BUFFER DE CORRIDA

| Reactivo | Cantidad |
|-----------|--------------|
| Tris base | 3 gr |
| Glicina | 14.4 gr |
| SDS 10% | 1 gr |
| H2O | Aforar a 1 L |

SOLUCIÓN PARA TEÑIR EL GEL

| Reactivo | Volumen |
|------------------------|-----------|
| Azul de Coomasie R-250 | 0.25 g |
| Metanol-agua | 1:1 90 ml |
| Ácido acético | 10 ml |

Filtrar en Whatman no. 1

SOLUCIÓN PARA DESTEÑIR EL GEL

| Reactivo | Volumen |
|---------------|---------|
| Metanol | 50 ml |
| Ácido acético | 50 ml |
| H2O | 400 ml |

ACRILAMIDA AL 30%

| |
|--------------------------|
| 29 g de acrilamida |
| 1 g de Bis acrilamida |
| Aforar a 100 ml con agua |

10.- TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A MEMBRANAS Y DETECCION CON ANTICUERPO ANTI – HIS6 –PEROXIDASA

1. Correr la electroforesis en gel de poliacrilamida. Usar marcador de peso molecular preteñido.
2. Utilizando guantes, cortar 6 piezas de papel Whatman 3MM y una pieza de membrana de nitrocelulosa del tamaño exacto del gel. Calcular el área del gel para determinar la intensidad de la corriente de transferencia. Marcar una esquina de la membrana con un lápiz suave.
3. Colocar el filtro de nitrocelulosa en la superficie de una caja de Petri con agua desionizada y permitir que se humedezca desde abajo por capilaridad. Sumergir la membrana en el agua por al menos 5min.
1. 4.- Sumergir las seis piezas de papel Whatman 3MM en una caja Petri con un pequeño volumen de buffer de transferencia semiseca. Limpiar bien los dos electrodos y secar la superficie.
5. Colocar tres de las piezas de papel 3MM sobre el electrodo inferior (ánodo en este caso). Rodar un tubo de ensayo sobre el papel haciendo una ligera presión para eliminar cualquier burbuja de aire entre el papel y el electrodo.
6. Colocar la membrana de nitrocelulosa hidratada sobre el papel 3MM. Rodar el tubo de ensayo sobre la membrana.
7. Colocar el gel de poliacrilamida brevemente (unos segundos) en una caja de Petri con agua desionizada. Recortarle una pequeña esquina que coincida con la marcada en la membrana de nitrocelulosa.
8. Colocar el gel de poliacrilamida sobre la membrana evitando la formación de burbujas de aire. Rodar sobre el gel el tubo de ensayo si es necesario.
9. Colocar las restantes tres piezas de papel 3MM sobre el gel, evitando la formación de burbujas de aire. Rodar sobre el sándwich el tubo de ensayo si es necesario.
10. Eliminar cualquier exceso del buffer de transferencia. Las piezas de papel sólo deben quedar húmedas.

11. Colocar el electrodo superior (cátodo en éste caso).
12. Conectar los electrodos, el de abajo al rojo (+) y el de arriba al negro (-).
13. Transferir por una hora a una intensidad de corriente constante de 1mA/ cm² de gel. La lectura del voltaje deberá ser cercana a 10V.
14. Desconectar el equipo y retire el electrodo superior.
15. Retirar el gel y ponerlo a teñir con Coomassie para comprobar que la transferencia fue completa.
16. Cortar la esquina de la membrana que estaba marcada con lápiz.
17. Colocar la membrana en una caja Petri. Si la membrana tiene lados menos de 6 cm se pueda usar una caja Petri pequeña, de lo contrario utilizar una caja grande. Para la caja chica se utilizarán volúmenes de 8ml de todas las soluciones, para la grande utilizar 20ml.
18. Añadir la solución de bloqueo. Incubar 1hr a T.A con agitación suave.
19. Descartar la solución de bloqueo. Añadir el anticuerpo anti – His diluido 1:10000 en una solución de bloqueo. Incubar 1 – 1-5 hr a T-.A.
20. Lavar 3 veces con TBST por 5min.
21. Añadir la solución de revelado. Incubar a T.A. con agitación suave hasta que las bandas estén suficientemente oscuras (5 min aprox.). Evitar sobreexponer para no tener un fondo alto.
22. Eliminar la solución de revelado y lavar con TBST para detener la reacción.

SOLUCIONES

BUFFER DE TRANSFERENCIA

| | |
|----------------|--------|
| Tris Base 48mM | 5.8g |
| Glicina 39mM | 2.9g |
| SDS 0. 0 37% | 0. 37g |
| Metanol 20% | 200ml |
| Agua destilada | 1 L |

Guardar a 4° C

TBS1X

| | |
|------------------|-----------------|
| Tris Base 50mM | 0.05g |
| NaCl 150mM | 8.76g |
| Agua Destilada | 800ml |
| Ajustar pH a 7.5 | 1M HCl (~9.5ml) |
| Agua Destilada | 1L |

Guardar a 4°C

TBST 1X

Resuspender 1µl de Tween 20 por cada mililitro de TBS 1X (0.1 % Tween – 20 v/v)

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

1% BSA o 2 % leche descremada (w/v) rn TBST 1X. Preparar fresco.

SOLUCIÓN REVELADO

Por cada 10mL, disolver 6 mg de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) en 9ml de TBS 1X y añadir 1ml de NiCl₂o CoCl₂ al 0.3 % (w/v Preparar fresco.

11. CUANTIFICACION DE PROTEINAPOR EL METODO DE LOWRY

1. Tomar 1ml de cultivo problema y centrifugarlo hasta obtener un paquete celular.
2. Lavar las células con MgSO₄ 10mM o con NaCl 0.85%. Resuspender las células en 1 ml o en un volumen adecuado.
3. Tomar 200µl (éste volumen varía de acuerdo a la concentración de proteína en la muestra) y llevarlo a 200µl con H₂O.
4. Añadir 1ml de la Solución Reactiva. Repose 10min.
5. Añadir 0.1 ml de reactivo de Folin diluído con 1 vol. de H₂O.
6. Repose 30min.
7. Leer absorbancia a 625nm.
8. Correr al mismo tiempo una curva de calibración usando Albúmina Sigma.

Solución Stock 2mg /ml.

| Tubo No. | µl Stock | µl de H ₂ O | Conc. Albúmina µg / ml |
|----------|----------|------------------------|------------------------|
| 1 | 25 | 975 | 50 |
| 2 | 50 | 950 | 100 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 3 | 100 | 900 | 200 |
| 4 | 200 | 800 | 400 |

Tratar igual que al problema.

Soluciones:

Solución A: Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: Tartrato de Na y K 2 %

Solución C: CuSO₄ 1 %.

Solución Reactiva: Mezcle 0.5 ml de Solución C + 0.5ml de Solución B + 49 ml de Solución A.

12. ENSAYO DE ENQUISTAMIENTO

1. Inocular una caja de BS + antibiótico con la cepa en cuestión. Incubar a 30°C/48 h.
2. Inocular 25 ml de medio BS con una asada del cultivo en placa. Incubar 30°C/48 h.
3. Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm / 10 min.
4. Lavar las células 3 veces con 30ml de MgSO₄ 10mM.
5. Resuspender las células en 500 µl de MgSO₄ 10mM y transferir 100 µl a una placa de medio BB al 0.2 %, para inducir enquistamiento. Incubar a 30° C/ 5 días.
6. Al acabo de éste tiempo recoger las células y resuspenderlas en 1 ml de MgSO₄ 10mM.
7. Por otro lado esterilizar filtros millipore cat. VSWPO1300. Introduzca un filtro de 13 mm de diámetro al interior de un tubo eppendorf de 1.5 ml, con la ayuda de unas pinzas previamente flameadas. Sobre el filtro coloque 20 µl de la suspensión de células. Se recomienda hacerlo por triplicado. La cantidad recomendada de células depositadas sobre el papel filtro es ≤ 10⁶.
8. Transferir los tubos Eppendorf al interior de una caja Petri vacía y estéril e incubar a 30°C / 5 días.
9. A partir de la misma suspensión de células hacer cuentas viables para determinar el número exacto de células depositadas en el filtro. Realice diluciones a la -5, y -6 y platee 100 µl de éstas diluciones en placas de BS. Incube a 30oC / 48 h y cuente las colonias.
10. Al cabo de 5 días de desecación agregarle a cada tubo eppendorf / filtro 1mL de MgSO₄ 10mM. Repose 4 h a T.A agitando vigorosamente en vortex cada hora para permitir que las células se liberen del filtro.
11. Realizar cuentas viables de ésta suspensión. Haga diluciones a la -1, -2, y -3, platee 100 µl de estas diluciones en placas de BS suplementadas con el antibiótico de

resistencia y al cabo de 48 – 72 h cuente las colonias. Sólo los quistes maduros resisten la desecación y serán los que se recuperan en éste punto.

12. Calcule el % de enquistamiento en base al número de células calculadas en el paso 8 (100%) y las recuperadas en el paso 10. Considere las diluciones y haga las correcciones necesarias.

12. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE β -GLUCURONIDASA

Soluciones:

LISOZIMA 10 mg/ml

Disolver 10 mg de lisozima en 1 ml de agua destilada. Mantener la solución en congelación.

PNPG 4.0mg/ml (12.5 mM) Disolver 40mg de PNPG (pnitrofenil - β - D- glucurónido) en 10ml de agua destilada (puede mantenerse en congelación por 1-2 meses)

Na₂CO₃ 1.2 M

Disolver 12.72 g de Na₂CO₃ en 100mL de agua destilada.

Triton X100

Solución 10% V/V de Tritón en agua destilada.

BUFFER Z

ml STOCK / 50ml

| | | |
|---------------------------------|--------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 0.03M 0.5M | 3.0 ml |
| KH ₂ PO ₄ | 0.02M 0.5M | 2.0 ml |
| EDTA | 0.001M 0.25M | 0.2ml |
| DTT | 0.005M 0.25M | 1.0ml |

PROCEDIMIENTO

1. Tomar una muestra de 1ml de cultivo o más dependiendo de la densidad celular. Centrifugar la muestra para obtener el paquete celular. Congelar en hielo seco si es posible y almacenarse a -20°C.
2. Resuspender la pastilla en 1ml de MgSO₄10mM o una cantidad menor dependiendo del tamaño de la muestra.
3. Tomar 20 μ l de muestra (Vol. Rx) (o de alguna dilución de la muestra dependiendo del grado de expresión de la β -Galactosidasa) y agregar 710 μ l de amortiguador Z.

Preparar, al mismo tiempo un blanco que contenga 730 μl de amortiguador Z y procesarlo junto con las muestras.

4. Agregar 10 μl de solución de lisozima e incubar los tubos 5min /37°C en baño María.
5. Agregar 10 μl de solución Triton al 10%.
6. Agregar 100 μl de solución de ONPG. Cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
7. Transferir los tubos inmediatamente a un baño de agua a 28°C, por exactamente 15 minutos (t Rx).
8. Agregar 150 μl de solución de Na_2CO_3 para detener la reacción.
9. Leer la absorbancia a 405 $_{\text{nm}}$ contra el blanco. El coeficiente de extinción molar de p-nitrofenol es 18000. Por lo tanto una DO de 0.018 (en un V= 1 ml representa 1 nmol de producto producido).

CÁLCULOS

$$U \beta\text{-Gluc} = \text{DO}_{405} (1000) / [(0,018) (t \text{ Rx minutos}) (\text{Vol Rx } \mu\text{l}) (\text{proteína } \mu\text{g /ml})]$$
$$1 \text{ U} = \text{nmoles de PNP producidos /min /}\mu\text{g proteína}$$

LITERATURA CITADA

- Baker J, Van DennSteele C, Dure L 3rd** (1988) Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11(3):277–291.
- Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C** (1992) Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 58(5):1711–1718.
- Bartels D** (2005) Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Integr. Comp. Biol.* 45:696–701
- Bartels D and Sunkar R** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23–58.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148:6–24.
- Battista JR, Park MJ, McLemore AE** (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology* 43(2):133–139.
- Bent AF** (2000) Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects of other species. *Plant Physiology* 124:1540–1547.
- Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A** (2002) Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. *Nature* 416(6876):38.
- Buchanan, RE and Gibbons, NR** (eds.1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins. Baltimore.
- Campos F, Cuevas-Velazquez C, Fares MA, Reyes JL, Covarrubias AA** (2013) Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaea and bacteria domains. *Molecular Genetics and Genomics* 288(10):503–517.
- Caprioli M, Katholm AK, Melone G, Ramløv H, Ricci C, Santo N** (2004) Trehalose in desiccated rotifers: a comparison between a bdelloid and a monogonont species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139:527–532
- Castaneda M, Sánchez J, Moreno S, Nuñez C, Espín G** (2001) The global regulator GacA form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 183: 6787–6793.
- Chakrabortee S, Tripathi R, Watson M, Kaminski Schierle GS, Kurniawan DP, Kaminski CF, Wise MJ, Tunnacliffe A** (2012) Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular Biosystems* 8:210–219
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239–264.

Chen Y, Qu YQ, Jia X (2003) The characters and gene expression of rice seed proteins. *Hereditas* 25(3):367–372.,

Chen ZQ, Liu Q, Zhu YS, Li YX (2002) Assessment on predicting methods for membrane-protein transmembrane regions. *Biochemica et Biophysica Acta* 34(3)285–290.

Clementi F (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology* 17(4):327-61.

Close TJ, Lammers PJ (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.* 101:773–79

Cocotl-Yañez M, Sampieri A, Moreno S, Nuñez C, Castañeda M, Segura D, Espín G (2011) Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 157:1685–1693.

Cocotl-Yañez M, Moreno S, Encarnación S, López-Pliego L, Castañeda M (2014) A small heat shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 160: 479–487.

Crowe JH, Crowe LM, O'Dell SJ (1981) Ice formation during freezing of *Artemia* cysts of variable water contents. *Molecular Physiology* 1:145–152.

Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, Bansai KC (2009) Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology* 139:137–145.

Denekamp NY, Thorne MA, Clark MS, Kube M, Reinhardt R, Lubzens E (2009) Discovering genes associated with dormancy in the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *BMC Genomics* 10:108.

Denekamp NY, Reinhardt R, Kube M, Lubzens E (2010). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biology of Reproduction* 82:714–724.

Dure L III (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3(3): 363-369.

Dure L III (2001) Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Protein and Peptides Letters* 8:115–22

Dure L, Greenway SC, Galau G (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20:4162–68

Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435:43–57

Federspiel N (2003) Deciphering a weed: Genomic sequencing of Arabidopsis. *Plant Physiology* 124:1456–1459.

Forsyth WGC, Hayward, AC, Roberts JB (1958) Occurrence of poly- β -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. *Nature* 182:800-801.

Frazzon J, Dean DR (2002) Biosynthesis of the nitrogenase iron molybdenum-cofactor from *Azotobacter vinelandii*. *Metal Ions in Biological Systems* 39:163–186.

Furuki T, Shimizu T, Chakrabortee S, Yamakawa K, Hatanaka R, Takahashi T, Kikawada T, Okuda T, Mihara H, Tunnacliffe A, Sakurai M (2012) Effects of Group 3 LEA model peptides on desiccation-induced protein aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824:891–897

Gal TZ, Glazer I, Koltai H (2003) Differential gene expression during desiccation stress in the insect-killing nematode *Steinernema feltiae* IS-6. *Journal of Parasitology* 89:761–766.

Gal TZ, Glazer I, Koltai H (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Letters* 577:21–26.

Galau GA, Hughes DW, Dure L (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 7:155–70

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

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, CovarrubiasAA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275(8):5668–5674.

Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388(1):151–157.

Guidetti R, Jonsson KI (2002) Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans. *Journal of Zoology* 257:181–187.

Hand SC, Dana J, Menze MA, Witt TL (2007) Life without water: Expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology* 307A:62–66.

Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D (2011) LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore. *Annual Reviews of Physiology* 73:115–134.

Hatanaka R, Hagiwara-Komoda Y, Furuki T, Kanamori Y, Fujita M, Cornette R, Sakurai M, Okuda T, Kikawada T (2013) An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(11):1055–1067.

He S, Tan L, Hu Z, Chen G, Wang G, Hu T (2012) Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Molecular Genetics and Genomics* 287:39–54.

Hengherr S, Schill RO, Clegg JS (2011) Mechanisms associated with cellular desiccation tolerance in the animal extremophile *Artemia*. *Physiological and Biochemical Zoology* 84(3):249–257.

Hernandez-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espín G (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology* 157: 3014–3023

Hincha DK and Thalhammer A (2012) LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical Society Transactions* 40: 1000–1003

Honjoh KI, Matsumoto H, Shimizu H, Ooyama K, Tanaka K, Oda Y, Takata R, Joh T, Suga K, Miyamoto T, Lio M, Hatano S (2000) *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 64(8):1656–1663.

Hou XW and Guo Y (1998) Ubiquitin and response of plant to stress. *Plant Physiology Communications* 34(6):474–478

Hundertmark M, Popova AV, Rausch S, Seckler R, Hincha DK (2012) Influence of drying on the secondary structure of intrinsically disordered and globular proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417:122–128.

Kaneshiro T and AG Marr (1962) Phospholipids of *Azotobacter agilis*, *Agrobacter tumefaciens* and *Escherichia coli*. *Lipid Research* 3:184-189.

Kanias T, Acker JP (2006) Mammalian cell desiccation: facing the challenges. *Cell Preservation Technology* 4:253–277.

Kennedy C, Gamal R, Hummprey R, Ramos J, Brigle K, Dean D (1986) The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene bank. *Molecular Genetics and Genomics* 205(2):318–325.

Kikawada T, Nakahara Y, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, McGee B, Tunnacliffe A, Okuda T (2006) Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348:56–61.

Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157(1):105–132.

Koo VM, Lin, LP, Sadoff, HL (1969) Structure of *Azotobacter vinelandii* cyst surface as revealed by freeze-cleaving. *Journal of Bacteriology* 100:1105-1107.

Laferty RM, Korsakto B, Korsakto W (1990) Microbial Production of polyhydroxybutyric acid. In, Rehm H. J., G. Reed Eds. *Biotechnology*.

Lewis IM (1937) Cell inclusions and the life cycle of *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology* 34:191-205.

- Li S, Chakraborty N, Borcar A, Menze MA, Toner M, Hand S** (2012) Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 100: 20859–20864.
- Li NY, Gao JF, Wang PH** (1998) Protein characters induced by water stresses in wheat seedlings. *Acta Phytophysiologica* 24(1):65–71.
- Lin ZP and Hu YL** (1997) Stress resistance of plants induced via the salicylic acid-mediated signal transduction pathway. *Acta Botanica* 39(2):185–188.
- Lin LP, Sadoff HL** (1968) Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* 95(6):2336–2343.
- Loperfido B and Sadoff HL** (1973) Germination of *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* 98:1335-1341.
- Manchal J and Vanderleyden J** 2000 The "oxygen paradox " of dinitrogen-fixing bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 30:363-373.
- Menze MA, Boswell L, Toner M, Hand SC** (2009) Occurrence of mitochondria-targeted late embryogenesis abundant (LEA) gene in animals increases organelle resistance to water stress. *Journal of Biological Chemistry* 284:10714–19.
- Muriel-Millán LF, Moreno S, Romero Y, Bedoya-Pérez LP, Castañeda M, Segura D, Espín G** (2015) The unphosphorylated EIIANtr protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS One* 10(2):e0117184.
- Moreno S, Najera R, Guzman J, Soberón-Chávez G, Espín G** (1998) Role of alternative sigma factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 180: 2766–2769.
- Navarro LLorens JM, Tormo A, Martinez-Garcia E** (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiological Reviews* 34: 476–495.
- Núñez C, León R, Guzman J, Espín G, Soberón-Chávez G** (2000) Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *Journal of Bacteriology* 182: 6550–6556.
- Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garcíarrubio A, Covarrubias AA** (2010) Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154(1):373–390.
- Page WJ, Sadoff HL** (1975) Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 122:145-151.
- Pouchkina-Stantcheva NN, McGee BN, Boschetti C, Tolleter D, Chakrabortee S, Popova AV, Meersman F, Macherel D, Hinch DK, Tunnacliffe A** (2007) Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate. *Science* 318:268–271.

Reyes JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA (2008) Functional dissection of hydrophilins during *in vitro* freeze protection. *Plant Cell Environment* 31(12):1781–1790.

Rizhsky L, Liang HJ, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130:1143–1151.

Rohrig H, Schmidt J, Colby T, Brautigam A, Hufnagel P, Bartels D. (2006) Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant Cell Environment* 29:1606–1617.

Sadoff HL (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews* 39:516–539.

Sadoff HL, Berke E, Loperfido B (1971) Physiological studies of encystment in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 105(1):185–189.

Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1463:267–78

Sallon S, Solowey E, Cohen Y, Korchinsky R, Egli M, Woodhatch I, Simchoni O, Kislev M (2008) Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320:1464.

Sanchez-Ballesta MT, Rodrigo MJ, Lafuente MT, Granell A, Zacarias L (2004) Dehydrin from Citrus, which confers *in vitro* dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1950–1957.

Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espín G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, O'Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin SL, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wallin E, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R, Wood D (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology* 191(14):4534–4545.

Shokraie E, Hotz-Wagenblatt A, Warnken U, Mali B, Frohme M, Förster F, Dandekar T, Hengherr S, Schill RO, Schnölzer M (2010) Proteomic analysis of tardigrades: Towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PLoS One* 5:1–37.

Socolofsky MD and Wyss O (1962) Resistance of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Bacteriology* 84:119-124.

Soto A, Allona I, Collada C, Guevar MA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L (1999) Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiology* 120(2):521–528.

Stacy RA and Aalen RB (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta* 206(3): 476–478.

Stevenson LH and MD Socolofsky (1966) Cyst formation and poly-beta-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*. 91:304–310.

Sutherland IW (1985) Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* 39:243–270.

Swire-Clark GA, Marcotte WR Jr (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* 39:117–128

Tchan YT, Birch-Andersen, A, Jensen HL (1962) The ultra-structure of vegetative cells and cysts of *Azotobacter chroococcum*. *Archives of Mikrobiologie* 43:50-66.

Tolte D, Hinch DK, Macherel D (2010) A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798:1926–1933

Tompa K, Bokor M, Tompa P (2010) Hydration of intrinsically disordered proteins from wide-line NMR. In: Uversky V, Longhi S (eds) Instrumental analysis of intrinsically disordered proteins: assessing structure and conformation. Wiley, Hoboken, pp 345–368

Toxopeus J, Warner AH, MacRae TH (2014) Group 1 LEA proteins contribute to the desiccation and freeze tolerance of *Artemia franciscana* embryos during diapause. *Cell Stress and Chaperones* 19(6):939–948.

Tunnacliffe A, Lapinski J, McGee B (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic *bdelloid rotifers*. *Hydrobiologia* 546:315–321.

Tunnacliffe A and Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94(10):791–812.

Vela GR (1974) Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Applied Microbiology* 28(1):77–79.

Welin BV, Olson A, Nylander M, Palva ET (1994) Characterization and differential expression of DHN/LEA/RAB-like genes during cold-acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 26:131-144.

Wilson PW and Knight SG (1952) Experiments in bacterial physiology. Burgess Publishing Co., Minneapolis.

Wise MJ and Tunnacliffe A (2004) POPP the question: What do LEA proteins do? *Trends in Plant Sciences* 9:13-17.

Wisniewski K, Zagdanska B (2001) Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *Journal of Experimental Botany* 52(360):1455–1463. ,

Wu G, Zhang H, Sun J, Liu F, Ge X, Chen W, Yu J, Wang W (2011) Diverse LEA (late embryogenesis abundant) and LEA-like genes and their responses to hypersaline stress in post-diapause embryonic development of *Artemia franciscana*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 160:32-39.

Wunderlin T, Ferrari B, Power M (2016) Global and local scale variation in bacterial community structure of snow from the Swiss and Australian Alps. *FEMS Microbiology and Ecology* 92(9):1–11.

Wyss O, Neumann MG, Socolofsky, MD (1961) Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 10:555-565.

Yu JN, Zhang LS, Gao JF (2002) Effect of water stress on induced protein expression of wheat seedlings and suspension cultures. *Acta Botanica Boreal-Occident* 52(4):865–870

Zhang LS and Zhao WM (2003) LEA protein functions to tolerance drought of the plant. *Plant Physiology Communications* 39(1):61–66.

Zhang JF, Deng XP, Mu XQ (2002) Plant aquaporin. *Plant Physiology Communications* 38(1):88–91.

Zhu JK, Hasegawa PM, and Bressan RA (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 16:253–277.

Pouchkina-Stantcheva NN, McGee BM, Boschetti C, Tolleter D, Chakrabortee S (2007) Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate. *Science* 318:268–71.

Sharon MA, Kozarova A, Clegg JS, Vacratsis PO, Warner AH (2009) Characterization of a group 1 late embryogenesis abundant protein in encysted embryos of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochemistry Cell Biology* 87:415–30.