



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Microbiología Molecular

**RpoS Y SU FUNCIÓN EN EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO EN
Azotobacter vinelandii.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C. MIGUEL COCOTL YAÑEZ

TUTOR PRINCIPAL

D.C. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO IBt

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

D.C. JOSÉ LUIS PUENTE IBt
D.C. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ BIOMÉDICAS

CUERNAVACA, MORELOS. FEBRERO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	3
1.2 Alginato, poli- β -hidroxibutirato (PHB) y Alquilresorcinolos (AR's)	3
1.2.1 Alginato: composición, función biológica y biosíntesis.	3
1.2.2 PHB: composición, aplicaciones, función biológica y biosíntesis.	6
1.2.3 Alquilresorcinolos: composición, función biológica y biosíntesis.	7
1.3 Los sistemas de regulación global: Gac-Rsm y RpoS.	8
1.3.1 El sistema de doble componente GacS/GacA y el sistema Rsm.	8
1.3.2 El factor sigma RpoS.	9
1.4 El proceso de enquistamiento en <i>A. vinelandii</i> y la desecación.	10
1.5 Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHsp's).	12
1.5.1 Regulación de la expresión de las sHsp's.	14
CAPITULO 2: ANTECEDENTES	16
2.1 Regulación de la biosíntesis de los polímeros por el sistema Gac-Rsm.	16
2.2 Regulación del enquistamiento en <i>A. vinelandii</i> .	18
2.3 RpoS en <i>A. vinelandii</i> y su relación en el enquistamiento.	19
CAPITULO 3: HIPÓTESIS	22
CAPITULO 4: OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general.	22
4.2 Objetivos específicos.	22
CAPITULO 5: MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.	23

5.2 Condiciones de cultivo.	25
5.3 Manipulación de ácidos nucleicos y proteína.	25
5.4 Procedimientos de proteómica.	26
5.5 Construcción de la mutante en <i>hsp20</i> y en <i>lpxA</i> .	27
5.6 Complementación de las cepas AEhsp20 y AErpoS con <i>hsp20</i> .	27
5.7 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).	28
5.8 Análisis de 'Primer extension'.	29
5.9 Expresión de Hsp20 ^{-His6} .	29
5.10 Ensayos de Pull-Down	29
5.11 Construcción de la fusión transcripcional y traduccional de <i>hsp20</i> .	30
5.12 Resistencia a la desecación y análisis por microscopía electrónica.	31
CAPITULO 6: RESULTADOS.	32
6.1 Expresión diferencial de proteínas de la cepa silvestre AEIV en fase de enquistamiento comparada con la fase vegetativa.	32
6.2 Análisis del proteoma de la cepa silvestre AEIV y la mutante en <i>rpoS</i> , AErpoS.	34
6.3 RpoS regula una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (Hsp20) que es esencial para la sobrevivencia del quiste en la desecación.	36
6.3.1 Hsp20 en <i>A. vinelandii</i> .	36
6.3.2 El gen <i>hsp20</i> es transcrito a partir de un promotor dependiente de RpoS.	37
6.3.3 Expresión de <i>hsp20</i> en condiciones vegetativas y en enquistamiento.	39
6.3.4 La mutación en <i>hsp20</i> abate la resistencia a la desecación de los quistes.	42
6.3.5 La síntesis de los alquilresorcinolos no esta afectada en la mutante en <i>hsp20</i> .	44
6.3.6 La expresión de <i>hsp20</i> a partir de un promotor independiente de RpoS no restaura la resistencia a la desecación en la mutante en <i>rpoS</i> .	45
6.3.7 Interacción de Hsp20 con proteínas de células enquistadas.	47
6.4 Rpos y su relación con las epimerasas en <i>A. vinelandii</i> .	50

6.4.1 Detección de las epimerasas AlgE1-7 en la mutante en <i>rpoS</i> .	50
6.4.2 Efecto de la mutación en <i>rpoS</i> en la expresión de los genes <i>eexDEF</i> .	51
6.4.3 Efecto de la mutación en <i>rpoS</i> sobre la expresión del gen <i>avin51240</i> .	54
CAPITULO 7: DISCUSIÓN.	55
CAPITULO 8: CONCLUSIONES.	62
CAPITULO 9: PERSPECTIVAS.	63
CAPITULO 10: REFERENCIAS.	64

ANEXO 1, ARTICULO:

Cocotl-Yanez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Nuñez, C., Castaneda, M., Segura, D., Espin, G. 2011. Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology, 157, 1685-1693.

ANEXO 2, ARTICULO:

Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., Velez-Pliego, L., Castañeda, M., Espín, G. A small heat shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology. [Epub ahead of print].

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa que tiene la capacidad de formar quistes resistentes a la desecación. En este proceso se sintetizan los alquilresorcinoles, que son lípidos fenólicos específicos de los quistes. Poco se sabe de la regulación genética del enquistamiento, una mutación en el gen *rpoS* da como resultado células que no pueden sintetizar alquilresorcinoles y tampoco pueden formar quistes resistentes a la desecación.

En este trabajo buscamos genes regulados por RpoS que son necesarios para resistir a la desecación y para la estructura del quiste. Llevamos a cabo el análisis del proteoma de células en fase vegetativa y de enquistamiento, de la cepa silvestre y de la mutante en RpoS, AErpoS. Este análisis nos permitió identificar una proteína de choque térmico de bajo peso molecular, Hsp20, como una de las proteínas mas abundantes en el quiste y cuya expresión es regulada por RpoS. La inactivación de *hsp20* no afecto la síntesis de los alquilresorcinoles o la formación de los quistes; sin embargo, estos quistes fueron incapaces de resistir a la desecación. Estos resultados indican que Hsp20 es esencial para la resistencia a la desecación, posiblemente evitando la agregación de proteínas necesarias para la sobrevivencia de los quistes. Encontramos que Hsp20 es capaz de unirse al menos a 10 proteínas cuando se da el proceso de diferenciación y que la expresión de *hsp20* es regulada a nivel post-transcripcional.

Demostramos que la expresión de *hsp20* a partir de un promotor independiente de RpoS no restaura el fenotipo de resistencia a la desecación en la cepa AErpoS. Esto sugiere que hay otros genes, regulados por RpoS, que son necesarios para la formación de los quistes maduros resistentes a la desecación. Encontramos que estos genes son los que codifican para el sistema de transporte de las epimerasas de alginato, *eexDEF*, que ya se ha demostrado que son esenciales para la formación de quistes maduros.

ABSTRACT

Azotobacter vinelandii is a Gram-negative bacterium that undergoes an encystment process to form cysts resistant to dessication. In this process, the alkylresorcinols are synthesized as cyst specific lipids. Little is known about the genetic regulation of the encystment; the alternative sigma factor RpoS is essential to form cysts resistant to desiccation and to synthesize alkylresorcinols.

In this study, we carried out a proteomic analysis of vegetative cells and cysts of *A. vinelandii* strain AEIV and its *rpoS* mutant derivative, AErpoS. This analysis allowed us to identify a small heat shock protein, Hsp20, as one of the most abundant proteins of the cyst regulated by RpoS. Inactivation of *hsp20* did not affect the synthesis of alkylresorcinols or the formation of cysts; however, the cysts formed by the *hsp20* mutant strain were unable to resist desiccation. These results indicate that Hsp20 is essential for the resistance to desiccation, likely by preventing the aggregation of proteins necessary for survival of the cysts. We found that Hsp20 is able to bind to at least 10 proteins in the encystment process and that expression of *hsp20* is regulated at the post-transcriptional level.

We also demonstrated that expression of *hsp20* from an RpoS independent promoter in the AErpoS mutant strain is not enough to restore the phenotype of resistance to desiccation. These data suggest that other genes are under RpoS control necessary to encystment process. We found that these genes encode for the system responsible for export of the alginate epimerases, *eexDEF*, that were previously shown to be essentials for the formation of mature cysts.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa que se reproduce por fisión binaria, vive en suelos y se mueve por flagelos peritricos. Son células ovoides grandes de 2 a 5 μm de diámetro cuya morfología varía desde la forma bacilar hasta células en forma de cocos. Se le puede observar como células individuales, en pares o formando agregados irregulares. Es aerobia, pero puede crecer en concentraciones bajas de oxígeno (Jensen, 1954). Es fijadora de nitrógeno y poliploide, es decir, posee varias copias de su cromosoma pudiendo tener hasta 80 copias. El número de copias depende del medio y las condiciones de cultivo así como de la fase de crecimiento (Nagpal *et al.* 1986). *A. vinelandii* puede crecer a partir de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos y produce los polímeros alginato y poli- β -hidroxibutirato (PHB), además de producir alquilresorcinolos (AR's) (Lin & Sadoff, 1968).

Este género presenta una característica poco común entre bacterias Gram negativas: bajo condiciones adversas, tiene la capacidad de diferenciarse morfológicamente generando formas celulares latentes denominadas quistes.

1.2 Alginato, poli- β -hidroxibutirato (PHB) y Alquilresorcinolos (AR's)

1.2.1 Alginato: composición, función biológica y biosíntesis.

El alginato es un heteropolímero compuesto por monómeros de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M) unidos por enlaces $\beta(1-4)$, cuyo contenido y distribución es variable (Larsen *et al.* 1971). Para la bacteria el alginato es esencial para la biogénesis del quiste maduro durante el proceso de enquistamiento (Lin & Sadoff, 1969). En estado vegetativo, el alginato le sirve para formar películas de adherencia a superficies o bien actuar como barrera

contra la difusión del oxígeno o metales pesados (Fyfe & Govan, 1983). Su aplicación se da en la industria de alimentos y farmacéutica (Clementi, 1997).

El alginato es sintetizado a partir de la fructuosa-6-fosfato la cual es convertida por tres reacciones enzimáticas a GDP-manosa, la cual es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) para dar GDP-manurónico siendo este el sustrato para la polimerización. El gen *algD* codifica para la enzima clave de la síntesis de alginato ya que la reacción que lleva a cabo es irreversible (Tatnell *et al.*, 1994). El alginato es inicialmente sintetizado como polimanurónico, el cual es entonces modificado por alginato liasas, o-acetilasas y las C-manurónico epimerasas; éstas últimas introducen los residuos gulurónico a la cadena por conversión del ácido manurónico a ácido gulurónico (Ertesvag *et al.*, 1999; Valla *et al.*, 2001; Bjerkkan *et al.* 2004) (Fig. 1).

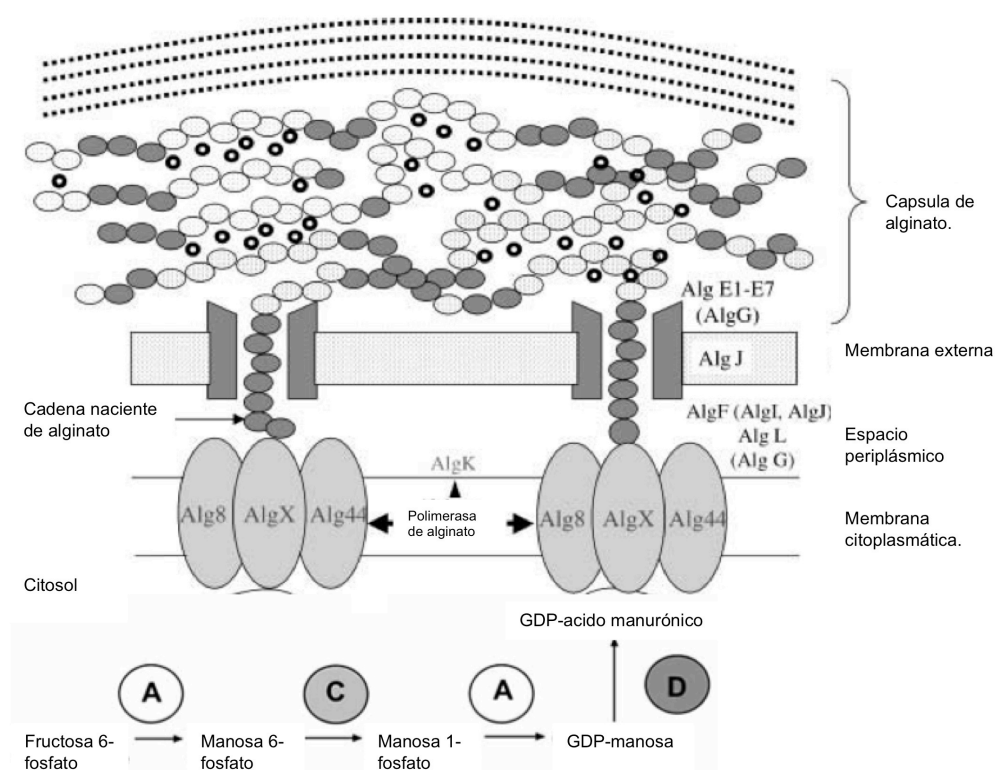


Fig. 1. Modelo de la biosíntesis y ensamblaje del alginato (Modificado de Muhammadi and Nuzhat Ahmed, 2007).

A. vinelandii posee siete genes que codifican para C-5 manurónico epimerasas (*algE1-7*), de los cuales sólo *algE5* es codificado en una región diferente al resto de los genes. Las epimerasas son enzimas modulares que contienen uno o dos módulos A y de uno a siete módulos R. Dentro de cada tipo de módulo el rango de similitud va del 50 al 100%. El módulo A contiene el sitio catalítico de la enzima y determina la distribución final de los residuos gulurónicos (Ertesvag & Valla, 1999). La presencia del modulo R incrementa la actividad de la enzima cerca de 10 veces y contienen de cuatro a siete repetidos directos imperfectos de un motivo de nueve aminoácidos, encontrados en muchas proteínas que son exportadas por transportadores tipo ABC (Delepelaire, 2004). Las diferentes epimerasas producen alginatos con distintos patrones de epimerización (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura modular y productos finales de las diferentes C-5 epimerasas de *A. vinelandii* (Svanem *et al.*, 1999)

Enzima	Estructura modular	Producto	Otras actividades
AlgE1	A-R-R-R-A-R	Bloques G y MG	Actividad débil de liasa.
AlgE2	A-R-R-R-R	Bloques G (cortos)	
AlgE3	A-R-R-R-A-R-R-R-R	Bloques G y MG	
AlgE4	A-R	Bloques MG	Actividad débil de liasa.
AlgE5	A-R-R-R	Bloques G (mediano)	
AlgE6	A-R-R-R	Bloques G (largos)	
AlgE7	A-R-R-R	Bloques G y MG	Actividad de liasa.

Las epimerasas son exportadas a través de un sistema de secreción tipo I codificadas por los genes *eexDEF*. Este operón está compuesto por el gen *eexD* el cual codifica para un transportador tipo ABC, *eexE* que codifica para una proteína de fusión a membrana y *eexF* que codifica una proteína de membrana externa (Gimmestad *et al.*, 2006). Cabe mencionar que la regulación de los genes

que codifican para las epimerasas así como de su exporte no ha sido investigada en *A. vinelandii*.

En la biosíntesis de alginato, el gene *algD*, se transcribe a partir de tres promotores, uno de ellos (P1) es dependiente de σ^S , el segundo promotor (P2) dependiente de σ^E y un tercer promotor (P3) cuya identidad se desconoce (Castañeda *et al.*, 2001). El operón *algUmucABCD* ha sido caracterizado en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* y se sabe que sus productos controlan la producción de alginato. AlgU es un homólogo del factor σ^E . Los genes *mucA* y *mucB* codifican factores antisigma que regulan negativamente la actividad de AlgU (Martínez-Salazar *et al.*, 1996).

1.2.2 PHB: composición, aplicaciones, función biológica, y biosíntesis.

El PHB es un homopolímero constituido por monómeros de β -hidroxi butirato, perteneciente a la familia de los poli-hidroxialcanoatos, considerados compuestos de importancia industrial ya que se usan como materia prima alternativa para la fabricación de plásticos biodegradables.

Se propone que en *A. vinelandii* el PHB podría funcionar como material de reserva de carbono y energía en periodos de limitación de nutrimentos en el medio (Lafferty *et al.*, 1990). Otra posible función estaría relacionada con la protección de la nitrogenasa; *Azotobacter* tiene una tasa de respiración alta para mantener la concentración intracelular de oxígeno baja, para ello es necesario tener una fuente de carbono que le provee la energía suficiente para llevarlo a cabo (Senior *et al.*, 1972).

En la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* están involucradas tres reacciones enzimáticas (Manchak & Page, 1994): la primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa para dar

acetoacetyl-CoA. El acetoacetyl-CoA formado se reduce por la acetoacetyl-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que finalmente se polimeriza por la actividad de PHB sintasa. En *A. vinelandii* los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* codifican para la β -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa, respectivamente. Los tres genes se encuentran agrupados formando el operón *phbBAC*. El operón *phbBAC* es transcrito a partir de dos promotores sobrelapados, pB1 y pB2. PhbR, codificado por *phbR*, activa la transcripción del operón biosintético de PHB a partir del promotor pB1, mientras que la transcripción de pB2 es dependiente del factor σ^S (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

1.2.3 Alquilresorcinoles: composición, función biológica y biosíntesis.

Los alquilresorcinoles (AR's) son lípidos fenólicos homólogos de orcinol de cadenas laterales largas que, junto con otros lípidos denominados 6-n-alquilpironas, reemplazan a los fosfolípidos de la membrana de células vegetativas cuando inicia el proceso de diferenciación, constituyendo el 95% de lípidos totales en la membrana del quiste. Debido a las propiedades de los AR's (cadenas alifáticas largas), se ha propuesto que al estar presentes en la membrana de los quistes favorecen la protección contra la desecación (Kozubek & Tyman, 1999; Parker & Socolofsky, 1966).

En la biosíntesis de los AR's en *A. vinelandii* están implicadas las proteínas ArsA, ArsB, ArsC y ArsD. La ruta iniciaría con ArsA, que cataliza la síntesis de una molécula de 22 carbonos, el n-behenil-CoA a partir de una unidad iniciadora de acetyl-CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA. El n-behenil-CoA es utilizado como un sustrato por ArsB para sintetizar los 5-n-heneicosilresorcinoles por condensación aldólica entre C2 y C7, a su vez también el n-behenil-CoA es sustrato para ArsC para la formación de 6-n-alquilpironas. ArsD catalizaría la modificación post-traducciona del dominio ACP (Proteína Acarreadora de Acilos) de la proteína ArsA, uniendo covalentemente un 'brazo' de

4-fosfopanteteína proveniente de coenzima A, para que de esta manera hacer funcional a ArsA para aceptar a sus sustratos (Funa *et al.*, 2006)

En lo referente a la regulación genética, se ha identificado un grupo de 11 genes que intervienen en la biosíntesis de los AR's (Vite, 2003). Dentro de este grupo se encuentran los genes *arsABCD* en el cual *arsA* codifica para la sintasa de ácidos grasos tipo I, *arsB* y *arsC* codifican para la policétido sintasa tipo III y *arsD* codifica para la 4-fosfopanteteinil transferasa (Vite, 2003). La expresión de estos genes están bajo el control del regulador ArpR (Romero *et al.*, 2013).

La producción de AR's, se puede cuantificar por un método químico-espectrofotométrico utilizando una solución reactiva de "Azul Rápido B" específica para ARs (Tluscik *et al.*, 1981). Este mismo reactivo puede usarse para observar la producción de estos lípidos de manera cualitativa en placas de cultivo, por la coloración roja que produce (Segura *et al.*, 2009).

1.3 Los sistemas de regulación global: Gac – Rsm y RpoS.

En *A. vinelandii* la biosíntesis de alginato, PHB y AR's es regulada por el sistema de doble componente GacS/GacA, el sistema Rsm y el factor sigma RpoS (Castañeda *et al.*, 2001; Manzo *et al.*, 2011, Romero *et al.*, 2013; Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

1.3.1 El sistema de doble componente GacS/GacA y el sistema Rsm.

El par regulador GacS/A es un sistema de transducción de señales de dos componentes reportado en varias especies bacterianas del subgrupo γ . La proteína GacS es una cinasa histidinica cuyos dominios periplásmicos detectan la señal, se autofosforila y transmite el grupo fosfato a la proteína GacA, que es el regulador de la respuesta (Parkinson & Kofoed, 1992; Stock *et al.*, 1995). Se ha reportado que este sistema controla sus blancos de forma indirecta, modulando la

expresión de RNAs pequeños no codificantes llamados CsrB/CsrC (en *E. coli*) o RsmY/Z (en *Pseudomonas* spp.), que forma parte del sistema de regulación post-transcripcional Csr o Rsm (Humair *et al.*, 2010).

El sistema conocido como Csr en *E. coli* o Rsm en *Pseudomonas* spp. es un sistema que controla la expresión de genes bacterianos post-transcripcionalmente, su efector es una pequeña proteína de unión a RNA referida como CsrA o RsmA, la cual se une al sitio de unión al ribosoma impidiendo la traducción (Romeo, 1998; Dubey *et al.*, 2005). El segundo componente del sistema es CsrB/CsrC (RsmY/Z), los cuales son RNAs pequeños no codificantes que forman estructuras secundarias en las cuales se encuentran varios tallos y asas. En las asas se encuentran secuencias repetidas que son reconocidas por CsrA (RsmA). De esta forma CsrB/CsrC (RsmY/Z) secuestran a las moléculas de CsrA (RsmA) dejando libre el RNAm para ser traducido (Romeo, 1998).

1.3.2 El factor sigma RpoS

El factor transcripcional RpoS es el regulador maestro de la respuesta a estrés general en *E. coli*; está presente en bajos niveles en fase logarítmica y su expresión es inducida en respuesta a una gran variedad de tipos de estrés cuando entra a fase estacionaria. Cuando los niveles de RpoS son altos compite con el factor sigma RpoD por el núcleo de la RNA polimerasa y reprograma esta enzima para activar la transcripción de genes necesarios para contender al estrés al cual se enfrenta la célula (Hengge-Aronis, 2002; Typas *et al.*, 2007).

La importancia del papel fisiológico de σ^s se refleja en su compleja regulación, la cual se da a niveles de transcripción, traducción de su RNAm y de su proteólisis, con diferentes condiciones de estrés afectando los varios niveles de control. De modo que, la transcripción de *rpoS* es estimulada por una continua reducción en la tasa de crecimiento celular, lo cual resulta en un incremento en la transcripción de *rpoS* (de 5 a 10 veces más) (Notley & Ferenci, 1996). Por otro

lado, la tasa de traducción del RNA mensajero ya existente de *rpoS* es estimulada por i) alta osmolaridad, ii) durante el crecimiento a bajas temperaturas, iii) cuando alcanza cierta densidad celular y iv) en respuesta a un cambio de pH ácido. Estos cambios también reducen la proteólisis evitando su degradación, como consecuencia acumulándose rápidamente en la célula (Lange & Hengge-Aronis, 1994; Muffler *et al.*, 1996, 1997; Sledjeski *et al.*, 1996)

En *P. aeruginosa*, RpoS está involucrado en la síntesis del alginato y la exotoxina A (Suh *et al.*, 1999) , mientras que en *P. fluorescens*, RpoS esta implicado en la síntesis de antibióticos y metabolitos secundarios (Sarniguet *et al.*, 1995). El grado de importancia de RpoS para la resistencia a estrés que viene dado por el calor, bajo pH, hiperosmolaridad, peróxido de hidrogeno y etanol es menos pronunciado en *P. aeruginosa* que en *E. coli*. Por lo tanto, parece ser que RpoS en *Pseudomonas* es menos importante para contender al estrés general y tiene papeles más específicos relacionados a la virulencia y colonización.

1.4 El proceso de enquistamiento en *A. vinelandii* y la desecación.

El enquistamiento se produce de manera natural en cultivos que se encuentran en fase estacionaria tardía, aunque en estas condiciones, sólo un bajo

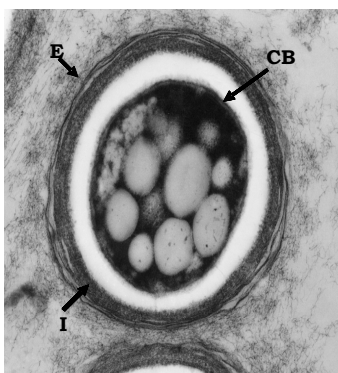


Fig. 2. Microscopía de quistes formados por *A. vinelandii*.
E: Exina. I: Intina. CB: Cuerpo Basal

porcentaje del cultivo llega a formar quistes maduros (Sadoff, 1975). Sin embargo, se puede inducir dicho proceso al transferir células vegetativas a un medio de cultivo con n-butanol (BB) o β -hidroxibutirato (BHB) como única fuente de carbono (Lin & Sadoff, 1968). El quiste maduro consiste de una célula contraída, conocida como el cuerpo central, el cual está cubierto por dos capas, una externa llamada exina y una interna llamada intina, las cuales están compuestas principalmente por alginato (Fig. 2) (Lin & Sadoff, 1969; Hitchins & Sadoff, 1970). El contenido lipídico de las

célula enquistadas es casi el doble que el de las células vegetativas. El sustrato para la síntesis de estos compuestos es el PHB y más del 80% de estos productos son los alquilresorcinoles y alquilpironas (Reush & Sadoff, 1981).

La fijación de nitrógeno cesa una vez que inicia el proceso de enquistamiento, de modo que todas las moléculas que contienen nitrógeno lo extraen del recambio y degradación de proteínas y ácidos nucleicos existentes (Ruppen *et al.*, 1983). Estos incluyen la síntesis de proteínas encontradas en la exina, intina, enzimas involucradas en la gluconeogénesis así como el RNAm que codifica para aquellas proteínas específicas de enquistamiento y para la subsecuente germinación (Hitchins & Sadoff, 1973).

Los quistes son células metabólicamente inactivas y son considerablemente más resistentes a condiciones de estrés que las células vegetativas. En condiciones de laboratorio, los quistes son viables por más de 10 años cuando se mantienen en suelo seco, lo que sugiere que la resistencia a la desecación puede ser una ventaja de sobrevivencia en la naturaleza (Vela, 1974). Otras propiedades de los quistes es la resistencia a la radiación ultravioleta, a la exposición de agentes quelantes como el EDTA, o a la ruptura mecánica (Socolofsky & Wyss, 1962).

La desecación es uno de los estreses más serios a los que se puede enfrentar la célula, la agregación irreversible proteína-proteína ocurre como resultado de la falta de agua. Estos cambios en la mayoría de los casos conducen a la muerte celular, ya que la mayoría de los organismos tienen una limitada capacidad para sobrevivir ante la carencia de agua (Alpert, 2006; Goyal *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2008). Los ejemplos mejor caracterizados que pueden resistir a la desecación incluyen a plantas, nemátodos, tardígrados, crustáceos e insectos (Alpert, 2006; Goyal *et al.*, 2005). En estos organismos, y similar a *A. vinelandii*, todas las reacciones bioquímicas y metabólicas están inactivas en el estado de desecación. Estos organismos son capaces de volver a tener una vida activa en

un periodo corto de tiempo después del contacto con el agua. En algunos de estos organismos, la anhidrobiosis, que es el estado de suspensión temporal de las actividades vitales que permiten a un organismos resistir a una larga desecación, es una parte obligada de su ciclo de vida (Crowe & Madin, 1974; Guidetti & Jonsson, 2002; Clegg, 2001, 2005). Mientras que los aspectos fisiológicos así como morfológicos de la anhidrobiosis han sido relativamente bien descritos, los mecanismos moleculares por los cuales les permite sobrevivir a la desecación aún no han sido bien caracterizados. Se ha reportado anteriormente que las proteínas de choque térmico, o mejor conocidas como Hsp's por sus siglas en ingles (Heat shock proteins), tienen un alto impacto en los procesos celulares asociados con la tolerancia a la desecación en eucariontes. Dos proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, p26 y artemina, han sido encontrados en altas cantidades en los embriones enquistados de varios braquiópodos, y un gran número de datos sugieren que la actividad de chaperona de estas proteínas es un factor clave para la formación del quiste, para su viabilidad y resistencia a varios tipos de estrés, incluyendo la desecación (Clegg, 2001, 2005; Willsie & Clegg, 2001).

1.5 Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHsp's).

Las proteínas de choque térmico se encuentran distribuidas ampliamente en todos los reinos de la vida, su función es evitar el plegamiento incorrecto o agregación de proteínas sometidas a estrés. La expresión de las Hsp's es activada no sólo por altas temperaturas sino también por estrés oxidativo, falta de nutrientes, radiación ultravioleta, agentes químicos y desecación, entre otros (Vayssier & Polla, 1998). Estas proteínas se dividen en familias en base a su peso molecular y función. Las de alto peso molecular son Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular o sHsp's que van de 12 a 42 kDa (Buchner, 1996).

En la respuesta celular a estrés, las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular representan un componente central para la homeostasis de las proteínas en diferentes organismos. Las sHsp's actúan como chaperonas moleculares independientes de ATP que previenen la agregación de las proteínas ante un estrés (Arrigo & Landry, 1994; Vayssier & Polla, 1998; Haslbeck *et al.*, (1999). Estas proteínas se encuentran en la mayoría de los organismos. Miembros de esta familia comparten similitud en un dominio principal de 80 a 100 aminoácidos llamado α -cristalino, mientras que las regiones amino y carboxilo son pobremente conservadas (Kriehuber *et al.*, 2010). Inicialmente las sHsp's se asocian para formar dímeros que es la base a partir de la cual pueden formar oligómeros, encontrándose complejos que van de los 200 a los 800 kDa (Walter & Buchner, 2002).

Dentro de las tres regiones que conforman a las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, se ha documentado que el dominio α -cristalino está implicado en el contacto subunidad-subunidad para formar oligómeros, además de tener la actividad de chaperona que se da a través de interacciones hidrofóbicas con su sustrato (Kim *et al.*, 1998; Bova *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1999; Shroff *et al.*, 2000). Por otra parte, la pérdida o modificación de la región C-terminal disminuye la función y reduce la solubilidad de estas proteínas y sus complejos con sus proteínas blanco (Smulders *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 2000). La región N-terminal promueve la oligomerización y la captura de las proteínas desplegadas (Boelens *et al.*, 1998).

La estructura de la proteína de choque térmico de bajo peso molecular de *Methanococcus jannaschii*, llamada Hsp16.5, ha sido determinada revelando un oligómero altamente ordenado compuesto de 24 subunidades con una abertura en el centro (Kim *et al.*, 1998). Por otra parte, la criomicroscopía electrónica de varias sHsp's mostró que la estructura oligomérica puede ser definida o variable, conduciendo a la idea que la plasticidad estructural genera una baja especificidad

y permite la unión a diferentes proteínas blanco (Haley *et al.*, 2000; Datta & Rao, 2000).

En el caso de Hsp16.5 de *M. jannaschii*, se ha propuesto que durante el proceso de ensamblaje de las esferas, ciertas proteínas o RNA que son necesarios para la sobrevivencia de la célula sometida a estrés quedan atrapadas dentro o sobre la superficie de la esfera (Kim *et al.*, 1998). Otra mecanismo por el cual se propone pueden llevar a cabo su función es que la forma oligomérica de las sHsp's puede no ser necesaria para la actividad de chaperona, sino que es un estado de almacenaje de estas proteínas las cuales pueden ser desensambladas rápidamente en respuesta al estrés (Fig. 3).

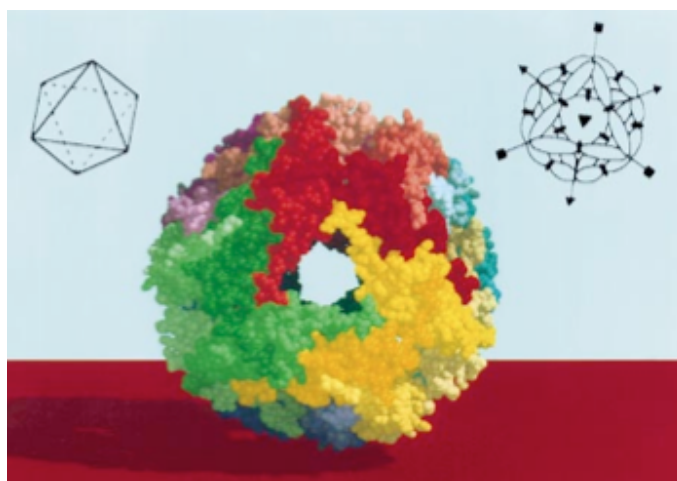


Fig. 3. Complejo de 24 subunidades de Hsp16.5 de *M. jannaschii* (Kim *et al.*, 1998)

1.5.1 Regulación de la expresión de las sHsp's

Los mecanismos reguladores de la expresión de las sHsp's son muy diversos, aunque en la mayoría de los casos ocurren a nivel de transcripción. En eucariontes, la expresión elevada de los genes de choque térmico es debida a la activación transcripcional. Con algunas modificaciones, el principio general es conservado en levaduras, vertebrados y plantas. En resumen, ante un aumento de la temperatura se activa el factor de la transcripción de choque térmico (HSF) que

es capaz de unirse a una secuencia en la región promotora de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico, esta región es llamada Elemento de Choque Térmico (HSE) (Nover & Scharf, 1997; Morimoto, 1998).

La regulación de las proteínas de choque térmico en arqueas no ha sido bien caracterizada. Se propone que puede ser parecido a la que se da en los eucariontes (Bell & Jackson, 1998; Soppa, 1999). Sin embargo, las arqueas no poseen un HSF identificable ni un HSE en la región promotora de los genes de choque térmico; además los elementos reguladores para la activación de las proteínas de choque térmico descritos en bacterias también están ausentes en los genomas de las arqueas. Un ejemplo de regulación en arqueas se ha documentado en *Haloferax volcanii*, en el cual el gen *cct1* que es inducible por calor, requiere sólo una secuencia de 12 pb río arriba de la caja TATA para ser transcrito (Thompson & Daniels, 1998).

En bacterias, y particularmente en *E. coli*, la transcripción de la mayoría de los genes que codifican para proteínas de choque térmico depende del factor sigma 32 (RpoH) (Gross, 1996). La concentración celular de RpoH incrementa después de un aumento de la temperatura, inicialmente como resultado de una elevada traducción del RNAm de *rpoH* y posteriormente el incremento de su estabilidad. A temperaturas normales, RpoH es degradado rápidamente por FtsH. El operón *ibpAB*, el cual codifica para dos proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, pertenecen al regulón de sigma 32, sin embargo, *ibpB* puede ser transcrito también a partir de un promotor dependiente de sigma 54 (RpoN) (Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2001).

La regulación por factores sigma alternativos también ha sido descrita para *Legionella pneumophila*, en la cual el gen *gspA* es transcrito a partir de un promotor sigma 70 y de un promotor sigma 32 (Abu Kwaik & Engleberg, 1994; Abu Kwaik *et al.*, 1997). La inducción de la expresión de *gspA* causada por estrés y

durante la infección intracelular ocurre predominantemente a través del promotor sigma 32.

La expresión de las Hsp's también puede ser regulada a nivel postranscripcional. Regiones largas no traducidas en el 5' (5'UTRs) han sido encontradas en varios genes que codifican para sHsp's como es el caso de *hspA* de *Synechococcus vulcanus*. La transcripción regulada por temperatura de este gen es iniciada a partir de un promotor activado por sigma 70 (Roy & Nakamoto, 1998). Sin embargo, un mecanismo de regulación controlando la estabilidad del RNAm dependiente de la temperatura fue inferido a partir del hecho de que los transcritos de *hspA* de *S. vulcanus* son más estables a 63 que a 50°C. Sin embargo se desconoce qué factores podrían estar involucrados en este proceso. Se tiene evidencia que la 5'UTR de varias sHsp's que incluyen las de *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp y *Mesorhizobium loti* son regulados por el mecanismo tipo ROSE (Repression of heat shock gene expression). A temperaturas normales, la 5'UTR del RNAm de las sHsp's forma una estructura de tallo y asa que oculta el sitio de unión al ribosoma (RBS) y por lo tanto se bloquea la traducción (Narberhaus *et al.*, 1998; Nocker *et al.*, 2001). Esta estructura secundaria probablemente también promueve la degradación por las RNasas. Sin embargo, a altas temperaturas la estructura de tallo y asa del RNAm cambia, lo que permite el acceso del ribosoma al RBS iniciando la traducción y simultáneamente protegiendo al RNAm de la degradación.

CAPITULO 2: ANTECEDENTES.

2.1 Regulación de la biosíntesis de los polímeros por el sistema Gac-Rsm.

En *A. vinelandii*, el sistema GacS/A es un regulador positivo de la síntesis de alginato, PHB y AR's (Castañeda, 2000, 2001; Romero, 2012). Este sistema controla indirectamente la síntesis de estos polímeros de dos maneras. La primera

es a través de la regulación positiva que el sistema Gac ejerce sobre la expresión de RpoS (Castañeda *et al.*, 2001). Uno de los promotores del gen *algD*, el gen clave en la síntesis de alginato, así como uno de los promotores del operón *phbBAC* son dependientes de RpoS. En el caso de la síntesis de los alquilresorcinoles, RpoS controla la expresión de el activador del operón *arsABCD*, ArpR (Romero *et al.*, 2013). Sin embargo, el sistema Gac también controla la síntesis de los polímeros a través de la regulación que ejerce sobre el sistema Rsm (Manzo *et al.*, 2011; Hernandez-Eligio *et al.*, 2012).

En *A. vinelandii*, el sistema Rsm esta formado por la proteína RsmA, por un RNA no codificante de la familia RsmY y siete RsmZ's (1-7) que en conjunto controlan la síntesis de los polímeros (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). Se ha demostrado que RsmA es capaz de unirse *in vitro* al RNAm del gen *algD* y al RNAm del gen *phbR*, el activador de la transcripción del operón *phbBAC* (Manzo *et al.*, 2011; Hernandez-Eligio *et al.*, 2012); ambos RNAs contienen la secuencia de unión a RsmA, RUACARGGAUGU, que fue definida por SELEX (Dubey *et al.*, 2005). Esto conlleva a que el RNA no sea traducido y sea degradado rápidamente. En el caso de los AR's, se tiene evidencia que RsmA estaría implicado en regular post-transcripcionalmente a ArpR (Romero, 2012).

Se ha documentado que GacA es capaz de activar la transcripción de los 8 RNA's no codificantes del sistema Rsm (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). De esta manera, GacA al activar la expresión de los RNAs pequeños, evita que RsmA se una a sus genes blancos, *algD*, *phbR* e hipotéticamente a *arpR*, dejando libre el RNAm para que sea traducido (Fig. 4).

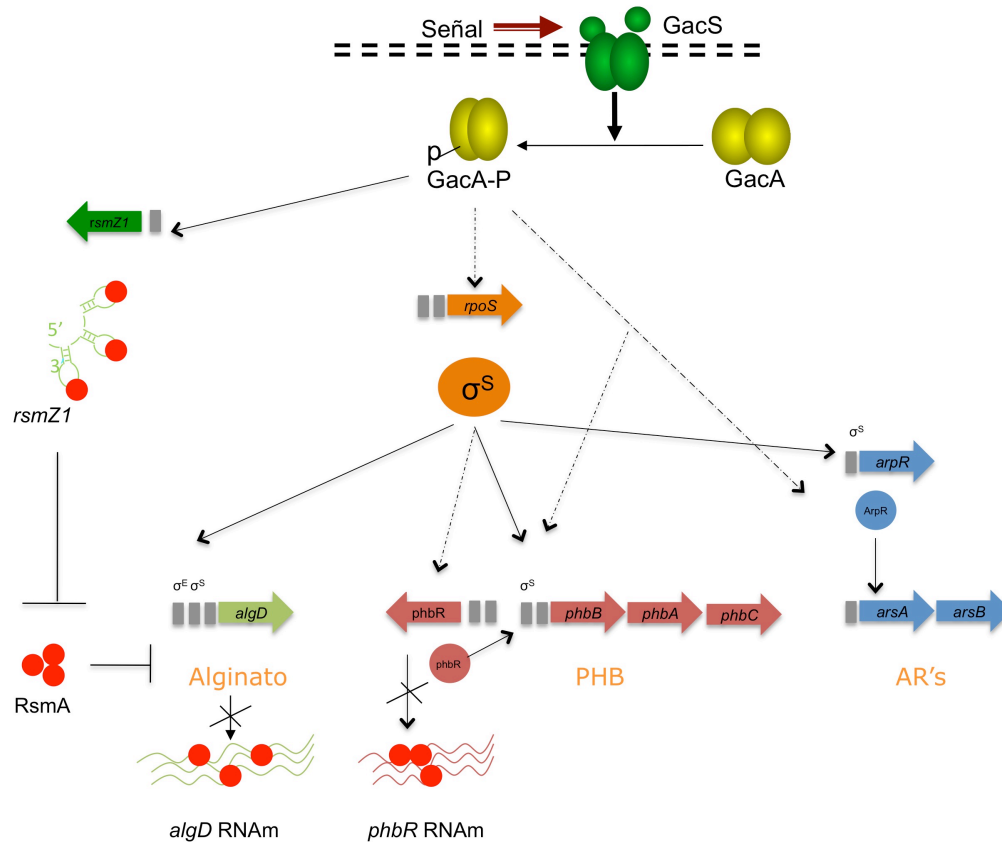


Fig. 4. Modelo de regulación del alginato, PHB y AR's a través de los sistemas de regulación global en *A. vinelandii*. Ver texto.

2.2 Regulación del enquistamiento en *A. vinelandii*.

Como anteriormente se mencionó, el quiste maduro está formado por el cuerpo central, que está rodeado por las capas de intina y exina compuestas principalmente por alginato. Los alquilresorcinoles forman parte de la membrana del cuerpo central, encontrándose también en la exina y en una menor cantidad en la intina mientras que el PHB se acumula dentro del quiste.

El alginato es el único polímero esencial para la formación de quistes resistentes a la desecación. Mutaciones que abaten su síntesis también abaten la formación de quistes (Campos *et al.*, 1996; Castañeda *et al.*, 2000). Además, la composición del alginato también es importante. Mutantes que tienen inactivados los 7 genes que codifican para las epimerasas o que tienen mutado cualquiera de

los genes que codifican para el sistema de secreción para las epimerasas, dan como resultado la formación de quistes que no pueden estructurar las capas de la intina y de la exina, además de que no son resistentes a la desecación (Gimmestad *et al.*, 2006; Steigedal *et al.*, 2008) (Fig. 5).

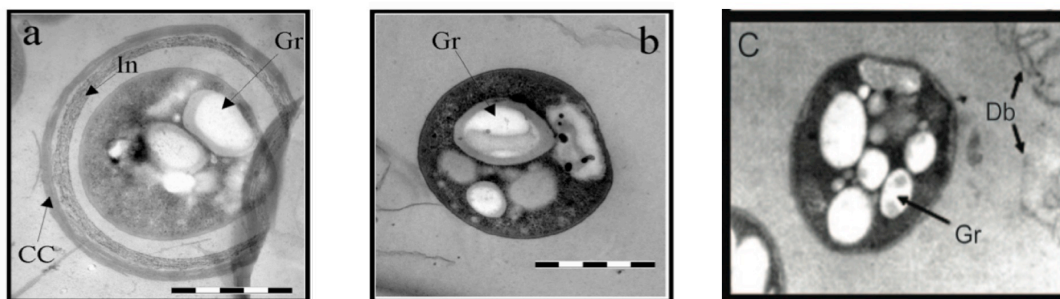


Fig. 5. Microscopia electrónica de los quistes formados por la cepa silvestre (a), la mutante en las siete epimerasas (b) y la mutante en el gen *eexD* (c). Tomado de Steigedal *et al.*, 2008 y Gimmestad *et al.*, 2006. GR= Granulos de PHB, In = intina, CC= cubierta del quiste, Db= restos de la cubierta del quiste.

Mutantes que no son capaces de producir AR's forman quistes con una morfología alterada en la exina: sin embargo estos quistes pueden resistir a la desecación, lo que indica que aunque estos lípidos fenólicos forman parte de la estructura de la exina no son esenciales para la resistencia a la desecación (Segura *et al.*, 2009). Esto también sucede con el PHB, mutantes que no pueden sintetizar este polímero pueden formar quistes resistentes a la desecación (Segura *et al.*, 2003).

2.3 RpoS en *A. vinelandii* y su relación en el enquistamiento.

En *A. vinelandii* se ha reportado que RpoS es necesario para la sobrevivencia a largo plazo, a estrés oxidativo además de contender ante la falta de carbono o nitrógeno (Sandercock & Page, 2008). Como anteriormente se mencionó, modula también la síntesis de alginato y PHB.

Una mutación en *rpoS* da como resultado la incapacidad de formar quistes resistentes a la desecación así como la incapacidad de sintetizar alquilresorcinoles (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011)(Tabla 2).

Tabla 2. Enquistamiento y síntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011).

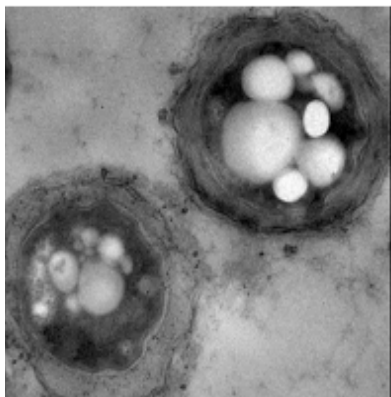
Cepa	Genotipo	Quistes resistentes a la desecación (%)	Alquilresorcinoles [ug (mg proteína) ⁻¹]
ATCC	Cepa silvestre	13.9 ±2.6	12.3±0.3
CNS59	<i>rpoS::Sp</i>	<0.0001	<0.01
CNS59/pSMrpoS	<i>rpoS::Sp/rpoS+</i>	8.2±1.9	5.1±0.07
CNS59/pBBR1MCS-2	<i>rpoS::Sp/pBBR1MCS-2</i>	<0.0001	<0.01

En las cepas ATCC 9046 y AEIV de *A. vinelandii*, la expresión de *rpoS* es regulada positivamente por GacA, la proteína reguladora de respuesta del sistema de doble componente GacS/GacA (Castañeda *et al.*, 2001); sin embargo, se desconoce si este control es ejercido de manera directa. Mutaciones en GacA dan como resultado la incapacidad de la bacteria para formar quistes resistentes a la desecación, esta incapacidad puede ser explicada por la falta de alginato ya que esta mutante tampoco puede producir el polímero, sin embargo, cuando se introduce a esta mutante un plásmido multicopia con *rsmZ1* se recupera la producción de alginato pero no la capacidad de enquistamiento (Manzo *et al.*, 2011), sugiriendo la participación de otros genes bajo el control de GacA que son esenciales para la formación de quistes, pudiendo ser uno de ellos RpoS.

Se ha demostrado que *rpoS* regula la expresión de ArpR, el regulador transcripcional tipo LysR que es expresado sólo durante el enquistamiento y que regula positivamente la transcripción del operón biosintético de los alquilresorcinoles *arsABCD* (Romero *et al.*, 2013). Aunque la mutación de *rpoS* no afecta la síntesis de alginato, los quistes producidos por una mutante en *rpoS* carecen de las capas intina y exina que recubren al quiste (Cocotl-Yañez *et al.*,

2011) (Fig. 6); por lo tanto, RpoS controla genes no identificados que son esenciales para la formación y sobrevivencia a la desecación de los quistes.

A.



B.

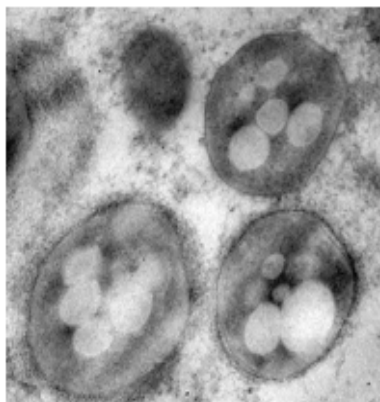


Fig. 6. Microscopia electrónica de los quistes formados por la cepa silvestre ATCC 9046 (A) y la mutante en *rpoS*, CNS59 (B) (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011)

CAPITULO 3: HIPÓTESIS

El factor transcripcional sigma RpoS es esencial en el proceso de enquistamiento ya que controla genes cuyos productos son esenciales para que se lleve a cabo dicho proceso.

CAPITULO 4: OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general

- Estudiar la función de RpoS en el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*.

4.2 Objetivos específicos.

- Identificar blancos de regulación de RpoS que son específicos de enquistamiento.
- Determinar la función de los blancos controlados por RpoS en la formación de quistes.

CAPITULO 5: MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.

Tabla 3. Cepas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia
A. vinelandii		
AEIV	Cepa silvestre	Svein Valla
AErpoS	AEIV que tiene la mutación rpoS::Sp	Este trabajo
AEhsp20	AEIV que tiene la mutación hsp20::Gm	Este trabajo
AEhsp625	AEhsp20 con el plásmido pMC625 co-integrado	Este trabajo
AEhsp20/pBMCA6	AEhsp20 que contiene el plásmido pBMCA6	Este trabajo
AEhsp20/pBBR1MCS-2	AEhsp20 que contiene el plásmido pBBR1MCS-2	Este trabajo
AErpoS/pBMCA6	AErpoS que contiene el plásmido pBMCA6	Este trabajo
AErpoS/pBBR1MCS-2	AErpoS que contiene el plásmido pBBR1MCS-2	Este trabajo
AEIpxA	AEIV que tiene la mutación a lpxA::Gm	Este trabajo
AErpoS/pSMrpoS	AEIV que contiene el plásmido pSMrpoS	Este trabajo
AErpoS/pBBR1MCS	AEIV que contiene el plásmido pBBR1MCS	Este trabajo
E. coli		
DH5 α	supE44 Δ lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan D. 1983
BL21 (DE3)	F- ompThsdS (r - m -)galdcM	Invitrogen
Plásmidos		
pJET1.2/blunt	Vector de clonación	ThermoScientific
pBBR1MCS-2	Vector de clonación con resistencia a Km	Kovach et al., 1995
pET21a	Vector de clonación y expresión	Novagen
pBSL97	Plásmido usado para obtener el casete de Kmr	Alexeyev et al., 1995
pBSL98	Plásmido usado para obtener el casete de Gmr	Alexeyev et al., 1995
pBSL190	Plásmido usado para obtener el casete de TCr	Alexeyev et al., 1995
pUC19	Vector de clonación	ThermoScientific
pSMrpoS	Plásmido que contiene el gen rpoS expresado bajo el promotor de kanamicina.	Cocotl-Yañez, et al., 2011.
pSMhsp20	pJET1.2/blunt que tiene clonado un fragmento de 1 kb que contiene el gen hsp20.	Este trabajo
pSMIpxA	pJET1.2/blunt que tiene clonado un fragmento 1.24 kb que contiene al gen lpxA.	Este trabajo
pSMhsp20::Gm	pSMhsp20 que contiene la mutación hsp20::Gm	Este trabajo
pSMIpxA::Gm	pSMIpxA que contiene la mutación lpxA::Gm	Este trabajo
pJETHsp20	pJET1.2/blunt que tiene clonado 1.8 kb y que contiene al gen hsp20-His6.	Este trabajo
pMC625	pJETHsp20 con el casete de Kmr	Este trabajo

pBMCA6	pBBR1MCS-2 que porta el gen His6-hsp20 bajo el control del promotor de Km	Este trabajo
pUMATcgusAT	Plásmido que contiene al gen reportero gusA usado para la construcción de la fusión transcripcional.	M. Castañeda
pUMATcgusAPT	Plásmido que contiene al gen reportero gusA usado para la construcción de la fusión traduccional.	M. Castañeda
pUMAhspT	pUMATcgusAT que porta la fusión transcripcional hsp20::gusA	Este trabajo
pUMAhspPT	pUMATcgusAPT que porta la fusión traduccional hsp20::gusA	Este trabajo
pMHsp20His6	pET21a que contiene al gen hsp20-His6	Este trabajo
pMChsp20	pJET1.2/blunt que contiene 572 pb correspondientes a la región promotora de hsp20	Este trabajo
pMCeexD	pJET1.2/blunt que contiene 1 kb correspondiente a la región promotora del gen eexD.	Este trabajo

Secuencia de Oligonucleótidos

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleotido	Secuencia (5'-3')
upHsp20	GAACCAGGCTGACCATGA
lwHsp20	GTTTCCGCTGCCGTGTG
upLpxA	CGAAGACAACGAAGTGGTCAA
lwLpxA	TGCCTTTCTTCCGTTGAGTC
HisAmhindhsp20	CAAAAGCTTATGCACCACCACCACCACGCTCAA GCAAATCAGAAT
HisAmbamhsp20	CACGGATCCTCCATCAGGGCATCAATG
upRT-hsp20	GACATCGTCGATCAGGACAA
dwRT-hsp20	CATCAGGTTGCCGTTACACA
fw-gyrA	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA
rev-gyrA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT
MelAF	TAGACCCGCACCGCCTGGAAACCT
MelAR	CATCGCCGCTGCTTGACG
uphspXbafus	CAATCTAGAGGCTGACCATGATGATTCAA
dwhspEcoR1	CAAGAATTCATGACCGGGCGAATTCTATT
dwhspPstI	CAACTGCAGTTGAGCCATGATTATTTCTC
Hsp20Bam	CAAGGATCCGCTCAAGCAAATCAGAAT
Hsp20Hind	CACAAGCTTATGGGTAGTGGCCTGGGTA
upHsp20rr	GATCAACGCAGAGAACCG
dwHsp20rr	TCCTCGAAAAGATGATCG
primHsp20	CCGCTCCCTGTTGACAG
UpEexDrr	GTCGGCAAGAATGCCTATTG
DwEexDrr	GGTCATGATAAGCGTGAGCA
eexDP1	CCGAAATGAAACTGCCTTTG

5.2 Condiciones de cultivo.

Los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en medio Burk-Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/l): K_2HPO_4 , 0.8; KH_2PO_4 , 0.2; Na_2SO_4 , 0.183; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.16; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0002; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.073. Para medio de inducción a enquistamiento y síntesis de AR's no se adiciona sacarosa y se suplementa con 0.2% de butanol (BB) o 0.2% de β -hidroxibutirato(BBHB). Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de 125 ml con 25 ml de medio o de 250 ml con 50 ml de medio en incubadora a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 30 h (fase estacionaria) o 120 h (para enquistamiento).

Las concentraciones de antibióticos a usar para *A. vinelandii* son (μ g/ml): Acido nalidíxico (Nal) 30, espectinomicina (Sp) 50, kanamicina (Km) 2, Gentamicina (Gm) 2. Los cultivos de *Escherichia coli* se crecieron a 37 °C en medio Luria (LB) cuya composición es la siguiente (g/l): bacto peptona, 10; extracto de levadura, 5; cloruro de sodio 10. La concentración de antibióticos en μ g/ml fueron: ampicilina (Amp) 10, Kanamicina 30 y Gentamicina (Gm) 10.

5.3 Manipulación de ácidos nucleicos y proteína.

Los procedimientos para la manipulación de DNA se realizaron según lo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. El DNA cromosomal usado como templado para los PCR's fue obtenido de la cepa silvestre AEIV. La secuencia de todos los oligonucleótidos usados en este trabajo es reportada en la tabla 4. La actividad β -glucuronidasa fue medida según lo reportado por Miller; 1 U corresponde a 1 nmol de *p*-nitrofenil- β -D-glucurónido hidrolizado por minuto por mg de proteína. La cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La preparación de las muestras para los ensayos de western blot así como la inmunodetección fue realizada según lo reportado (Hoidal *et al.*, 2000).

5.4 Procedimientos de proteómica.

Para los ensayos de proteómica, las células fueron colectadas a las 30 h en medio BS (fase estacionaria) y a las 120 h en medio BBHB (enquistamiento). Las proteínas celulares fueron obtenidas por sonicación a 24 kHz 1 min ON/1 min OFF por 5 ciclos a 4°C en presencia de inhibidor de proteasas (Roche). Para evitar la proteólisis, el aislamiento de las proteínas fue realizado usando la extracción con fenol (Hurkman & Tanaka, 1986). Las pastillas celulares fueron secadas y resuspendidas como previamente se reportó (Encarnación *et al.*, 2003), ésto con la finalidad de solubilizar y obtener las proteínas completamente desnaturalizadas y reducidas. Antes de la electroforesis, las muestras fueron mezcladas con 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 2 mM tributil forfina (TBP), 2% de anfolitos y 60 mM de ditiotreitól (DTT). Los métodos para la preparación de la muestra, electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) y análisis de las imágenes fueron realizados como previamente se describió (Encarnación *et al.*, 2003). Se usaron anfolinas con un rango de pH de 3 a 10 enriquecidos de 4 a 8 para la primera dimensión. La separación en la segunda dimensión fue realizada en geles de poliacrilamida al 12%. Aproximadamente 500 mg de proteína total fueron cargados en la primera dimensión. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue G.250. Los puntos de todas las proteínas de los geles fueron detectados a una resolución de 127 x 127 mm usando el sistema de análisis imagen PDI y el software PD-Quest. El punto de corte para la selección de las proteínas fueron aquellas que mostraron un cambio en al menos 2 veces de su expresión. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los puntos seleccionados fueron cortados a partir de los geles de 2D teñidos con Coomassie, posteriormente fueron reducidos, alquilados, digeridos y automáticamente transferidos al sistema MALDI-TOF Bruker Daltonics, Autoflex. Los espectros fueron externamente calibrados usando un péptido estándar de calibración (Bruker Daltonics 206095). El servidor de búsqueda MASCOT server 2.0 fue usado para comparar las huellas obtenidas contra *A. vinelandii*. Las proteínas aceptadas fueron aquellas que tuvieran un score mayor a 50 y un $p < 0.05$.

5.5 Construcción de la mutante en *hsp20* y en *lpxA*.

Para generar las mutantes en *hsp20* y en *lpxA* se realizó PCR usando los oligos upHsp20/lwHsp20 y upLpxA/lwLpxA para amplificar un fragmento de 1 kb y 1.24 kb que contienen al gen completo de *hsp20* y *lpxA* respectivamente. Estos fragmentos fueron ligados al vector pJET1.2/blunt obteniendo los plásmidos pSMhsp20 y pSMlpxA. El plásmido pSMhsp20 fue digerido con SphI mientras que el plásmido pSMlpxA con SacII, posteriormente fueron rellenados con la enzima Klenow Enzyme (ThermoScientific) y se les ligó el casete de resistencia a gentamicina que fue escindido del vector pBSL97 con la enzima SmaI. Cada uno de los plásmidos fueron usados para transformar a la cepa AEIV. Se seleccionó una transformante resistente a gentamicina para *hsp20* (AEhsp20) y para *lpxA* (AElpxA). A las cepas obtenidas se les realizó PCR utilizando los oligos upHsp20/lwHsp20 y upLpxA/lwLpxA para confirmar que portaran la mutación y la ausencia de copias silvestres.

5.6 Complementación de las cepas AEhsp20 y AErpoS con *hsp20*.

Se amplificó por PCR un fragmento de 591 pb que corresponde al gen *hsp20* sin el primer y último codón. El PCR se realizó usando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoScientific) y los oligos Hsp20Bam/Hsp20Hind. El producto de PCR fue digerido con las enzimas BamHI y HindIII y se ligó al plásmido pET-21a para dar como resultado el plásmido pMHsp20His, el inserto fue secuenciado para confirmar que el gen *hsp20* clonado estuviera libre de mutaciones. Este plásmido fue digerido con las enzimas Scal y BglII para escindir un fragmento de 1.8 kb que contiene al gen *hsp20* con una etiqueta de seis histidinas en el C-terminal. Este fragmento fue clonado en el vector pJET1.2/blunt, dando como resultado el plásmido pJetHsp20. Posteriormente el plásmido pJetHsp20 fue digerido con Scal y rellenado con la enzima Klenow. Se ligó el casete de kanamicina liberado con SmaI del vector

pBSL97 dando como resultado el plásmido pMC625 el cual es incapaz de replicarse en *A. vinelandii*. La cepa AEhsp20 fue transformada con el plásmido pMC625 esperando un evento de co-integración al cromosoma dando como resultado la cepa AEhsp625.

Por otra parte, el gen *hsp20* sin promotor y flanqueado con los sitios para las enzimas de restricción HindIII y BamHI y con una etiqueta de seis histidinas en el N-terminal fue amplificado por PCR utilizando el primer HisAmhindhsp20, que incluye la secuencia de la etiqueta de histidinas, y el primer HisAmbamhsp20. El producto de PCR fue digerido y clonado en el plásmido pBBR1MCS-2, dando como resultado el plásmido pBMCA6, que lleva el gen *hsp20* bajo el control del promotor de kanamicina. El plásmido pBMCA6, que es capaz de replicarse en *A. vinelandii*, fue transferido por conjugación a la cepa AEhsp20 y AErpoS dando como resultado las cepas AEhsp20/pBMCA6 y AErpoS/pBMCA6, respectivamente. El plásmido vacío, pBBR1MCS-2, fue conjugado en las mismas cepas el cual fue usado como control negativo.

5.7 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).

La expresión de *hsp20* fue medida por qRT-PCR como previamente fue reportado (Noguez *et al.*, 2008). Para la extracción de RNA, los cultivos fueron crecidos en medio BS o medio BB. Las células fueron colectadas a las 30 h para las condiciones vegetativas y a las 120 h para las condiciones de enquistamiento. Los oligos usados para los ensayos de qRT-PCR fueron: upRT-hsp20/dwRT-hsp20 para la expresión de *hsp20* y fw-gyrA/rev-gyrA para la expresión de *gyrA*. El tamaño de los amplímeros fue de 100 pb y la expresión de *gyrA* fue usado como control interno para normalizar los resultados. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los datos son presentados como cambio en los niveles del RNAm (media $\pm$ SD) de la cepa mutante comparada con la cepa silvestre.

5.8 Análisis de “Primer extension”.

Se amplificó un fragmento de 572 pb que corresponde a la región reguladora de *hsp20* (nucleótidos -326 a + 246) usando los oligos upHsp20rr y dwHsp20rr. Para el ‘Primer extension’ del operón *eexDEF* se amplificó un fragmento de 1 kb que corresponde a la región reguladora de *eexDEF* usando los oligos UpEexDrr/DwnEexDrr. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt, dando como resultado los plásmidos pMChsp20 y pMCEexD. Por otra parte, se extrajo RNA total de células de la cepa silvestre AEIV crecida 30 h en medio líquido BS o 120 en BB. El ensayo de ‘primer extension’ fue llevado a cabo a 42°C usando 50 µg de RNA, transcriptasa reversa AMV (Roche) y el oligo primHsp20 o el oligo eexDP1. Los cDNAs fueron marcados con (γ -³²P)-dATP usando la enzima polinucleótido cinasa (Roche). Posteriormente para realizar la secuencia nucleotídica se utilizó el kit Termo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit de USB siguiendo las instrucciones del fabricante, usando el mismo oligo y el plásmido pMChsp20 o pMCEexD como templado.

5.9 Expresión de Hsp20-His6.

El plásmido pMHsp20His fue transformado en la cepa BL21 de *E. coli* (Invitrogen). La expresión de Hsp20-His6 fue inducida con IPTG a una concentración de 0.5 mM. Después de 4 h de la inducción se realizó la purificación de la proteína a 4°C bajo condiciones nativas siguiendo las indicaciones del fabricante (Qiagen). La correcta expresión de la proteína fue verificada a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% que reveló la presencia de una banda de 23 kDa que corresponde a la proteína Hsp20 (datos no mostrados).

5.10 Ensayos de Pull-Down.

Los ensayos de Pull-Down fueron realizados mezclando la fracción soluble de la cepa de *E. coli* BL21/pMHsp20His expresando la proteína Hsp20 y la

fracción soluble de células enquistadas de la cepa silvestre AEIV o de la cepa AEhsp20. Como control negativo se usó la cepa BL21 que porta el plásmido vacío (pET21a) y la proteína Hsp20-His₆ purificada. Las pastillas celulares de la cepa BL21/pMHsp20His inducidas con 0.5 mM de IPTG, de la cepa BL21/pET21a, de la cepa AEIV y de la cepa AEhsp20 fueron resuspendidas en 900 µl de buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete tablets, Roche), a esta mezcla se le añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/ml. Las células fueron lisadas por sonicación tres veces por 15 segundos y los lisados fueron centrifugados 20 min a 13 000 RPM a 4°C. Posteriormente las fracciones solubles fueron mezcladas en una columna durante toda la noche a 4°C, las mezclas fueron: BL21/pMHsp20His con AEIV o AEhsp20 y BL21/pET21a con AEIV o AEhsp20. Posteriormente 250 µl de la resina de Níquel Ni-NTA (Qiagen) fue añadida a la columna y en agitación suave por 4 h a 4 °C. La resina con las proteínas unidas fue lavada dos veces con 2 ml del buffer de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0). Posteriormente las proteínas fueron eluidas cuatro veces con 500 µl del buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0). Finalmente, las muestras eluidas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Las bandas que aparecieron en la interacción de BL21/pMHsp20His con AEIV o AEhsp20, pero no en los controles negativos, fueron cortadas y secuenciadas para identificar las proteínas.

5.11 Construcción de la fusión transcripcional y traduccional de *hsp20*.

Para generar la fusión transcripcional *hsp20::gusA* se amplificó por PCR, usando los oligos uphspXbafus/dwhspEcoR1, un fragmento de 177 pb que corresponde a la región promotora del gen *hsp20*. El fragmento de PCR fue digerido con las enzimas XbaI y EcoRI y fue clonado en el vector pUMATcgusAT previamente digerido con las mismas enzimas, esto dio como resultado el plásmido pUMAhsp20T. Por otra parte, para generar la fusión traduccional

hsp20::gusA se amplificó un fragmento de 247 pb, usando los oligos *uphspXbafus* y *dwhspPstI*, que incluye la región promotora, el Shine Dalgarno y tres codones de *hsp20*. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *XbaI* y *PstI* y clonado en el vector *pUMAgusAPT* previamente digerido con las mismas enzimas, esto dio como resultado el plásmido *pUMAhsp20PT*.

Los plásmidos *pUMAhsp20T* y *pUMAhsp20PT* fueron usados para transformar la cepa silvestre AEIV. Una transformante resistente a tetraciclina fue seleccionada para cada fusión obteniendo las cepas *AEhsp20T* y *AEhsp20PT* respectivamente. La integración de la fusión transcripcional y traduccional al cromosoma fue confirmado por PCR utilizando el oligo *uphspXbafus* y el oligo *gusArev*. La ausencia de copias silvestres de *melA* fue confirmado por PCR usando los oligos *melAFw/melARv*.

5.12 Resistencia a la desecación y análisis por microscopia electrónica.

Las cepas a enquistar fueron crecidas en medio BS líquido durante 48 h, posteriormente las células fueron colectadas y lavadas e inmediatamente transferidas a placas suplementadas con butanol para inducir a enquistamiento. El ensayo de resistencia a la desecación fue llevado a cabo según lo reportado (Campos *et al.*, 1996). Para ello, las células fueron crecidas en medio BS por 48 h, posteriormente transferidas a placas suplementadas con n-butanol al 0.2% como única fuente de carbono. Las placas fueron incubadas por 5 días a 30 °C. Aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias de cada cepa fueron colocadas en filtros Milipore e incubadas por 5 días a 30 °C. Las células desecadas (quistes) fueron resuspendidas en 1 ml de $MgSO_4$ y se realizó cuenta viable para determinar el número de quistes resistentes a la desecación. La microscopia electrónica fue llevada a cabo como previamente lo describió Mejía-Ruiz *et al.*, 1997.

6.1 Expresión diferencial de proteínas de la cepa silvestre AEIV en fase de enquistamiento comparada con la fase vegetativa.

The figure consists of two 2D gel electrophoresis images side-by-side. The left image is labeled 'AEIV células vegetativas' and the right image is labeled 'AEIV células enquistadas'. Both images have a vertical axis on the left with numerical markers at 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, and 140. The horizontal axis at the bottom is labeled 'pH 8' on the left and 'pH 4' on the right. Proteins are represented as dark spots on a light background. In the left image, several spots are numbered: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, and 20. In the right image, the same spots are numbered, but spot 1 is significantly larger and darker than in the left image. Spot 16 is also present in both images.

Los resultados mostraron un cambio significativo en el patrón de expresión. Visualmente se detectó que se reduce la expresión de al menos 20 proteínas en células enquistadas, mientras que 22 aumentan su expresión en esta condición. Del total de los 42 puntos se identificaron 20, los cuales se anotan en la tabla 5.

Tabla 5. Proteínas identificadas por MALDI-TOF a partir del análisis de los proteomas de la cepa silvestre en condiciones de fase vegetativa y enquistamiento.

Punto No.	Proteína	Masa (kDa)/pI (teórico)	Cambio en la expresión en la cepa silvestre en células vegetativas vs células enquistadas.	Anotación en el genoma.
1	Heat shock protein, Hsp20	22.2/5	10.4	Avin25770
2	C-5 epimerasa de manurónico, AlgE1	147.1/3.96	ND ^a	Avin51190
3	Proteína unidora de calcio	119.6/4.1	ND ^a	Avin51240
4	C-5 epimerasa de manurónico, AlgE6	90.1/4.21	ND ^a	Avin51230
5	Proteína exportadora del polisacárido	36.6/4.54	ND ^a	Avin05380
6	Proteína unidora de cationes, Hemeritrina.	18/5.34	ND ^a	Avin00300
7	Proteína unidora de cationes, Hemeritrina.	18/5.34	ND ^a	Avin00300
8	Proteína hipotética.	28.5/5.52	ND ^a	Avin34590
9	Proteína de biosíntesis del polisacárido, WbpO.	47.4/5.98	ND ^a	Avin29910
10	Proteína de membrana externa para la biosíntesis de alginato, AlgJ.	56.0/4.72	ND ^a	Avin10930
11	3-oxoácido CoA-transferasa	23.3/4.76	ND ^a	Avin51600
12	3-oxoácido CoA-transferasa, subunidad B.	21.6/4.73	ND ^a	Avin17560
13	Fasina, PhbP.	20.3/4.93	ND ^b	Avin23670
14	Proteína hipotética conservada.	20.8/4.9	ND ^b	Avin50800
15	3-oxoácido CoA-transferasa, subunidad A.	25.2/5.44	3.83	Avin17570
16	3-oxoácido CoA-transferasa.	25.4/5.54	5.76	Avin51610
17	Adenilato cinasa, Adk.	23.39/6.08	ND ^a	Avin39280
18	Nitrogenasa de Hierro, NifH.	31.51/4.68	ND ^b	Avin01380
19	Nitrogenasa Hierro-Molibdeno, cadena	55.2/6.0	-2.59	Avin01390

20	alfa, NifD. Nitrogenasa Fierro-Molibdeno, cadena beta, NifK.	59.4/6.0	-5.53	Avin01400
----	--	----------	-------	-----------

^a El cociente no pudo ser medido porque el punto de la proteína no fue detectado en la cepa silvestre en condiciones vegetativas. ^b El cociente no pudo ser medido porque el punto de la proteína no fue detectado en la cepa silvestre en condiciones de enquistamiento.

6.2 Análisis del proteoma de la cepa silvestre AEIV y la mutante en *rpoS*, AErpoS.

Con la finalidad de encontrar qué proteínas identificadas en el proteoma de los quistes de la cepa silvestre que aumentaron su expresión (Fig. 7), son reguladas por RpoS y participan en el proceso de enquistamiento, se realizó el proteoma de la mutante en *rpoS* (AErpoS) en ambas condiciones y se comparó con el de la cepa silvestre. Como se muestra en la figura 8, hay al menos 9 proteínas cuya expresión disminuye significativamente en la mutante en *rpoS*.

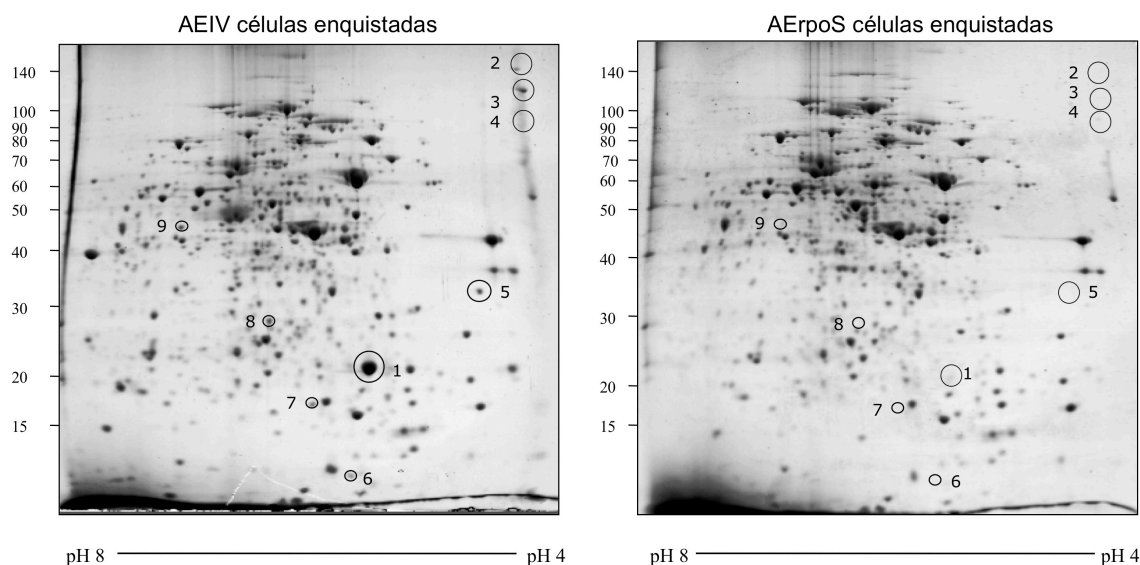


Fig. 8. Electroforesis de dos dimensiones de células de la cepa silvestre y de la mutante en *rpoS* en enquistamiento. Nueve proteínas que se detectan sólo en fase de enquistamiento en la cepa silvestre (círculos) no son detectadas en la mutante en *rpoS*.

Estas proteínas se enlistan en la tabla 6: una proteína de 22 kDa la cual fue la más abundante en las células enquistadas de la cepa silvestre. Esta proteína fue identificada como una proteína de choque térmico de bajo peso molecular la cual fue nombrada como Hsp20. Dos epimerasas de alginato, AlgE1 y AlgE6, cuya función esta relacionada con el proceso de enquistamiento (Steigedal *et al.*, 2008); una proteína unidora de calcio codificada dentro del locus de las epimerasas; dos proteínas involucradas en la biosíntesis y exporte de polisacáridos; una proteína anotada como hemeritina, la cual fue detectada dos veces con diferente peso molecular y diferente punto isoeléctrico lo que sugiere una posible modificación post-traducciona; y finalmente una proteína hipotética.

Table 6. Proteínas identificadas por MALDI-TOF hipotéticamente reguladas de RpoS.

Punto No.	Proteína	Masa (kDa)/pI (teórico)	Cambio en la expresión en la cepa AErpoS vs cepa silvestre en condiciones de enquistamiento	Anotación en el genoma.
1	Heat shock protein, Hsp20	22.2/5	ND ^a	Avin25770
2	C-5 epimerasa de manurónico, AlgE1	147.1/3.96	ND ^a	Avin51190
3	Proteína unidora de calcio.	119.6/4.1	ND ^a	Avin51240
4	C-5 epimerasa de manurónico, AlgE6	90.1/4.21	ND ^a	Avin51230
5	Proteína exportadora del polisacárido.	36.6/4.54	ND ^a	Avin05380
6	Proteína unidora de cationes, Hemeritina.	18/5.34	-1.3	Avin00300
7	Proteína unidora de cationes, Hemeritina.	18/5.34	ND ^a	Avin00300
8	Proteína hipotética.	28.5/5.52	ND ^a	Avin34590
9	Proteína de biosíntesis del polisacárido, WbpO.	47.4/5.98	-4	Avin29910

^a El cociente no pudo ser medido debido a que el punto de la proteína no fue detectada en la mutante en *rpoS*.

6.3 RpoS regula una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (Hsp20) que es esencial para la sobrevivencia del quiste en la desecación.

6.3.1 Hsp20 en *A. vinelandii*.

Debido a la abundancia de Hsp20 en las células enquistadas, elegimos esta proteína para investigar su regulación por RpoS y su función en el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*.

El gen que codifica para Hsp20 de *A. vinelandii* tiene un tamaño de 597 pb y está localizado entre los genes que codifican para una oxidoreductasa y una chaperona de 60 kDa llamada GroL, ambos genes en dirección contraria a la transcripción de *hsp20* (Fig. 9).

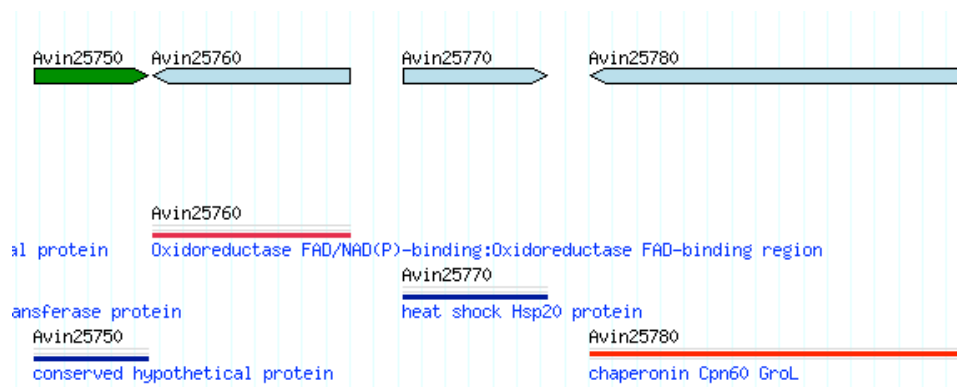


Fig. 9. Localización genética del gen *hsp20* en *A. vinelandii*.

La secuencia de aminoácidos de Hsp20 de *A. vinelandii* contiene el dominio α -cristalino que es típico de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular y comparte un 29% de identidad con Hsp16.5 de *Methanococcus jannaschii* cuya estructura ya ha sido determinada por cristalografía (Kim *et al.*, 1998). Esta identidad es compartida solamente en la región α -cristalina entre ambas proteínas y no en las regiones amino y carboxilo (Fig. 10).

```

A.vin: 75  MPAVDIVDQDKAILISAELPGMDEQNIELKVCNGLMLKGEKREEREENSQGLYLSE-S 133
           MP + I++ D+ I + A LPG+++++I L      L ++ ++      S+ + SE
M.jan: 43  MP-ISIIEGDQHIKVIAWLPGVNKEDIILNAVGDITLEIRAKRSPLMITESERIYSEIPE 101

A.vin: 134 YGAFQRSFALPDSVDADNIEAHFDKGVLTITLTPK 167
           R+  LP +V  +N  A F+ GVL++ LPK
M.jan: 102 EEEIYRTIKLPATVKEENASAKFENGVLVILPK 135

```

Fig. 10. Alineamiento de la secuencia de Hsp20 de *A. vinelandii* y *M. jannaschii*.

6.3.2 El gen *hsp20* es transcrito a partir de un promotor dependiente de RpoS.

Como se muestra en la figura 8, los niveles de la proteína Hsp20 son elevados en condiciones de enquistamiento y significativamente reducidos en células vegetativas o en la mutante en *rpoS*. Para confirmar si RpoS regula al gen *hsp20* se cuantificó el transcrito de *hsp20* por qRT-PCR para determinar el efecto de la mutación *rpoS*::Sp en la expresión de *hsp20* medido en condiciones de fase vegetativa (BS) y enquistamiento (BB). Los ensayos de qRT-PCR mostraron que la mutación en *rpoS* disminuye la expresión de *hsp20* en ambas condiciones (Fig. 11).

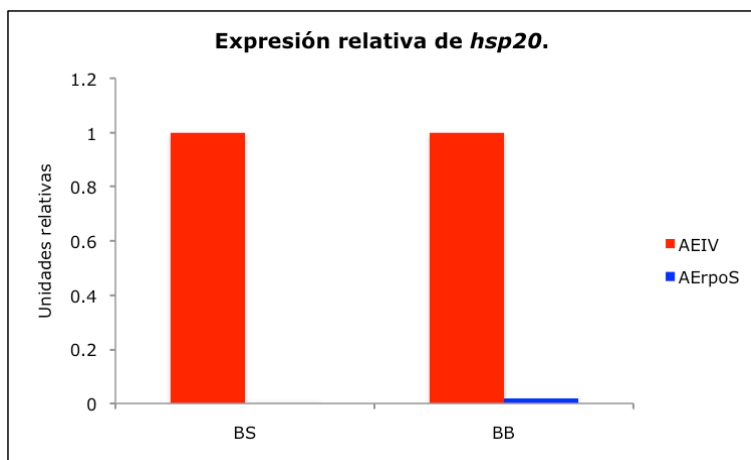


Fig. 11. Expresión relativa de *hsp20* en fase vegetativa (BS) en la cepa silvestre (AEIV) (1.0) y en la mutante en *rpoS* (AErpoS) (0.0084 ± 0.0035) y en condiciones de enquistamiento en la cepa silvestre (1.0) y en la mutante en *rpoS* (0.02 ± 0.02).

Se determinó el sitio de inicio de la transcripción de *hsp20* a través de 'primer extension'. Debido a que la proteína Hsp20 es expresada tanto en fase

vegetativa como en enquistamiento, realizamos el ensayo en ambas condiciones. Como se muestra en la figura 12-A, se ubicó un único sitio de inicio de la transcripción 120 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción. Este transcrito no fue detectado en la mutante en *rpoS*, sugiriendo que este promotor es reconocido por este factor sigma. Además, la región -10 del promotor comprende la secuencia CTATCCT y no parece haber consenso para la caja -35 (Fig. 12-B). Estas características son típicas de promotores dependientes de RpoS. Estos datos nos permiten concluir que el gen *hsp20* es transcrito a partir de un promotor dependiente de RpoS.

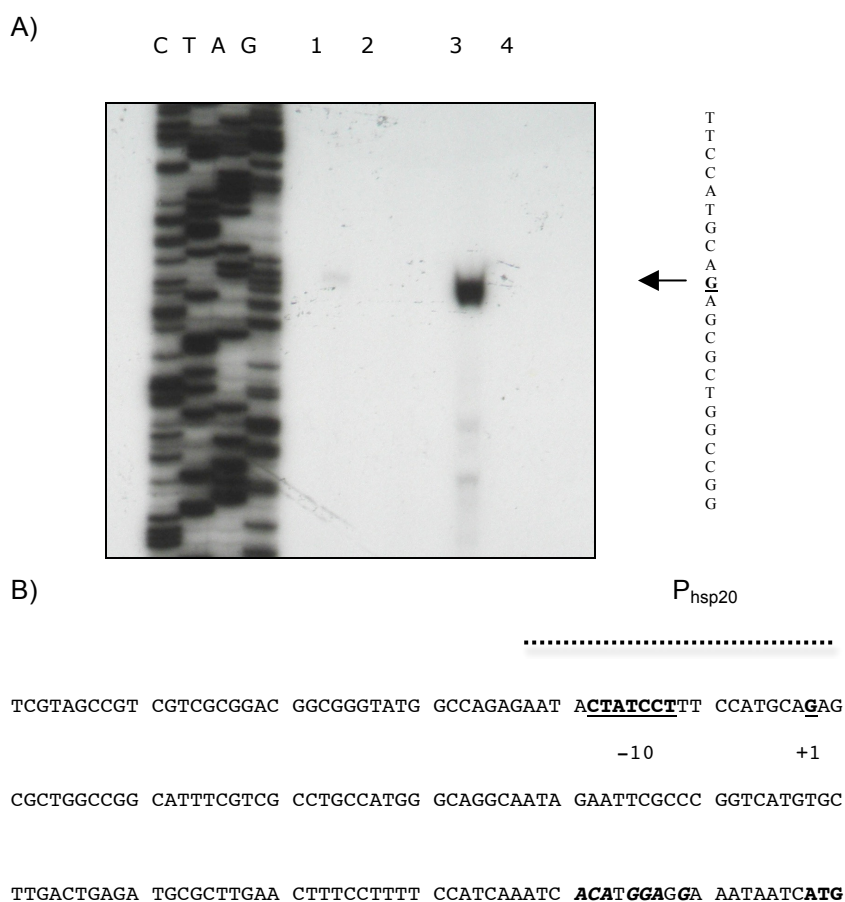


Fig. 12. A) Identificación del sitio de inicio de la transcripción de *hsp20* por “primer extension” usando RNA total aislado de la cepa silvestre en condiciones de enquistamiento (carril 1) y vegetativas (carril 3) y de la cepa AErpoS en condiciones de enquistamiento (carril 2) y vegetativas (4). B) Secuencia del gen *hsp20*, el sitio de inicio de la transcripción (+1), la caja -10 y el codón de inicio de la traducción se muestran en negritas y subrayado. En negritas y en cursivas, el posible sitio de unión de RsmA.

Los niveles observados del transcrito de *hsp20* en el ensayo de “primer extension” son mas altos en condiciones vegetativas que en condiciones de enquistamiento. Este resultado fue inesperado, ya que el análisis del proteoma mostró que los niveles de la proteína eran mas altos en células enquistadas que en células en fase vegetativa. Por lo tanto, medimos y comparamos los niveles del transcrito de *hsp20* en condiciones de enquistamiento y en condiciones vegetativas a través de ensayos de qRT-PCR. Los resultados, semejantes al ensayo de primer extension, muestran que el nivel del RNAm de *hsp20* es menor en condiciones de enquistamiento (Fig. 13). Estos datos sugieren una posible regulación post-transcripcional en la que la traducción de *hsp20* parece ser inhibida en condiciones vegetativas.

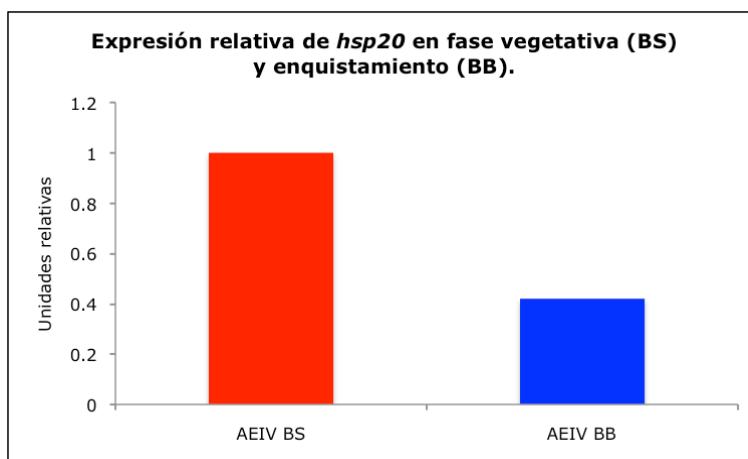


Fig. 13. Expresión relativa de *hsp20* en fase vegetativa (1) y en condiciones de enquistamiento (0.42 ± 0.23).

6.3.3 Expresión de *hsp20* en condiciones vegetativas y en enquistamiento.

El análisis del proteoma y los datos obtenidos por qRT-PCR así como el primer extension sugirió que la transcripción de *hsp20* es mayor en fase vegetativa pero su traducción es favorecida en condiciones de enquistamiento. Evaluamos esta hipótesis utilizando una fusión transcripcional y una fusión traduccional de *hsp20* fusionada al gen reportero *gusA* integrada al cromosoma dentro del locus *melA*, lo que generó las cepas AEhspT y AEhspPT.

Utilizando la cepa AEhspT se midió la transcripción de *hsp20* a través del tiempo, para el caso de la fase vegetativa (BS) fue en intervalos de 12 horas hasta las 48 horas mientras que para la fase de enquistamiento (BB) se realizó hasta las 120 horas (5 días). Como se muestra en la figura 14, *hsp20* se transcribe en ambas condiciones, sin embargo, la transcripción a las 120 h en fase de enquistamiento (BB) es casi la mitad de la que se da a las 30 h en fase vegetativa (BS) (valores señalados por las flechas), estos datos confirman los obtenidos por 'primer extension' y qRT-PCR.

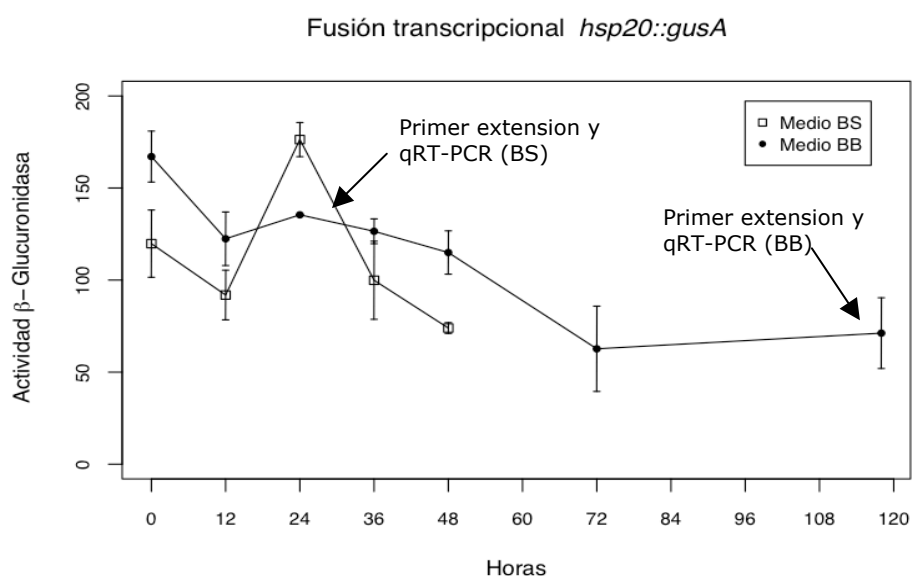


Fig. 14. Transcripción de *hsp20* en fase vegetativa (recuadros blancos) y en enquistamiento (círculos negros).

Para medir la traducción se utilizó la cepa AEhspPT tomando muestras en los mismos tiempos que para la fusión transcripcional. Como se muestra en la figura 15, aunque la traducción se da en ambas condiciones, se favorece en condiciones de enquistamiento. Estos datos apoyan los obtenidos en el proteoma, ya que la proteína Hsp20 es detectada en bajas concentraciones en fase vegetativa a las 30 h (tiempo en el que se tomó la muestra para el proteoma en fase vegetativa) mientras que en la fase de enquistamiento la concentración de proteína a las 120 horas es mayor (tiempo para el proteoma en fase de enquistamiento).

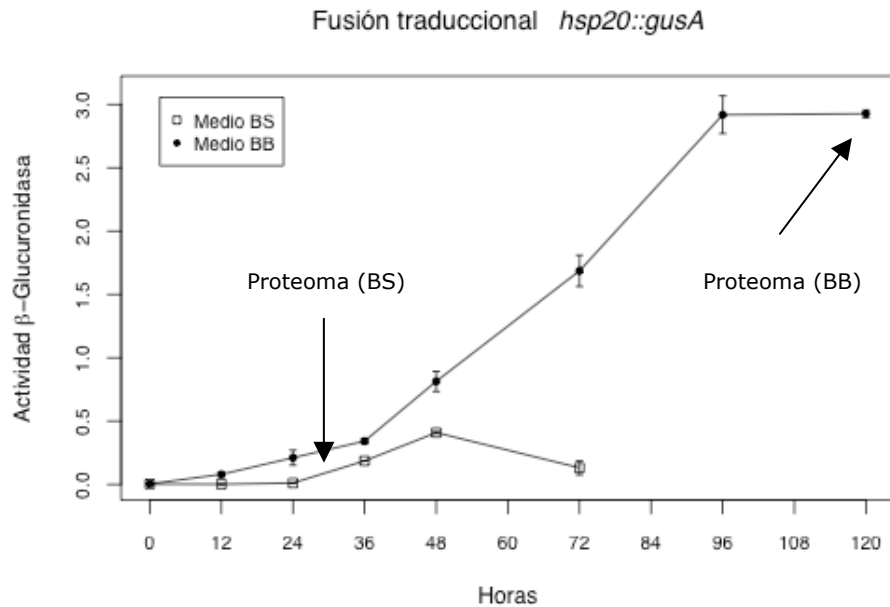


Fig. 15. Traducción de *hsp20* en fase vegetativa (recuadros blancos) y en enquistamiento (círculos negros).

Los resultados obtenidos con la fusión transcripcional y traduccional sugieren una represión de la traducción en fase vegetativa, que es liberada cuando las células entran a enquistamiento. Un sistema candidato en llevar a cabo este tipo de regulación es el sistema Rsm. Haciendo un análisis de la región reguladora de *hsp20* encontramos que existe una posible secuencia de reconocimiento de RsmA en el Shine-Dalgarno (Fig. 12-B y Fig. 16). Si esta regulación se da, queda por ser investigada.

ACTATCCTTT	CCATGCAGAG	CGCTGGCCGG	CATTTTCGTCG	CCTGCCATGG
GCAGGCAATA	GAATTCGCCC	GGTCATGTGC	TTGACTGAGA	TGCGCTTGAA
CTTTCCTTTT	CCATCAAATC	ACATGGAGGA	AATAATC ATG	
		III III I		
		RU ACARGGAUGU		

Fig. 16. Secuencia reguladora de *hsp20*, en rojo se muestra el alineamiento con la secuencia de reconocimiento de RsmA, subrayado la región -10 y el sitio de inicio de la transcripción y en negrita y subrayado el sitio de inicio de la traducción

6.3.4 La mutación en *hsp20* abate la resistencia a la desecación de los quistes.

Para determinar el papel de Hsp20 en el proceso de enquistamiento se generó la mutante AEhsp20. Para tal fin, se construyó el plásmido pSMhsp20 que porta el gen *hsp20* interrumpido con el casete de gentamicina (*hsp20::Gm*). La cepa AEIV fue transformada con este plásmido para obtener la cepa AEhsp20. El crecimiento y la producción de alginato de esta cepa en medio BS fue similar a la de la cepa silvestre.

Las cepas AEhsp20, AErpoS y la cepa silvestre AEIV fueron inducidas a enquistamiento transfiriendo células crecidas en BS líquido a placas suplementadas con butanol. Similar a la mutante en *rpoS*, la cepa AEhsp20 fue incapaz de producir quistes resistentes a la desecación (Tabla 7).

Tabla 7. Resistencia a la desecación en *A. vinelandii*.

Cepa	Descripción	Resistencia a la desecación (%)
AEIV	Cepa silvestre	13.9 ± 2.6
AErpoS	AEIV que porta la mutación <i>rpoS::Sp</i> .	<0.0001
AEhsp20	AEIV que porta la mutación <i>hsp20::Gm</i> .	<0.0001
AEhsp625	AEhsp20 complementada con <i>hsp20</i> en cromosoma.	21.8 ± 2.03
AEhsp20/pBMCA-6	AEhsp20 complementada con el gen <i>hsp20</i> en plásmido.	4.3 ± 0.5
AEhsp20/pBBR1MCS	AEhsp20 complementada con el plásmido pBBR1MCS.	<0.0001
AErpoS/pBMCA-6	AErpoS complementada con el gen <i>hsp20</i> en plásmido.	<0.0001
AErpoS/pBBR1MCS	AErpoS complementada con el plásmido pBBR1MCS.	<0.0001

Para confirmar que la incapacidad de resistencia a desecación de la mutante en *hsp20* fuera causada por la ausencia de la proteína Hsp20, se llevó a

cabo la complementación de la cepa AEhsp20. Se construyó el plásmido pMC625, el cual es incapaz de replicarse en *A. vinelandii* y porta una copia silvestre del gen *hsp20* etiquetado con seis histidinas en el carboxilo terminal. Dicho plásmido fue transformado en la cepa AEhsp20, para que ocurriera un evento de cointegración en el cromosoma, generando la cepa AEhsp625 (Fig. 17). La integración del plásmido fue confirmada por PCR y la expresión de la proteína por western blot.

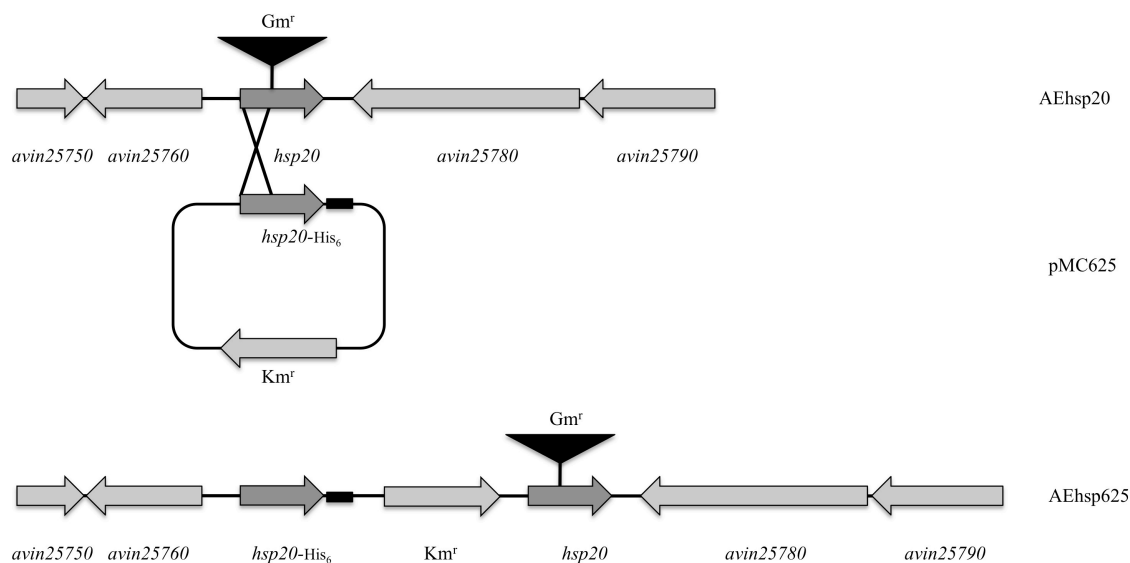


Fig. 17. Representación esquemática de la co-integración del plásmido pMC625 que porta el gen *hsp20* con una etiqueta de seis histidinas en el N-terminal.

La cepa AEhsp625 fue sometida a desecación; como se muestra en la tabla 7, la complementación del gen silvestre permitió recuperar quistes resistentes a la desecación. Estos datos confirman que Hsp20 es esencial para la sobrevivencia de los quistes maduros en este proceso.

Realizamos la microscopía electrónica de los quistes formados por la mutante en *hsp20* y se comparó con los de la cepa silvestre y de la mutante en *rpoS*. Como se muestra en la figura 18, los quistes formados por la mutante en *hsp20* son similares a los formados por la cepa silvestre, en los cuales se pueden observar el cuerpo central con gránulos de PHB y rodeados por las capas intina y exina. Estos resultados indican que, diferente a la mutación en *rpoS*, la

incapacidad de sobrevivir a la desecación en la mutante AEhsp20 no es causada por formar quistes mal estructurados.

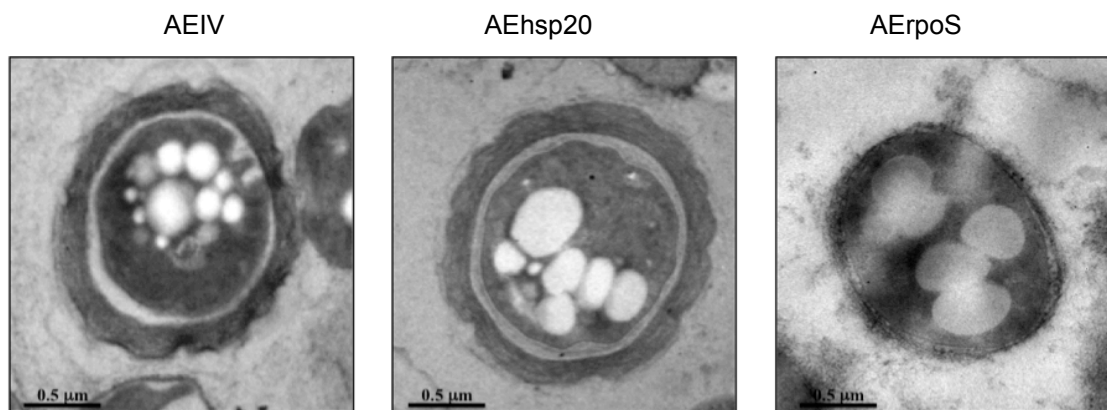


Fig. 18. Microscopia electrónica de los quistes formados por la cepa silvestre, la cepa mutante en el gen *hsp20* y la cepa mutante en el gen *rpoS*.

6.3.5 La síntesis de los alquilresorcinolos no está afectada en la mutante en *hsp20*.

Como anteriormente se mencionó, los alquilresorcinolos son lípidos fenólicos que se sintetizan únicamente en el proceso de enquistamiento. Mutaciones en los genes biosintéticos de estos lípidos da como resultado cepas que producen quistes con una morfología alterada en la exina pero que son capaces de resistir a la desecación (Segura *et al.*, 2009). Como se muestra en la figura 18, la mutante AEhsp20 produce quistes similares a la silvestre, sugiriendo que la síntesis de los alquilresorcinolos no está afectada por esta mutación. Por lo tanto, la síntesis de estos lípidos fue examinada en la mutante AEhsp20. Después de 5 días de incubación, en medio suplementado con butanol, las células fueron teñidas con Fast Blue para visualizar la producción de alquilresorcinolos. Mientras que la mutante en *rpoS* permaneció blanca (usado como control negativo), la mutante en *hsp20* presentó un color rojo (lo que indica la presencia de alquilresorcinolos) similar a la cepa silvestre (Fig. 19).

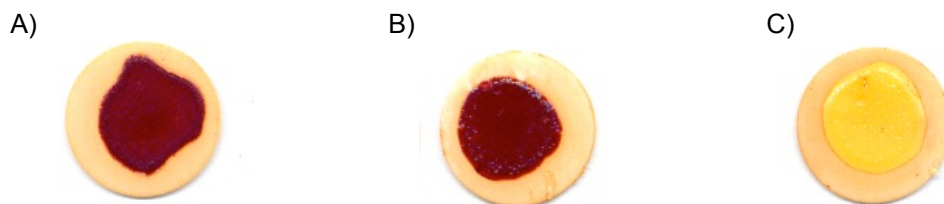


Fig. 19. Tinción de alquilresorcinolos producidos por la cepa silvestre (A), la cepa mutante en el gen *hsp20* (B) y la cepa mutante en el gen *rpoS* (C), la cual fue usada como control negativo.

6.3.6 La expresión de *hsp20* a partir de un promotor independiente de RpoS no restaura la resistencia a la desecación en la mutante en *rpoS*.

Debido a que la cepa que porta la mutación en *rpoS* es incapaz de generar quistes resistentes a la desecación, evaluamos si Hsp20 expresado bajo un promotor independiente de RpoS es capaz de restaurar este fenotipo. La mutante AErpoS se complementó en *trans* usando el plásmido replicable en *A. vinelandii* pBBR1MCS-2. En este plásmido se clonó el gen *hsp20* bajo el promotor de kanamicina y que porta una etiqueta de seis histidinas en la región amino terminal generando el plásmido pBMCA6. El plásmido pBMCA6 fue conjugado en la mutante AEhsp20 y en la mutante AErpoS para generar las cepas AEhsp20/pBMCA6 y AErpoS/pBMCA6. Como control negativo se conjugó el plásmido vacío pBBR1MCS. La expresión la proteína fue confirmada por western blot utilizando un anticuerpo anti-histidinas (Fig. 20).

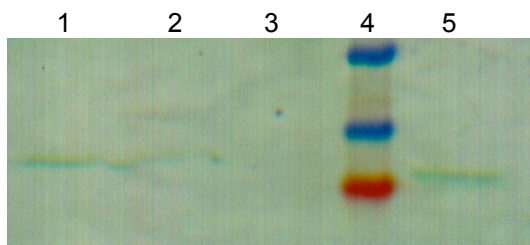


Fig. 20. Western blot de las mutantes en *hsp20* y *rpoS* complementadas con el plasmido pBMCA6. Carril 1. AEhsp20/pBMCA6, 2. AErpoS/pBMCA6, 3. AEIV (control negativo), 4. Marcador de peso molecular, 5. Hsp20 purificado (control positivo).

Las cepas complementadas fueron inducidas a enquistamiento y sometidas a desecación. Como se esperaba, el plásmido pBMCA6, pero no el plásmido vacío, restauró la resistencia a la desecación de los quistes formados por la mutante en *hsp20*. Sin embargo, la expresión de *hsp20* en la cepa AErpoS no restauró la resistencia a la desecación (Tabla 7).

Para comprobar si la expresión de Hsp20 en la mutante en RpoS restaura el fenotipo de síntesis de alquilresorcinoles, las células de las cepas complementadas fueron teñidas con Fast Blue. La cepa AErpoS complementada con el plasmido pBMCA6 siguió presentando la coloración blanca lo que indica la falta de síntesis de los lípidos fenolicos (Fig. 21-A). Las células fueron visualizadas al microscopio para comprobar si el plásmido pBMCA6 restaura la estructura del quiste en la mutante en *rpoS*. Como se muestra en la figura 21-B, la mutante en *rpoS* complementada con Hsp20 forma quistes similares a la mutante AErpoS. Esto indica que además de Hsp20 hay otras proteínas bajo el control de RpoS que son necesarias para formar quistes resistentes a la desecación

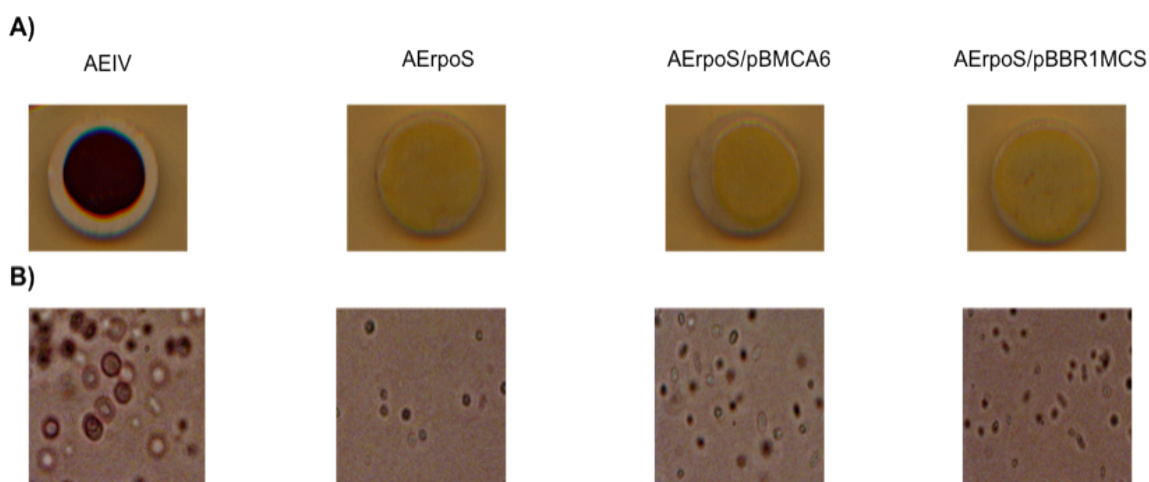


Fig. 21. A) Tinción de alquilresorcinoles en la cepa silvestre, en la mutante en *rpoS* y en la mutante en *rpoS* complementada con el plásmido pBMCA6 (AErpoS/*hsp20*+) y con el plásmido pBBR1MCS. B) Microscopia de contraste de fases de las mismas cepas.

6.3.7 Interacción de Hsp20 con proteínas de células enquistadas.

Como se ha reportado anteriormente, las proteínas de choque térmico son capaces de interaccionar con otras proteínas para protegerlas del mal plegamiento ocasionado ante un estrés (Lee *et al.*, 1997; Vayssier & Polla, 1998; , Haslbeck *et al.*, 1999).

Por lo tanto, buscamos posibles blancos que interaccionan con Hsp20 en el proceso de enquistamiento a través de ensayos de Pull-Down. Para ello se construyó el plásmido pMHsp20_{His6}, derivado del plásmido pET21a y que porta el gen *hsp20* que se expresa a partir de un promotor inducible y lleva en el carboxilo terminal una etiqueta de seis histidinas. El ensayo de Pull-Down se llevó a cabo como se describió en material y métodos. En la figura 22 se puede observar al menos 5 bandas que sólo aparecen cuando interacciona Hsp20-_{His6} con el lisado de quistes de la mutante en Hsp20 (AEhsp20). A estas bandas les llamamos H1, H2, H3, H4 y H5.

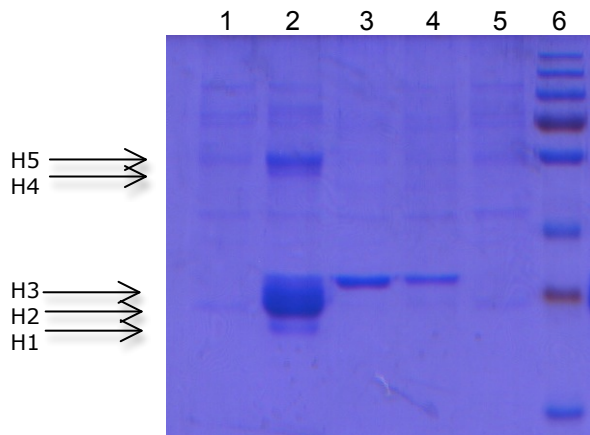


Fig. 22. Pull-down de Hsp20-_{His6} con la fracción soluble de quistes de *A. vinelandii* de la cepa silvestre (AEIV) y de la cepa mutante en *hsp20* (AEhsp20). Carril 1: Plásmido vacío con lisado de quistes de la cepa AEhsp20, 2) Hsp20-_{His6} con lisado de quistes de la cepa AEhsp20, 3) Hsp20 purificada, 4) Hsp20-_{His6} con lisado de quistes de la cepa AEIV, 5) Plásmido vacío con lisado de quistes de la cepa AEIV, 6) Marcador de peso molecular. Las flechas señalan las proteínas que posiblemente interaccionan con Hsp20 (H1-H5). Este experimento fue realizado por triplicado.

Para comprobar que las posibles proteínas con las que interacciona Hsp20 no fueran dímeros, se realizó un western blot utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas (Fig. 23).

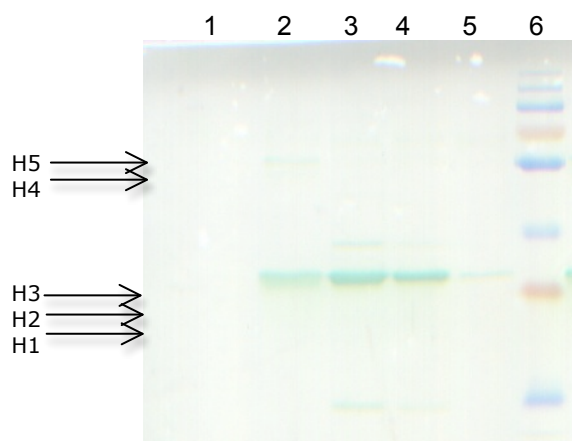


Fig. 23. Western blot de Hsp20-_{His6} con la fracción soluble de quistes de *A. vinelandii* de la cepa silvestre (AEIV) y de la cepa mutante en *hsp20* (AEhsp20). Los carriles llevan las mismas muestras que el ensayo de pull-down descrito en la figura 22.

Como se observa en la figura anterior se detecta la proteína Hsp20 en su forma monomérica sólo en las muestras donde se está expresando Hsp20-_{His6}. Por lo tanto las bandas H4 y H5 no son complejos de Hsp20.

Posteriormente se identificaron las proteínas correspondientes a las bandas H1, H2, H3, H4 y H5, como control se secuenció la banda que corresponde a la proteína Hsp20 purificada y a una banda elegida aleatoriamente en la muestra del plásmido vacío con la fracción soluble de la mutante en Hsp20.

Encontramos que al menos 10 proteínas co-eluyen con Hsp20-_{His6} (Tabla 8). Tres de estas proteínas están involucradas en la biosíntesis de aminoácidos: HisH (Avin04600), AroA (Avin15850) y ArgA (Avin04920), mientras que las proteínas avin06310, avin49880 y avin38530 están relacionadas en procesos de transcripción y traducción. La proteína FumC2 (Avin34880) está anotada como una fumarato hidratasa posiblemente involucrada en el ciclo de Krebs y la proteína PhoH relacionada con funciones regulatorias. Finalmente, encontramos una

proteína asociada a un sistema de transporte ABC para la tolerancia a solventes orgánicos (Avin12880) y una proteína similar a LpxA (Avin01130). La proteína LpxA en *E. coli* y *S. typhimurium* participa en la primera reacción para la biosíntesis del lípido A que forma parte del lipopolisacárido.

Tabla 8. Proteínas identificadas por Pull-Down que co-eluyen con Hsp20.

Biosíntesis de aminoácidos		
Avin04600	<i>hisH</i>	Imidazol glicerol fosfato sintasa, subunidad de glutamina amidotransferasa.
Avin15850	<i>aroA</i>	3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa/Prefenato deshidrogenasa.
Avin04920	<i>argA</i>	Acetilglutamato sintasa.
Procesos de transcripción y traducción		
Avin06310	<i>rpsC</i>	30S proteína ribosomal S3
Avin49880		Proteína que contiene dominio de cold-shock.
Avin38530		Proteína de la familia metalo-beta-lactamasa de metabolismo de RNA.
Metabolismo energético		
Avin34880	<i>fumC2</i>	Fumarato hidrasa proteína clase II
Funciones regulatorias		
Avin11240		Proteína PhoH-like
Envoltura celular		
Avin01130		Proteína de la superfamilia trimerica LpxA-like.
Transporte y proteínas de unión.		
Avin12880		Transportador ABC de eflujo para la tolerancia a solventes orgánicos, componente auxiliar.

Elegimos una de las proteínas encontradas en el Pull-Down para investigar si al igual que Hsp20 participa en la resistencia a la desecación de los quistes. Construimos la mutante en el gen *lpxA* (*avin01130*), la cual es una derivada de la cepa silvestre y que porta la mutación *lpxA::Gm*, dicha mutación fue confirmada por PCR. El crecimiento y la producción de alginato de esta cepa en medio BS fue similar a la de la cepa silvestre.

La cepas AEIpxA, AEhsp20, AErpoS y la cepa silvestre fueron inducidas y sometidas a desecación. Como se muestra en la tabla 9, la mutante en el gen *lpxA* aún forma quistes resistentes a la desecación.

Tabla 9. Resistencia a la desecación en *A. vinelandii*.

Cepa	Descripción	Resistencia a la desecación (%)
AEIV	Cepa silvestre.	14.8 ± 2.4
AErpoS	AEIV que porta la mutación <i>rpoS</i> ::Sp.	<0.0001
AEhsp20	AEIV que porta la mutación <i>hsp20</i> ::Gm.	<0.0001
AEIpxA	AEIV que porta la mutación <i>lpxA</i> ::Gm.	6.02±0.43

6.4 Rpos y su relación con las epimerasas en *A. vinelandii*.

6.4.1 Detección de las epimerasas AlgE1-7 en la mutante en *rpoS*.

El proteoma de quistes de la cepa silvestre permitió identificar tres proteínas relacionadas con la modificación del alginato: dos epimerasas, AlgE1 y AlgE6 y la proteína unidora de calcio, Avin51240. Estas proteínas no son detectadas en la mutante AErpoS lo que sugiere que pueden estar reguladas por este factor sigma. Como anteriormente se mencionó, únicamente la inactivación de las siete epimerasas da como resultado quistes que, parecidos a la mutante en *rpoS*, carecen de las capas intina y exina además de que pierden la capacidad de resistir a la desecación (Steigedal *et al.*, 2008).

Debido a la alta similitud entre los genes que codifican para las epimerasas es difícil medir su expresión de forma individual, por ello, se llevó a cabo un ensayo de western blot utilizando anticuerpos policlonales contra la epimerasa AlgE4, con el cual se pueden detectar todas las epimerasas y diferenciarse en base a su peso molecular (Hoidal *et al.*, 2000). Estos ensayos fueron realizados en la cepa silvestre (AEIV), en la cepa mutante en *rpoS* (AErpoS) y la mutante en

rpoS complementada con el plásmido pSMR*rpoS* (A*ErpoS*/pSM*rpoS*), el cual es un derivado del plásmido pBBR1MCS-2 y que porta el gen *rpoS* sin su región promotora clonado bajo el promotor de kanamicina (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011), y el plásmido pBBR1MCS-2 usado como control negativo (A*ErpoS*/pBBR1MCS).

Como se muestra en la figura 24, en la mutante en *rpoS* y su derivada complementada con el plásmido vacío, las epimerasas están presentes en bajas concentraciones comparada con la concentración de las epimerasas detectadas en la cepa silvestre o en la mutante en *rpoS* complementada con *rpoS*. Este resultado sugiere que RpoS controla la expresión de las epimerasas o su exporte.

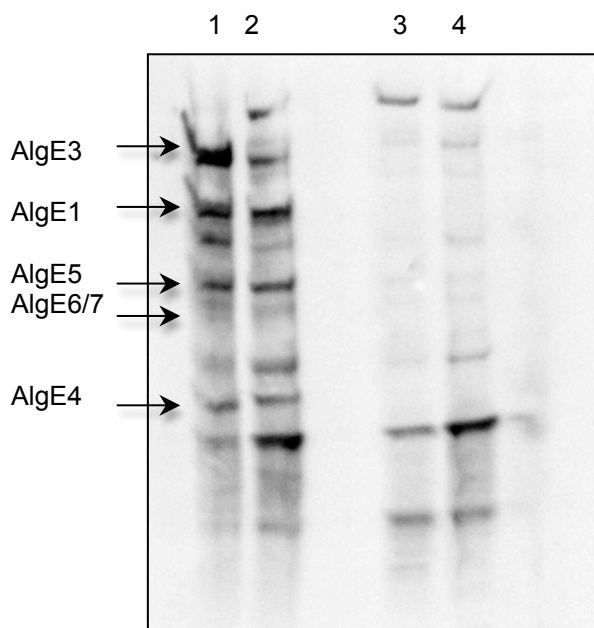


Fig. 24. Westen blot para detectar epimerasas asociadas a la superficie del cuerpo central en quistes de las diferentes cepas de *A. vinelandii*. Carril 1). AEIV, 2) A*ErpoS*/pSM*rpoS*, 3) A*ErpoS*, 4) A*ErpoS*/pBBR1MCS-2.

6.4.2 Efecto de la mutación en *rpoS* en la expresión de los genes *eexDEF*.

Mutaciones en los genes *eexDEF*, que codifican para el sistema de transporte tipo I involucrado en el exporte de las epimerasas, da como resultado la ausencia de las epimerasas AlgE1-7 en el sobrenadante de los cultivos. Además,

los quistes formados por estas mutantes son incapaces de resistir a la desecación y su morfología es similar a los quistes formados por la mutante en *rpoS* y a la cepa que tiene inactivadas todas las epimerasas (Gimmestad *et al.*, 2006; Steigedal *et al.*, 2008). Por lo tanto, determinamos si RpoS ejerce un efecto en la expresión de los genes *eexDEF*. Para ello medimos la expresión del primer gen del operón, *eexD*, en la mutante en *rpoS* y la comparamos con la cepa silvestre tanto en condiciones de crecimiento vegetativo como de enquistamiento. Como se muestra en la figura 25, la expresión del gen *eexD*, medido por qRT-PCR, disminuye en la mutante AErpoS en ambas condiciones, lo que indica que RpoS es requerido para activar la expresión de *eexD*.

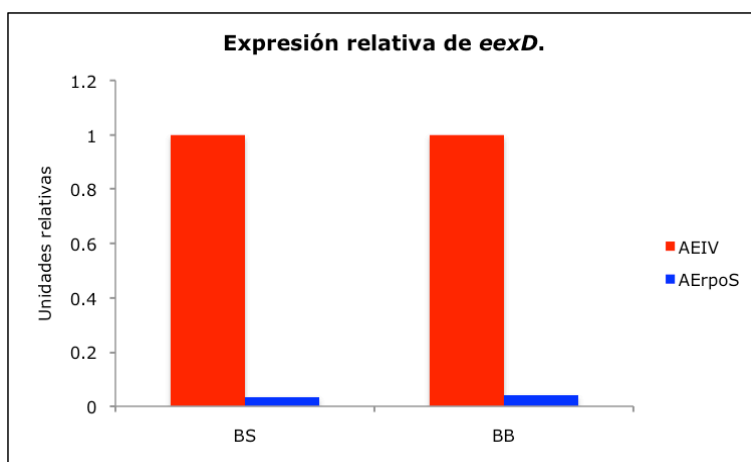


Fig. 25. Expresión relativa de *eexD* en fase vegetativa (BS) en la cepa silvestre (AEIV) (1.0) y en la mutante en *rpoS* (AErpoS) (0.036 ± 0.0056) y en condiciones de enquistamiento en la cepa silvestre (1.0) y en la mutante en *rpoS* (0.041 ± 0.018).

Posteriormente evaluamos si RpoS controla la transcripción del operón *eexDEF* localizando un promotor dependiente de sigma S. Debido a que las epimerasas también se encuentran en condiciones de fase vegetativa, lo que indica que el sistema de exporte está activo en estas condiciones, realizamos ensayos de “Primer extension” a partir de RNA extraído de células crecidas en BS de la cepa silvestre y de la mutante en *rpoS*. Ubicamos dos sitios putativos de inicio de la transcripción, el primero, P1_{eexD}, se encuentra localizado a 40 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción, este promotor no es dependiente de

RpoS pues la señal del promotor es detectada tanto en la cepa silvestre como en la mutante en *rpoS*; sin embargo, la región -10 y -35 no parece ser típica de un promotor reconocido por RpoD. El segundo promotor, P2_{eexD}, se ubica 209 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción, la región -10 presenta la secuencia CTACAAT típica de los promotores reconocidos por RpoS y no hay una secuencia -35 definida, además de que la señal del promotor no es detectada en la cepa AErpoS, lo que indica que RpoS controla la transcripción del operón *eexDEF* (Fig. 26).

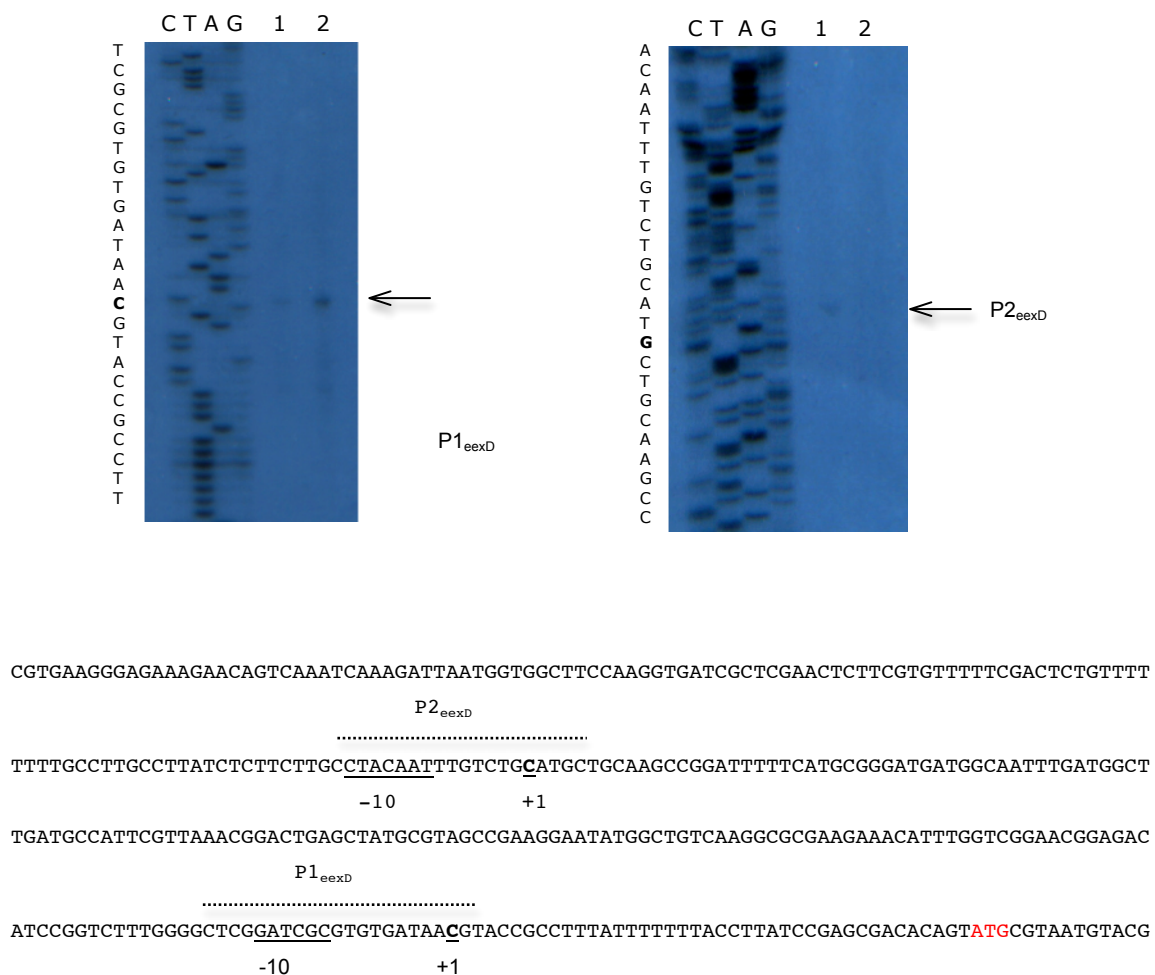


Fig. 26. Sitios de inicio de la transcripción del gen *eexD*. En rojo se muestra el sitio de inicio de la traducción, en subrayado y negrita el sitio de inicio de la transcripción +1 y subrayado la caja -10.

6.4.3 Efecto de la mutación en *rpoS* sobre la expresión del gen *avin51240*.

La proteína Avin51240 codifica para una proteína unidora de calcio ubicada dentro del locus de las epimerasas, entre AlgE7 y AlgE6. Para confirmar la regulación que RpoS ejerce sobre la proteína Avin51240 realizamos qRT-PCR para medir su expresión en la cepa que porta la mutación *rpoS*::Sp y lo comparamos con la cepa silvestre. Como se muestra en la figura 27, la expresión de *avin51240* se reduce más de la mitad en la mutante en *rpoS*. Este resultado sugiere que la transcripción del locus *algE1-6* también es activado por RpoS.

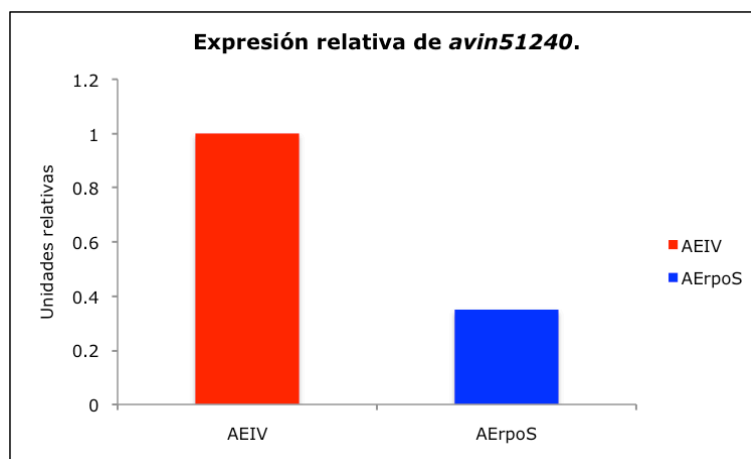


Fig. 27. Expresión relativa de *avin51240* en la cepa silvestre (1) y en la mutante en *rpoS* (0.35 ± 0.08) medidos en condiciones de enquistamiento.

CAPITULO 7: DISCUSIÓN.

Azotobacter vinelandii es una de las pocas bacterias que es capaz de diferenciarse a formas resistentes a la desecación llamadas quistes. El quiste está rodeado por dos capas llamadas intina y exina compuesta de alginato y lipoproteínas, en su interior se encuentran gránulos de PHB, la membrana del quiste contiene lípidos fenólicos llamados alquilresorcinoles. El proceso de enquistamiento ha sido descrito a nivel fisiológico y bioquímico (Sadoff, 1975, 2001; Lin & Sadoff, 1969) pero poco se ha reportado de lo que sucede a nivel genético.

El análisis del proteoma de la cepa silvestre en condiciones de crecimiento vegetativo comparado con el de enquistamiento nos permitió identificar tres subunidades de la nitrogenasa Fierro-Molibdeno cuya expresión es reducida en células enquistada, esto es debido a que la fijación de nitrógeno cesa cuando inicia el proceso de enquistamiento (Loperfido & Sadoff, 1973). Dos proteínas identificadas sólo en el quiste pero no en la célula vegetativa son dos 3-oxoacido CoA-transferasas o también llamadas succinil Co-A transferasas (Avin17570 y Avin51610). La primera de ellas, Avin17570, se encuentra, en un contexto genético junto a una hidroxibutirato deshidrogenasa y una permeasa lo cual sugiere que estas tres proteínas podrían estar implicadas en la degradación de PHB. De hecho, se ha observado una relación entre la formación de quistes y la acumulación de PHB. A las 48 horas de haber inducido el enquistamiento el porcentaje de células enquistadas es bajo mientras que la acumulación de PHB alcanza su punto máximo, sin embargo, al sexto día el contenido de PHB se reduce a menos del 10% del peso seco mientras que la totalidad del cultivo ya son células enquistadas. Lo que sugiere que el metabolismo del PHB tiene una función en la inducción del enquistamiento (Stevenson & Scolofsky, 1966). La segunda succinil Co-A transferasa se encuentra junto al gen *bktA*, que codifica para una tiolasa y cuya función se ha estudiado en el laboratorio y no participa en el metabolismo de PHB (Segura *et al.*, 2000).

El factor sigma RpoS es esencial para formar quistes resistentes a la desecación y para la síntesis de los alquilresorcinolos (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2013). Con la finalidad de encontrar genes específicamente inducidos en el enquistamiento y regulados por RpoS, realizamos un análisis de proteoma que reveló la presencia de varias proteínas que hipotéticamente están bajo el control de RpoS y que son preferentemente expresadas cuando se da este proceso. Dentro de estas proteínas identificamos una proteína con similitud a hemeritina, este tipo de proteínas transportan oxígeno el cual está unido a dos moléculas de hierro (Long *et al.*, 1992; Stenkamp, 1994). Se propone que las funciones en los procariontes pueden ser unir oxígeno como un mecanismo de almacenaje, como mecanismo para sensar o como un mecanismo de desintoxicación (Karlsen *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2000; Isaza *et al.*, 2006). En el proteoma del quiste la hemeritina aparece con dos pesos moleculares y dos puntos isoeléctricos diferentes, esto pudiera deberse a que dicha proteína tuvo alguna modificación post-traducciona. Se propone que la fosforilación puede alterar la unión al oxígeno o que la unión al oxígeno puede controlar la susceptibilidad a la fosforilación (French *et al.*, 2008). Se identificaron también dos proteínas relacionadas con transporte y síntesis de polisacáridos, las cuales fueron la proteína Avin05380, y Avin29910. Si estas proteínas tienen alguna función en la formación del quiste o en la resistencia a la desecación, queda por ser investigada.

Se ha reportado que las sHsp's participan en varios procesos celulares asociados a la tolerancia a la desecación en eucariontes, de hecho dos sHsp's, p26 y artemina han sido encontrados en grandes cantidades en embriones enquistados de *Artemia franciscana* que también resisten a desecación (Clegg, 2001, 2005; Willsie & Clegg, 2001; King *et al.*, 2013). Además, en *Polypedilum vanderplanki*, un díptero que habita en África, es capaz de sobrevivir a largos periodos de desecación en su estado larval, entrando a un estado conocido como anhidrobiosis que puede durar incluso años. En dicho proceso las proteínas de

choque térmico, incluyendo sHsp's, están asociadas a la resistencia a la desecación (Gusev *et al.*, 2011).

Aunque la proteína Hsp20 fue mas abundante en los quistes, también fue detectada en células vegetativas. Inesperadamente, los resultados de qRT-PCR y de primer extensión mostraron que los niveles del RNAm de *hsp20* fueron mas altos en células vegetativas que en quistes, sugiriendo que la traducción de *hsp20* es inhibida en células vegetativas y favorecida en condiciones de enquistamiento. Estos datos fueron confirmados al medir la transcripción y traducción de *hsp20* en ambas condiciones. Los resultados indicaron que *hsp20* se transcribe tanto en condiciones de vida vegetativa como en enquistamiento, sin embargo, la traducción de *hsp20* es mayor en condiciones de enquistamiento lo que sugiere una regulación post-transcripcional. Un sistema candidato que controla la expresión de genes de forma post-transcripcional es el sistema Rsm; una hipótesis es que en células vegetativas la traducción del RNAm de *hsp20* es inhibida por el represor RsmA y ésta represión es liberada cuando las células enquistan. Recientemente se ha reportado que RsmA es represor del gen *algD*, que codifica para una de las enzimas claves en la síntesis de alginato y que es esencial para la formación de los quistes maduros (Campos *et al.*, 1996; Manzo *et al.*, 2011). Interesantemente, la región de Shine-Dalgarno de *hsp20* contiene un sitio potencial de reconocimiento por RsmA el cual aparea con 7 de 12 nucleótidos de la secuencia consenso definida por SELEX que RsmA reconoce (Dubey *et al.*, 2005). En *Artemia franciscana* se ha sugerido que la cantidad de sHsp's esta sujeta a una regulación transcripcional y traduccional (King *et al.*, 2013).

La transcripción de *hsp20* es directamente dependiente de RpoS, lo cual es inusual ya que en bacterias, y particularmente en *E. coli*, el regulador maestro de la expresión de las proteínas de choque térmico es RpoH (Tilly *et al.*, 1986; Grossman *et al.*, 1987; Gross, 1996). Adicionalmente, *A. vinelandii* posee un factor

sigma RpoH pero en la región promotora de *hsp20* no hay ninguna secuencia que pudiera ser reconocida por este factor transcripcional.

En *A. vinelandii*, Hsp20 tiene una función esencial en la tolerancia a la desecación ya que los quistes formados por esta mutante son incapaces de resistir a la desecación. Esta inhabilidad no es causada por cambios en la estructura de los quistes ya que los quistes formados por la cepa AEhsp20 tienen un fenotipo silvestre. Consistente con este fenotipo, la mutante en *hsp20* no está afectada en la síntesis de alquilresorcinoles ya que estos lípidos fenólicos forman parte de la estructura del quiste, aún cuando no son esenciales para la resistencia a la desecación (Segura *et al.*, 2009).

En el estado de desecación, la carencia de agua genera un gran estrés en la célula. Las sHSp's son capaces de unirse a proteínas y protegerlas para evitar esta agregación (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Haslbeck *et al.*, 1999). Por lo tanto, Hsp20 posiblemente interactúe con proteínas que son importantes para mantener la viabilidad de los quistes o para su germinación. De hecho, se ha documentado la participación de una alginato liasa, *alyA3*, involucrada en la germinación de los quistes de *A. vinelandii* (Gimmestad *et al.*, 2009). El ensayo de pull-down nos permitió identificar al menos 10 posibles blancos que interactúan con Hsp20. Tres de ellos están relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos (*hisH*, *aroA* y *argA*). Lo que sugiere que la protección de las enzimas involucradas para la síntesis de las proteínas pudiera ser de vital importancia para el quiste. Otra proteína identificada es Avin12880 la cual es parte de un sistema de transporte de eflujo tipo ABC involucrado en la tolerancia a solventes orgánicos. La exposición a solventes orgánicos causan expansión en la membrana y pérdida de su integridad, esto conlleva a la inhibición de la función de las proteínas de la membrana, daño en la fuerza protón-motriz y por consiguiente hay lisis y muerte celular (Sikkema *et al.*, 1995). *A. vinelandii* es inducido a enquistamiento utilizando concentraciones sub-letales de butanol (0.2%), el butanol que entra a la célula es metabolizado a β -hidroxibutirato (BHB) que es la molécula que induce el

enquistamiento. Por lo tanto, si esta proteína está involucrada en el proceso de diferenciación, sería sólo expresada por las condiciones de inducción a enquistamiento en el laboratorio y no en la naturaleza. Otra de las proteínas con la cual posiblemente interacciona Hsp20 es Avin49880 la cual tiene un dominio cold-shock y contiene un sitio parecido al de RaiA (Inhibidor A asociado al ribosoma), estas proteínas se activan por estrés y se unen al ribosoma evitando que el aminoacil-tRNA se una al sitio A del ribosoma lo que provoca que se detenga la traducción (Agafonov *et al.*, 2001). De esta forma se reduce los errores en la traducción cuando la célula está sometida a estrés. Interesantemente la proteína Avin49880 tiene homólogos en *Nitrosococcus halophilus*, *Psychromonas ingrahamii* y *Eliaorea tepidiphila* que son bacterias de ambiente marino sujetas a diferentes tipos de estrés. Por otra parte, la proteína Avin 01130 que codifica para una proteína similar a LpxA no participa en la resistencia a la desecación ya que la mutante en este gen forma quistes que sobreviven a la desecación similar a la cepa silvestre. En *E. coli*, el gen *lpxA* codifica para una UDP-N-acetilglucosamina acetiltransferasa que participa en la biosíntesis del lípido A del lipopolisacárido y su mutación resulta en una susceptibilidad a antibióticos (Vuorio & Vaara, 1992).

Una pregunta que surgió en este estudio fue si además de *hsp20*, RpoS controla otros genes involucrados en el enquistamiento. Encontramos que *hsp20*, expresado a partir de un promotor independiente de RpoS en la mutante en *rpoS*, no es suficiente para restaurar la resistencia a la desecación de los quistes, lo que implica que además de Hsp20, otras proteínas que están bajo el control de RpoS son necesarias para formar quistes funcionales que resistan a la desecación. Estos posibles blancos pudieran ser las epimerasas, dos de ellas AlgE1 y AlgE6 fueron identificadas en el proteoma.

Las epimerasas (AlgE1-7) son un grupo de enzimas que catalizan la conversión de ácido manurónico a su epímero, el ácido gulurónico en el proceso de síntesis de alginato. La rigidez del alginato depende directamente de la presencia de bloques formados por ácido gulurónico y son estos los que se

encuentran en su mayoría en la exina (Lin & Sadoff, 1969). Steigedal *et al.* (2008) reportaron que la familia de epimerasas presentes en *A. vinelandii* son esenciales para la formación del quiste ya que cuando se inactivan todos los genes que codifican para las epimerasas pierde la capacidad de formar quistes resistentes a la desecación. Los ensayos de western blot confirmaron una reducción en las epimerasas asociadas al cuerpo central en la mutante en *rpoS*. Esto pudiera ser debido a que RpoS regula directamente la expresión de las epimerasas y/o regula su exporte. Los ensayos de qRT-PCR mostraron que los transcritos del gen *eexD*, involucrado en el sistema de secreción de epimerasas, se ve reducido en la mutante *AErpoS*, además de que dicho gen tiene un promotor RpoS dependiente. Estos datos sugieren que la ausencia de las epimerasas en la mutante en *rpoS* es provocado porque no pueden ser exportadas, lo que generaría alginato con un reducido porcentaje de ácido gulurónico que son los encargados de estructurar principalmente la capa externa del quiste, la exina. En el mismo locus de las epimerasas se encuentra la proteína unidora de Calcio (Avin51240) cuyo papel podría ser el de mediar la unión de calcio a los bloques de ácido gulurónico para generar un entrecruzamiento de las moléculas de alginato y con ello formar geles mas estables, la expresión de esta proteína también parece ser regulada por RpoS.

Las sHsp's han sido relacionadas con la protección contra la desecación en varios eucariontes (Clegg 2001, 2005; Willsie & Clegg, 2001; Gusev *et al.*, 2011; King *et al.*, 2013). Sin embargo, este es el primer estudio en bacterias de una proteína de choque térmico de bajo peso molecular que es esencial para la resistencia a la desecación de los quistes en *A. vinelandii*.

Finalmente, con los datos obtenidos en este trabajo proponemos el siguiente modelo de regulación, en el cual RpoS controla la expresión de Hsp20 que es esencial para la sobrevivencia a la desecación, y al sistema de secreción para el exporte de las epimerasas y la expresión de ellas, necesarias para la formación del quiste funcional (Fig. 28).

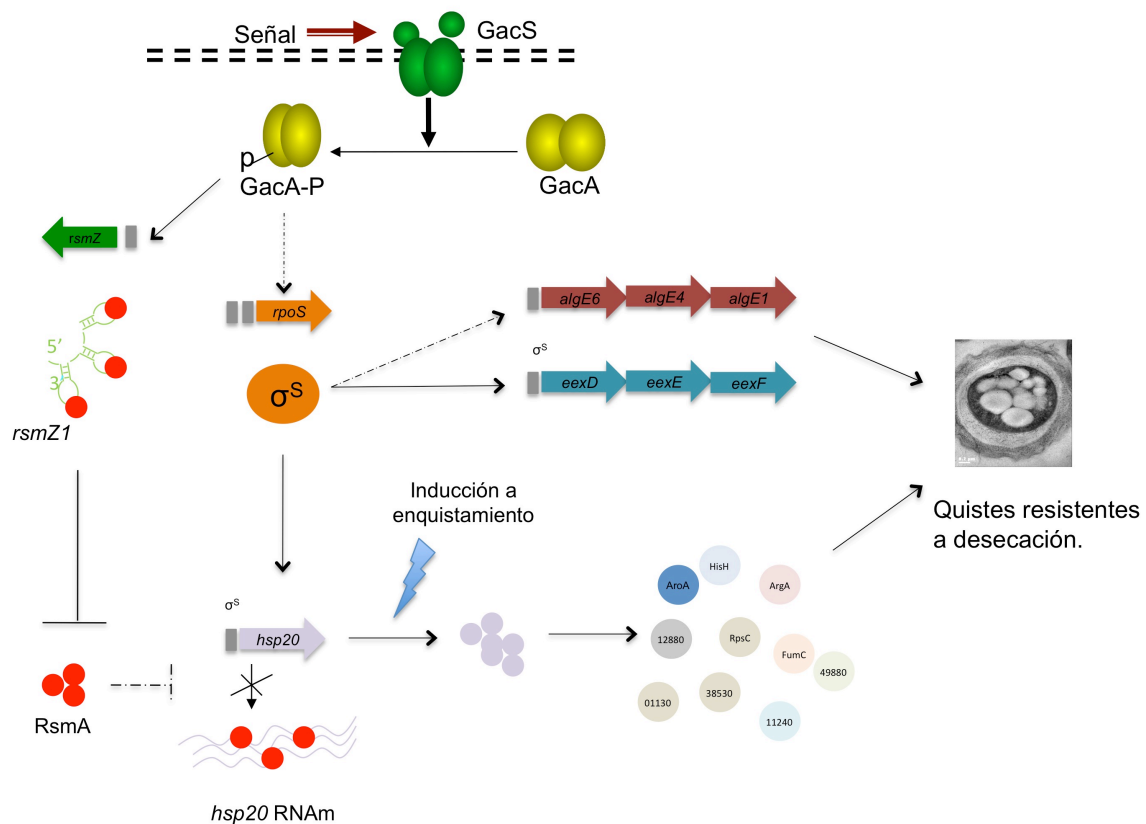


Fig. 28. Modelo propuesto de la regulación del enquistamiento a través de RpoS.

CAPITULO 8: CONCLUSIONES.

1. RpoS regula la transcripción de *hsp20* que codifica para una proteína de choque térmico que es esencial para la resistencia a la desecación de los quistes.
2. Hsp20 no está implicado en regular la síntesis de alquilresorcinoles ni la estructura del quiste.
3. En la mutante en *rpoS*, Hsp20 no restaura los fenotipos de resistencia a la desecación, síntesis de alquilresorcinoles ni estructura del quiste, lo que sugiere que otros genes, bajo el control de RpoS, son necesarios.
4. La transcripción de *hsp20* se da en fase vegetativa y en fase de enquistamiento pero la mayor traducción se da en fase de enquistamiento, lo que sugiere una posible regulación post-transcripcional.
5. RpoS activa la transcripción del operón *eexDEF* involucrado en el transporte de las epimerasas.
6. RpoS regula positivamente la expresión del gen *avin51240*.

CAPITULO 9: PERSPECTIVAS.

1. Confirmar la interacción de Hsp20 con las proteínas encontradas por Pull-Down.
2. Evaluar si las proteínas con las cuales interacciona Hsp20 participan en la resistencia a la desecación del quiste.
3. Confirmar si el sistema Rsm regula la traducción de *hsp20*.
4. Confirmar si RpoS regula el exporte y/o expresión de las epimerasas.

CAPITULO 10: REFERENCIAS.

- Abu Kwaik, Y. & Engleberg, N. C. (1994).** Cloning and molecular characterization of a *Legionella pneumophila* gene induced by intracellular infection and by various *in vitro* stress conditions. *Mol. Microbiol.* **13**: 243–251.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Harb, O. S. & Stone, B. J. (1997).** Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol. Microbiol.* **24**: 629–642.
- Agafonov, D. E., Kolb, V. A. & Spirin, A.S. (2001).** Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Rep.* **2**: 399–402.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. (1995).** Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* **160**: 63–67.
- Alpert P. (2006).** Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare?. *J Exp Biol.* **209**: 1575–1584
- Arrigo, A. P. & Landry, J. (1994).** Expression and function of the low- molecular-weight heat shock proteins. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, pp. 335–373. Edited by Morimoto, R. Tissieres, A. and Georgeopoulos, C. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,
- Bell, S. D. & Jackson S. P. (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol.* **6**: 222–228.
- Bjerkan, T. M., Lillehov, B. E., Strand, W. I., Skjak-Braek, G., Valla, S. & Ertesvag, H. (2004).** Construction and analyses of hybrid *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerases with new epimerization pattern characteristics. *Biochem J.* **381**: 813–821
- Boelens, W. C., Croes, Y., de Ruwe, M., de Reu, L. & de Jong, W.W. (1998).** Negative charges in the C-terminal domain stabilize the $\alpha\beta$ -crystallin complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 28085– 28090.
- Bova, M. P., Yaron, O., Huang, Q., Ding, L., Haley, D. A., Stewart, P. L. & Horwitz, J. (1999).** Mutation R120G in $\alpha\beta$ -crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 6137–6142.
- Buchner, J. (1996).** Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10**: 10-19.
- Campos, M. E., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Nuñez, C., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (1996).** Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **178**: 1793-1799.

- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. & Espín, G. (2000).** The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **182**: 2624-2628.
- Castañeda, M., Sanchez, J., Moreno, S., Núñez, C. & Espín, G. (2001).** The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **183**: 6787-6793.
- Clegg, J. S. (2001).** Cryptobiosis—a peculiar state of biological organization. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. **128**: 613-624
- Clegg, J. S. (2005).** Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile, *artemia*. Integr. Comp. Biol. **45**: 715–724.
- Clementi, F. (1997).** Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. Crit. Rev. Biotech. **17**: 327-361.
- Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D. & Espin, G. (2011).** Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology. **157**: 1685-1693.
- Crowe, J. H. & Madin, K. A. (1974).** Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes. T. Am. Microsc. Soc. **93**: 513–524
- Datta, S. A. & Rao, C. M. (2000).** Packing-induced conformational and functional changes in the subunits of α -crystallin. J. Biol. Chem. **275**: 41004–41010.
- Delepelaire, P. (2004).** Type I secretion in gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta. **1694**: 149–161.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T. & Babitzke, P. (2005).** RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. RNA. **11**: 1579–1587.
- Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997).** Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. EMBO J. **16**: 221–229.
- Encarnacion, S., Guzman, Y., Dunn, M. F., Hernandez, M., del Carmen Vargas, M. & Mora, J. (2003).** Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. Proteomics. **3**: 1077-1085.
- Ertesvag, H. & Valla, S. (1999).** The A modules of the *Azotobacter vinelandii* mannuronan-C-5-epimerase AlgE1 are sufficient for both epimerization and binding of Ca²⁺. J. Bacteriol. **181**: 3033–3038.
- Ertesvag, H., Høidal, H. K., Schjerven, H., Svanem, B. I. & Valla, S. (1999).** Mannuronan C-5-epimerases and their application for *in vitro* and *in vivo* design of new alginates useful in biotechnology. Metab. Eng. **1**: 262–269
- French, C.E., Bell, J. M. & Ward, F. B. (2008).** Diversity and distribution of hemerythrin-like proteins in prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. **279**: 131-145.

- Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., & Horinouchi, S. (2006).** Phenolic lipid synthesis by type III poliketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 6356-6361.
- Fyfe, J. A. M. & Govan J. R. W. (1983).** Synthesis regulation and biological function of bacterial alginate. In: *Progress in Industrial Microbiol.* **18**: 45-83.
- Gimmestad, M., Ertesvag, H., Heggeset, T. M., Aarstad, O., Svanem, B. I. & Valla, S. (2009).** Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *J. Bacteriol.* **191**: 4845 – 4853.
- Gimmestad, M., Steigedal, M., Ertesvag, H., Moreno, S., Christensen, B. E., Espín, G. & Valla, S. (2006).** Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases. *J. Bacteriol.* **188**: 5551-5560.
- Gross, C. A. (1996).** Function and regulation of the heat shock proteins. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC. 1382–1399.
- Grossman, A. D., Straus, D. B., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1987).** Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **1**: 179-184.
- Goyal, K., Walton, L. J., Browne, J. A., Burnell, A. M. & Tunnacliffe, A. (2005).** Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 702–709
- Guidetti, R. & Jonsson, K. I. (2002).** Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans. *J. Zool.* **257**:181–187
- Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T. & Okuda, T. (2011).** Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedium vanderplanki*. *Cell stress chaperones.* **16**: 81-90.
- Haley, D. A., Bova, M. P., Huang, Q. L., Mchaourab, H. S. & Stewart, P. L. (2000).** Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J. Mol. Biol.* **298**: 261–272.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil H. R. & Buchner, J. (1999).** Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**: 6744- 6751.
- Hengge-Aronis, R. (2002).** Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigma S selective?. *Curr. Op. Microbiol.* **5**: 591-595.
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M. & Espin, G. (2011).** Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology.* **157**: 3014-3023.
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F. & Espin, G. (2012).** RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology.* **158**: 1953-1963.

- Hitchins, V. M., & Sadoff, H. L. (1970).** Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **104**: 492-498.
- Hitchins, V. M. & Sadoff, H. L. (1973).** Sequential metabolic events during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. **113**: 1273-1279.
- Hoidal, H. K., Svanem, B. I. G., Gimmestad, M. & Valla, S. (2000).** Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*. Environ. Microbiol. **2**: 27-38.
- Humair, B., Wackwitz, B. & Haas, D. (2010).** GacA-Controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. **76**: 1497 – 1506.
- Hurkman, W. J. & Tanaka, C. K. (1986).** Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Plant. Physiol. **81**: 802-806.
- Isaza, C. E., Silaghi-Dumitrescu, R., Iyer, R. B., Kurtz, D. M. & Chan, M. K. (2006).** Structural basis for O₂ sensing by the hemerythrin-like domain of a bacterial chemotaxis protein: substrate tunnel and fluxional N terminus. Biochemistry. **45**: 9023-9031.
- Jensen, H. L. (1954).** The Azotobacteriaceae. Bacteriol. Rev. **18**: 195–214.
- Karlsen, O. A., Ramsevik, L., Bruseth, L. J., Larsen, O., Brenner, A., Berven, F. S., Jensen, H. B. & Lillehaug, J. R. (2005).** Characterization of a prokaryotic haemerythrin from the methanotrophic bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath). FEBS J. **272**: 2428-2440.
- Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S.H. (1998).** Crystal structure of a small heat-shock protein. Nature. **394**: 595-599.
- King, A. M., Toxopeus, J. & MacRae, T. H. (2013).** Functional differentiation of small heat shock proteins in diapause-destined *Artemia* embryos. FEBS J. **280**: 4761-4772.
- Kozubek, A. & Tyman, J. H. (1999).** Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiles and their biological activity. Chem. Rev. **99**: 1-26.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. 2nd & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene. **166**: 175-176.
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M. & Buchner, J. (2010).** Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. FASEB J. **24**: 3633–3642.
- Kuczynska-Wisnik, D., Laskowska, E. & Taylor, A. (2001).** Transcription of *ibpB* heat-shock gene is under control of sigma(32)- and sigma(54)-promoters, a third regulon of heat-shock response. Biochem. Biophys. Res. Commun. **284**: 57-64
- Kumar, L.V., Ramakrishna, T. & Rao, C. M. (1999).** Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in α and β crystallins. J. Biol. Chem. **274**: 24137–24141.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B. & Korsatko, W. (1990).** Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In: Biotechnology, 135 –176. Ed: Rehm H. J. & Reed, G.

- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994).** The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Genes Dev.* **8**: 1600–1612.
- Larsen, B. & Haug, A. (1971).** Biosynthesis of alginate: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr. Res.* **17**: 287-296.
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. & Vierling, E. (1997).** A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-671.
- Lin, L. P. & Sadoff, H. L. (1968).** Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **95**: 2336–2343.
- Lin, L. P. & Sadoff, H. A. (1969).** Chemical composition of *Azotobacter vinelandii* cysts. *J. Bacteriol.* **100**: 480-486.
- Lindner, R.A., Carver, J.A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G., Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2000).** Mouse Hsp25, a small heat shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1923–1932.
- Long, R. C., Zhang, J. H., Kurtz, D. M. Jr., Negri, A., Tedeschi, G., & Bonomi, F. (1992).** Myohemerythrin from the sipunculid, *Phascolopsis gouldii*: purification, properties and amino acid sequence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1122**: 136 – 142.
- Loperfido, B. & Sadoff, H. L. (1973).** Germination of *Azotobacter vinelandii* cysts: sequence of molecular synthesis and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **113**: 841-846.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chavez, G. & Deretic, V. (1996).** Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 1800–1808.
- Manchak, J. & Page, W. J. (1994).** Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology.* **140**: 953-963.
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martinez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L., Nuñez, C., Segura, D., Espin, G. & Castañeda, M. (2011).** Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 147-159.
- Mejía-Ruíz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G. & Espín, G. (1997).** Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 101-106.

- Morimoto, R. I. (1998).** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**: 3788–3796.
- Muffler, A., Traulsen, D. D., Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1996).** Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:1607–1613.
- Muffler, A., Barth, M., Marschall, C. & Hengge-Aronis, R. (1997).** Heat shock regulation of sigma S turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigma S and sigma 32 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 445–452.
- Muhammadi & Ahmed, N. (2007).** Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Curr. Genomics.* **8**: 191-202.
- Nagpal, P., Jafri, S., Reddy, M. A. & Das, H. K. (1989).** Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3133-3138.
- Narberhaus, F., Käser, R., Nocker, A. & Hennecke, H. (1998).** A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. *Mol. Microbiol.* **28**: 315–323.
- Nocker, A., Krstulovic, N. P., Perret, X. & Narberhaus, F. (2001).** ROSE elements occur in disparate rhizobia and are functionally interchangeable between species. *Arch. Microbiol.* **176**: 44–51.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008).** Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 244-254.
- Notley, L., & Ferenci, T. (1996).** Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1465–1468.
- Nover, L. & Scharf, K. D. (1997).** Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 80-103.
- Page, W. J. & von Tigerstrom, M. (1978).** Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1590-1594.
- Parkinson, J. S. & Kofoed, E. C. (1992).** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Parker, L. T. & Socolofsky, M. D. (1966).** Central body of the *Azotobacter* cyst. *J. Bacteriol.* **91**: 297-303.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Servin-González, L. & Espín, G. (2002).** Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. Bacteriol.* **184**: 5672-5677.

- Reusch, R. N. & Sadoff, H. L. (1981).** Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **145**: 889-895.
- Romeo, T. (1998).** Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol. Microbiol. **6**: 1321-1330
- Romero, Y. (2012).** Regulación de la expresión de los genes de biosíntesis de alquilresorcinol por los sistemas Gac, Rsm, el factor sigma RpoS y el regulador transcripcional ArpR en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado, UNAM. 39-44.
- Romero, Y., Moreno, S., Guzman, J., Espin, G. & Segura, D. (2013).** The sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **195**: 1834-1844.
- Roy, S. K. & Nakamoto, H. (1998).** Cloning, characterization, and transcriptional analysis of a gene encoding an α -crystallin-related, small heat shock protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. J. Bacteriol. **180**: 3997-4001.
- Ruppen, M. E., Garner, G. & Sadoff, H. L. (1983).** Protein turnover in *Azotobacter vinelandii* during encystment and germination. J. Bacteriol. **156**: 1243 – 1248.
- Sadoff, H. L. (1975).** Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol. Rev. **39**: 519-539.
- Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M. & Okuda, T. (2008).** Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**: 5093-5098
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
- Sandercock, J. R. & Page, W. J. (2008).** RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. J. Bacteriol. **190**: 946-53.
- Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M.D., Muehlchen, A.M. & Loper, J. E. (1995).** The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 12255-12259.
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003).** Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. Arch. Microbiol. **179**: 437-443.
- Segura, D., Vargas, E. & Espin, G. (2000).** Beta-ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. Gene. **260**: 113-120.
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M. & Espín, G. (2009).** Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. J. Bacteriol. **191**: 3142-3148.
- Senior, P. J., Beech, G. A., Ritchie, G. A. & Dawes, E. A. (1972).** The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. **128**: 1193-1201.

- Shroff, N.P., Cherian-Shaw, M., Bera, S. & Abraham, E.C. (2000).** Mutation of R116C results in highly oligomerized α -crystallin with modified structure and defective chaperone-like function. *Biochemistry*. **39**: 420–1426.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. & Poolman, B. (1995).** Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Sledjeski, D. D., Gupta, A. & Gottesman, S. (1996).** The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**: 3993–4000.
- Smulders, R. H. P. H., Carver, J.A., Lindner, R.A., van Boekel, M.A., Bloemendal, H. & de Jong, W.W. (1996)** Immobilization of the C-terminal extension of bovine α -crystallin reduces chaperone-like activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 29060–29066.
- Socolofsky, M. D. & Wyss, O. (1962).** Resistance of the *Azotobacter* cyst. *J. Bacteriol.* **84**: 119–124.
- Soppa, J. (1999).** Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. *Mol. Microbiol.* **31**: 1295–1305.
- Steigedal, M., Sletta, H., Moreno, S., Maerk, M., Christensen, B. E., Bjerkan, T., Ellingsen, T. E., Espin, G., Ertesvag, H. & Valla, S. (2008).** The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. *Environ. Microbiol.* **10**: 1760-1770.
- Stenkamp, R. E. (1994).** Dioxygen and hemerythrin. *Chem. Rev.* **94**: 715-726
- Stevenson, L. H. & Socolofsky, M. D. (1966).** Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91**: 304 – 310.
- Stock J. B., Surette, M. G., Levit, M. & Park, P. (1995).** Two-component signal transduction system: structure-function relationships and mechanism of catalysis. In: Two-component signal transduction, 25-51. Eds. Hoch, J. A & Silhavy, T. J. (ASM Press, Washington, D. C.).
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E. & Ohman, D. E. (1999).** Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 3890–3897.
- Svanem, B. I., Skjak-Braek, G., Ertesvag, H. & Valla, S. (1999).** Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5 epimerases. *J. Bacteriol.* **181**: 68–77.
- Tatnell, P. J., Russell, N. J. & Gacesa, P. (1994).** GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. *Microbiology*. **140**: 1745–1754
- Thompson, D. K., & Daniels, C. J. (1998).** Heat shock inducibility of an archaeal TATA-like promoter is controlled by adjacent sequence elements. *Mol. Microbiol.* **27**: 541–551.

- Tilly, K., Erickson, J., Sharma, S. & Georgopoulos, C. (1986).** Heat shock regulatory gene *rpoH* mRNA level increases after heat shock in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **168**: 1155-1158.
- Tluscik, F., Kozubek, A., & Mejbaum, W.(1980).** Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. Act. Soc. Bot. Pol. **50**: 645-651.
- Typas A., Becker, G. & Hengge, R. (2007).** The molecular basis of selectivity promoter activation by the sigma S subunit of RNA polymerase. Mol. Microbiol. **63**:1296-1306.
- Valla, S., Li, J., Ertesvag, H., Barbeyron, T. & Lindahl, U. (2001)** Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. Biochimie. **83**: 819–830
- Vayssier, M. & Polla, B.S. (1998).** Heat shock proteins chaperoning life and death. Cell Stress Chaperones. **3**: 221-227.
- Vela, G. R. (1974).** Survival of *Azotobacter* in dry soil. Appl. Microbiol **28**: 77-79
- Vite, O. (2003).** Identificación y caracterización de genes involucrados en la síntesis de lípidos alquilresorcinoles en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1-52.
- Vuorio, R. & Vaara, M. (1992).** The lipid A biosynthesis mutation *lpxA2* of *Escherichia coli* results in drastic antibiotic supersusceptibility. Antimicrob. Agents. Chemother. **36**: 826 – 829.
- Walter, S. & Buchner, J. (2002).** Molecular chaperones- cellular machines for protein folding. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **41**: 1098 – 1113.
- Willsie, J. K. & Clegg, J. S. (2001).** Nuclear p26, a small heat shock/ α -crystallin protein, and its relationship to stress resistance in *Artemia franciscana* embryos. J Exp Biol **204**: 2339-50.
- Xiong, J., Kurtz, D. M., Ai, J. & Sanders-Loehr, J. (2000).** A hemerythrin-like domain in a bacterial chemotaxis protein. Biochemistry. **39**: 5117-5125.

ANEXO 1

Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, 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.

Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*

Miguel Cocotl-Yañez,¹ Arístides Sampieri,¹ Soledad Moreno,¹
Cinthia Núñez,¹ Miguel Castañeda,² Daniel Segura¹ and Guadalupe Espín¹

Correspondence
Guadalupe Espín
espin@ibt.unam.mx

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

²Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Apdo. Postal 1622, C. P. 72000, Mexico

Azotobacter vinelandii is a soil bacterium that undergoes differentiation to form cysts that are resistant to desiccation. Upon induction of cyst formation, the bacterium synthesizes alkylresorcinols that are present in cysts but not in vegetative cells. Alternative sigma factors play important roles in differentiation. In *A. vinelandii*, AlgU (sigma E) is involved in controlling the loss of flagella upon induction of encystment. We investigated the involvement of the sigma factor RpoS in cyst formation in *A. vinelandii*. We analysed the transcriptional regulation of the *rpoS* gene by PsrA, the main regulator of *rpoS* in *Pseudomonas* species, which are closely related to *A. vinelandii*. Inactivation of *rpoS* resulted in the inability to form cysts resistant to desiccation and to produce cyst-specific alkylresorcinols, whereas inactivation of *psrA* reduced by 50 % both production of alkylresorcinols and formation of cysts resistant to desiccation. Electrophoretic mobility shift assays revealed specific binding of PsrA to the *rpoS* promoter region and that inactivation of *psrA* reduced *rpoS* transcription by 60 %. These results indicate that RpoS and PsrA are involved in regulation of encystment and alkylresorcinol synthesis in *A. vinelandii*.

Received 20 October 2010
Revised 10 March 2011
Accepted 28 March 2011

INTRODUCTION

Azotobacter vinelandii is a soil bacterium that undergoes a differentiation process in its life cycle, resulting in cyst formation. A mature cyst consists of a contracted cell, known as the central body, which is surrounded by a capsule made up of a laminated outer layer called the exine and an inner layer called the intine. When growing on glucose or sucrose, cysts are formed at late stationary phase by 0.01 % of the cells (Lin & Sadoff, 1968). However, encystment can be induced in a higher percentage of cells (10 % or more) by removing glucose or sucrose from exponentially growing cultures and replacing the glucose or sucrose with either n-butanol or β -hydroxybutyrate as the sole carbon source (Lin & Sadoff, 1968).

The extracellular polysaccharide alginate is a major component of the exine and intine layers of the cyst (Sadoff, 1975) and is essential for the differentiation process; mutations in alginate biosynthetic genes impair the formation of cysts (Campos *et al.*, 1996; Mejía-Ruiz *et al.*, 1997). Other components of the cyst are the

alkylresorcinols, which replace the phospholipids of the cyst membranes during differentiation and are components of the exine layer (Reusch & Sadoff, 1983). Alkylresorcinols play a structural role in the exine, as strains carrying mutations in alkylresorcinol biosynthetic genes produce cysts with a defective exine. However, despite the defective exine layer, the cysts remain resistant to desiccation (Segura *et al.*, 2009).

Alternative sigma factors play important roles in bacterial differentiation and adaptation to a variety of environmental conditions. In *A. vinelandii*, the sigma factor AlgU participates in the encystment process by controlling both alginate synthesis (Moreno *et al.*, 1998) and the loss of flagella that occurs upon cyst formation (León & Espín, 2008). Mechanistically, AlgU promotes the transcription of the *algC* gene, which is involved in alginate biosynthesis, and *cydR*, which is involved in repressing transcription of the flagella regulator FlhDC (Gaona *et al.*, 2004; León & Espín, 2008).

The sigma factor RpoS is a central regulator during stationary phase in bacteria (for a recent review see Navarro Llorens *et al.*, 2010). In *Pseudomonas* species, which are phylogenetically closely related to *A. vinelandii* (Setubal *et al.*, 2009), RpoS regulates quorum sensing, virulence and many stationary phase genes (Schuster *et al.*,

Abbreviations: EMSA, electrophoretic mobility shift assay; qRT-PCR, quantitative RT-PCR.

A supplementary table of primer sequences is available with the online version of this paper.

2004). Regulation of *rpoS* in *Pseudomonas* differs from its regulation in *Escherichia coli* (Venturi, 2003). In *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*, *rpoS* is transcribed from a typical sigma 70-dependent promoter located within the upstream *nlpD* gene. Transcription of *rpoS* increases upon entry into stationary phase and is activated by PsrA, a regulator of the TetR family (Kojic & Venturi, 2001; Kojic *et al.*, 2002). PsrA specifically binds to DNA regions in the *rpoS* and *psrA* promoters containing C/GAAAC N2-4 GTTTG/C sequences (Kojic *et al.*, 2002). PsrA activates the *exsCEBA* operon of the type III secretion system (Shen *et al.*, 2006) involved in the secretion of exotoxins. PsrA also acts as an auto-repressor, and as a repressor of the *fadBA5* β -oxidation operon (Kojic & Venturi, 2001; Kang *et al.*, 2008). Repression of *fadBA5* is relieved by PsrA binding to long-chain fatty acids (Kang *et al.*, 2008), which also decreases *rpoS* and *exsC* expression (Kang *et al.*, 2009).

In the cyst-forming bacterium *A. vinelandii*, RpoS is required for the activation of one of the three promoters driving transcription of the alginate biosynthetic gene *algD* (Castañeda *et al.*, 2001), and for activation of one of the two promoters of *phbB*, a gene involved in polyhydroxybutyrate biosynthesis (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Under non-desiccating solid-medium growth conditions, the non-mucoid *A. vinelandii* strain UW136 remained viable for 16.5 years, while its *rpoS* mutant strain remained viable for only 10 months (Sandercock & Page, 2008). RpoS was

also required for survival under oxidative stress and in conditions of either carbon or nitrogen starvation (Sandercock & Page, 2008).

As mentioned above, a low percentage of encystment occurs in late stationary phase *A. vinelandii* cultures. Therefore, it is possible that RpoS is involved in the encystment process. The aim of this study was to investigate the role of RpoS in the formation of cysts and the role of PsrA in the regulation of *rpoS* expression in *A. vinelandii*.

METHODS

Microbiological procedures. Bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. Oligonucleotides used are listed in Supplementary Table S1, available with the online version of this paper. *A. vinelandii* was grown at 30 °C in Burk's nitrogen-free salts medium (Kennedy *et al.*, 1986) supplemented with 2% sucrose (BS) or 0.2% n-butanol (BBOH). *E. coli* strains DH5 α and Top10 were grown on Luria-Bertani medium (LB) at 37 °C. Antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were as follows: ampicillin, 0 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; nalidixic acid, 30 and 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$; spectinomycin, 50 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$; and kanamycin, 1 and 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Transformation and conjugation of *A. vinelandii* were carried out as previously described by Page & von Tigerstrom (1978) and Bali *et al.* (1992). Alkylresorcinol production was measured as described previously (Segura *et al.*, 2003).

Construction of *psrA* mutant strain. Primers upLexA and lwPsrA were used to amplify a PCR fragment of 1.5 kb containing the

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Reference or source
<i>A. vinelandii</i> strains		
ATCC 9046	Wild-type	Laboratory collection
CNS59	ATCC 9046 derivative carrying an <i>rpoS</i> ::Sp mutation	Castañeda <i>et al.</i> (2001)
ATpsrA	ATCC 9046 derivative carrying a <i>psrA</i> ::Sp mutation	This study
CNS59/pSMrpoS	CNS59 harbouring plasmid pSMrpoS	This study
CNS59/pBBR1MCS-2	CNS59 harbouring plasmid pBBR1MCS-2	This study
OV11	SW136 derivative carrying an <i>arsA</i> ::Tn5SSgusA40 mutation	Segura <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan (1983)
Top10	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
LMG194	<i>F</i> ⁻ Δ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>thi</i> <i>rpsL</i> Δ <i>phoA</i> (<i>Pvu</i> II) Δ <i>ara714</i> <i>leu</i> ::Tn10	Invitrogen
Plasmid		
pMOSBlue	Cloning vector	Amersham
pBAD-TOPO	Cloning and expression vector	Invitrogen
pBBR1MCS-2	Cloning vector with a kanamycin resistance cassette	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pMP01	pBSL97 derivative with an <i>Sp-gusA</i> cassette	Peralta-Gil <i>et al.</i> (2002)
pASpsrA	pMOSBlue containing a 1.5 bp fragment with the <i>psrA</i> gene	This study
pASpsrA::Sp	pASpsrA containing a <i>psrA</i> ::Sp mutation	This study
pMrpoS	pMOSBlue containing 413 bp corresponding to the <i>rpoS</i> promoter region	This study
pMrpoS-2	pMOSBlue containing 622 bp corresponding to the <i>rpoS</i> promoter region	This study
pMpsrA	pMOSBlue containing 317 bp corresponding to the <i>psrA</i> promoter region	This study
pMpsrAhis	pBAD-TOPO containing the <i>psrA</i> gene fused to 6 $\times$ His coding nucleotides	This study
pSMrpoS	pBBR1MCS-2 containing the <i>rpoS</i> gene under the Km promoter	This study

complete *psrA* gene by using chromosomal DNA of *A. vinelandii* ATCC 9046 as template. This fragment was ligated into the pMOSblue vector (Amersham) to obtain plasmid pASpsrA. An *Xho*I digest of pASpsrA was ligated to a *Xho*I fragment containing the spectinomycin cassette excised from vector pMP01. This generated plasmid pASpsrA::Sp, which was transformed into strain ATCC 9046. A spectinomycin-resistant transformant (ATpsrA) generated by a double recombination event was isolated and confirmed as carrying the *psrA*::Sp mutation by Southern blot analysis and PCR by using primers upLexA and lwPsrA (data not shown).

Construction of plasmids pMrpoS, pMrpoS-2, pMpsrA and pSMrpoS. A 413 bp fragment corresponding to the promoter region of *rpoS* (nucleotides -281 to +132), a 622 bp fragment of the promoter region of *rpoS* (nucleotides -404 to +208) and a 317 bp fragment of the promoter region of *psrA* (nucleotides -225 to +92) were amplified by PCR using primers rpoSmiguF/rpoSmiguR, emsaSup/dwRT-rpoS and psrAmiguF/psrAmiguR, respectively. The products were cloned into pMOSblue in accordance with the manufacturer's instructions (Amersham), resulting in plasmids pMrpoS, pMrpoS-2 and pMpsrA. A promoter-less *rpoS* gene flanked by *Hind*III and *Bam*HI restriction sites was amplified by PCR by using primers rpoScod-up and rpoScod-lw. The product was cloned into plasmid pBBR1MCS-2 digested with the *Hind*III and *Bam*HI enzymes. This produced plasmid pSMrpoS with *rpoS* under the control of the kanamycin promoter. pSMrpoS, which was able to replicate in *A. vinelandii*, was transferred by conjugation into strain CNS59 to produce strain CNS59/pSMrpoS.

Nucleic acid procedures. DNA isolation, cloning and random primer procedures were carried out as described by Sambrook *et al.* (1989). DNA sequencing was done with a Perkin Elmer/Applied Biosystems DNA sequencer.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Expression of *rpoS* and *psrA* was measured by qRT-PCR, as previously reported (Noguez *et al.*, 2008). For RNA extraction, cultures were grown in BS or BBOH media. Cells were collected at the stationary phase of growth. The primers used for the qRT-PCR assays (Supplementary Table S1) were as follows: upRT-rpoS/dwRT-rpoS for *rpoS* expression, upRT-psrA/dwRT-psrA for *psrA* expression and fw-gyrA/rev-gyrA for *gyrA* expression. Expression of *gyrA* was used as an internal control to normalize the results. All assays were performed in triplicate. The data are presented as fold changes (mean $\pm$ SD) of mRNA levels of the mutant strain relative to those of the wild-type.

Cloning and purification of His₆-PsrA. To express and purify PsrA, a 714 bp fragment corresponding to the *psrA* gene lacking the first and last codons was amplified by PCR using high fidelity *Taq* polymerase (Invitrogen), and primers uppsrAprot and dwpsrAprot. The resulting PCR product was ligated into plasmid pBAD-TOPO (Invitrogen). The ligation mix was transformed into *E. coli* strain Top10 (Invitrogen) and a transformant carrying plasmid pMpsrAhis was isolated. The plasmid was isolated, sequenced to confirm the presence of an intact *psrA* gene and transformed into *E. coli* LMG149. Expression of His₆-PsrA in strain LMG/pMpsrAhis was induced by the addition of arabinose (0.2%). After a 4 h induction, protein purification was performed at 4 °C under non-denaturing conditions by using a nickel resin column, as described in the manufacturer's protocol. The elution buffer was also used as the storage buffer [0.1 M Tris/HCl, 30 mM potassium glutamate, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 20% (v/v) glycerol (pH 8.0)]. The proteins were concentrated by using Microcon YM-10 centrifugal filters (Amicon) and stored at -4 °C. Protein concentrations were determined by using the Lowry method using BSA as a standard. SDS-PAGE of the purified protein revealed the expected molecular mass of approximately 27 kDa (data not shown).

DNA gel mobility shift assays. A 225 bp and a 263 bp DNA fragment, corresponding to the intergenic *rpoS-nlpD* and *psrA-lexA* intergenic regions, respectively, were amplified from *A. vinelandii* ATCC 9046 chromosomal DNA by PCR using primers emsaSup/emsaSdwn for the *rpoS* region and emsaPsup/psrAprim for the *psrA* region. DNA binding reactions were carried out in a total volume of 20 μ l. The reactions contained the DNA binding buffer [10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% (v/v) glycerol and 10 μ g BSA μ l⁻¹], and 100 nM of each DNA fragment was labelled with [γ -³²P]dCTP and variable amounts of PsrA (0–3 μ M). As a negative control a 245 bp fragment of DNA corresponding to the promoter region of *phbR* was used (Peralta-Gil *et al.*, 2002). This fragment was obtained by PCR using primers emsaRini and emsaRb2. DNA binding reactions were carried out at room temperature for 25 min, and the samples were then subjected to native PAGE in 6% polyacrylamide gels in a buffer containing 90 mM Tris, 90 mM H₃BO₃ and 2 mM EDTA. The gel was dried and radioactive signals were detected by autoradiography.

Primer extension analysis assays and high-resolution S1 nuclease mapping. Total RNA was isolated from *A. vinelandii* ATCC 9046 cultures grown for 36 h in BS liquid medium. Primer extension experiments were carried out at 42 °C by using AMV reverse transcriptase (Roche) with primers rpoSprim1, emsaSdwn and psrAprim, and the cDNAs were end-labelled with [γ -³²P]-dATP by using polynucleotide kinase (Roche). The sequencing ladders were generated with the same primers by using a Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (USB) and plasmid pMrpoS, pMSrpoS-2 or pMpsrA as template. High-resolution S1 nuclease mapping was carried out as reported previously (Peralta-Gil *et al.*, 2002). The labelled primers used to map the *rpoS* transcriptional start sites were rpoSprim1 and emsaSdwn and the unlabelled primers were rpoSP1-S1up and emsaSup for Pr1 and Pr2, respectively; these primers generated a 302 and 225 bp *rpoS* probe. For *psrA*, the labelled primer was psrAprim and the unlabelled primer was emsaPsup, generating a 263 bp *psrA* probe.

Encystment and electron microscopy assays. Encystment was induced by transferring washed cells from 36 h BS liquid cultures to BBOH medium plates. Desiccation-resistance assays were carried out as described previously (Campos *et al.*, 1996; Segura *et al.*, 2009). Cells were collected after 5 days in the induction medium and were desiccated at 30 °C on 0.2 μ m membranes for 5 days. Surviving cells, quantified by viable cell count, were considered mature cysts. Electron microscopy was carried out as previously reported (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997).

Hydrogen peroxide sensitivity. This assay was conducted as described by Sandercock & Page (2008), with some modifications. *A. vinelandii* cultures were grown to stationary phase (48 h) in liquid BS medium. At this time the cultures were centrifuged, and the cell pellet was washed twice with sterile Burk's buffer salts to remove the alginate. Cells were resuspended in an appropriate volume to obtain (approximately) 2.0×10^8 c.f.u. ml⁻¹. Hydrogen peroxide was added to a final concentration of 300 mM, and after 20 min of incubation at 30 °C, viable cells were determined by serial dilutions to detect survival above 0.001%.

RESULTS

Encystment in the *rpoS* and *psrA* mutants

To study the effect of *rpoS* and *psrA* mutations on encystment, strain ATpsrA carrying a *psrA*::Sp mutation was constructed as described in Methods. When grown in

BS medium, the *psrA* mutant strain ATpsrA and *rpoS* mutant strain CNS59 showed growth rates and alginate production similar to the parental wild-type strain ATCC 9046 (data not shown). To induce synchronous encystment, *A. vinelandii* *psrA* and *rpoS* mutant strains were cultured in liquid BS medium and then transferred to BBOH plates. The *rpoS* mutant strain CNS59 was unable to produce mature cysts resistant to desiccation; however, the *psrA* mutant formed mature desiccation-resistant cysts, although to a reduced percentage compared with the wild-type (Table 2). Electron microscopic examination of the cysts formed by the *rpoS* and *psrA* mutants was performed (Fig. 1a). Cysts of the *psrA* mutant strain were similar to mature cysts of the wild-type strain ATCC 9046; cysts were composed of the compacted cell (central body containing numerous polyhydroxybutyrate granules) surrounded by the intine capsule and the exine outer layer. In contrast, cells of the *rpoS* strain that were induced to encyst lacked both intine and exine layers.

As cellular synthesis of cyst-specific alkylresorcinols is indicative of cyst formation (Segura *et al.*, 2009), the presence of alkylresorcinols was examined in the cysts of each strain. After 5 days of incubation, plates were sprayed with a solution containing 0.5 % Fast Blue in 5 % acetic acid. Colonies of the wild-type and *psrA* mutant developed a red colour, indicative of the presence of alkylresorcinols, whereas colonies of the *rpoS* or *arsA* mutant (carrying a mutation in the alkylresorcinol biosynthetic gene *arsA*, used as a negative control) remained white (Fig. 1b). Alkylresorcinols were quantified in these strains after 5 days of incubation in BBOH liquid medium. Whereas the *psrA* mutant strain ATpsrA produced 50 % of the alkylresorcinols produced by the wild-type strain ATCC 9046, no alkylresorcinols were detected in the *rpoS* mutant strain CNS59 (Table 2), confirming the inability of this strain to produce these phenolic lipids. Plasmid pSMrpoS carrying a wild-type copy of *rpoS* but not the vector pBBR1MCS-2 restored the ability of strain CNS59 to encyst and to produce alkylresorcinols (Fig. 1b, Table 2). These results indicate that RpoS and PsrA play a role in the formation of mature cysts that are resistant to desiccation.

Sensitivity of *rpoS* and *psrA* mutants to hydrogen peroxide

In strain UW, a non-mucoid derivative of the *A. vinelandii* strain OP, inactivation of *rpoS* reduced survival to

hydrogen peroxide stress, and stationary phase cells were rapidly killed by exposure to 15 mM H₂O₂ (Sandercock & Page, 2008). Hydrogen peroxide sensitivity was tested in the wild-type strain ATCC 9046 and its *rpoS* and *psrA* mutant derivatives. Following 20 min of exposure to 300 mM H₂O₂ there was $86 \pm 8\%$ survival of wild-type cells and $95 \pm 5\%$ survival of *psrA* mutant cells. However, no viable cells of the *rpoS* mutant strain CNS59 were recovered. Plasmid pSMrpoS, but not vector pBB1MCS-2, restored survival of strain CNS59 to $75 \pm 5\%$. Taken together, these results suggest that RpoS, but not PsrA, plays a role in survival of *A. vinelandii* following hydrogen peroxide stress.

PsarA is required for maximal *rpoS* transcription and binds to the *rpoS* promoter region

The negative effect on encystment and alkylresorcinol production exerted by the *rpoS* and *psrA* mutants suggested that similar to *Pseudomonas* species, PsrA could be an activator of *rpoS* transcription (Kojic & Venturi, 2001). Indeed, the intergenic *nlpD*–*rpoS* region and the 3' end of the *nlpD* gene are highly conserved among *P. aeruginosa*, *P. putida* and *A. vinelandii*; furthermore, the palindromic motif C/GAAAC N2-4 GTTTG/C, to which PsrA binds in the *rpoS* regulatory region of *P. aeruginosa* (Kojic *et al.*, 2002), is present in *A. vinelandii* (see Fig. 3b). Expression of *rpoS* in *A. vinelandii*, as determined by Northern blot analysis, is under growth phase regulation. Highest expression was found in stationary phase whereas a low-level of expression was detected in exponentially growing cells (Castañeda *et al.*, 2001; Sandercock & Page, 2008).

To investigate the role of PsrA in the regulation of *rpoS*, qRT-PCR was used to determine the effect of the *psrA*::Sp mutation on the transcription of *rpoS*. The level of *rpoS* mRNA was determined in cells harvested at stationary phase. The relative expression level (0.37 ± 0.1 in BS; 0.34 ± 0.11 in BBOH) of *rpoS* mRNA was reduced in the *psrA* mutant compared with the wild-type (1.0), regardless of whether the cells were vegetative or cysts.

To determine whether PsrA binds to the *rpoS* promoter region, an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed with PsrA. A DNA fragment of 225 bp containing the putative PsrA binding sites in the *rpoS* upstream region was amplified by PCR and subjected to an EMSA with purified PsrA, as described in Methods.

Table 2. Encystment and alkylresorcinol production in *A. vinelandii*

Strain	Genotype	Encystment (%)	Alkylresorcinols [$\mu\text{g (mg protein)}^{-1}$]
ATCC 9046	Wild-type	13.9 ± 2.6	12.3 ± 0.3
CNS59	<i>rpoS</i> ::Sp	<0.0001	<0.01
ATpsrA	<i>psrA</i> ::Sp	7.6 ± 1.9	5.8 ± 0.06
CNS59/pSMrpoS	<i>rpoS</i> ::Sp/ <i>rpoS</i> ⁺	8.2 ± 3.3	5.1 ± 0.07
CNS59/pBBR1MCS-2	<i>rpoS</i> ::Sp/pBBR1MCS-2	<0.0001	<0.01

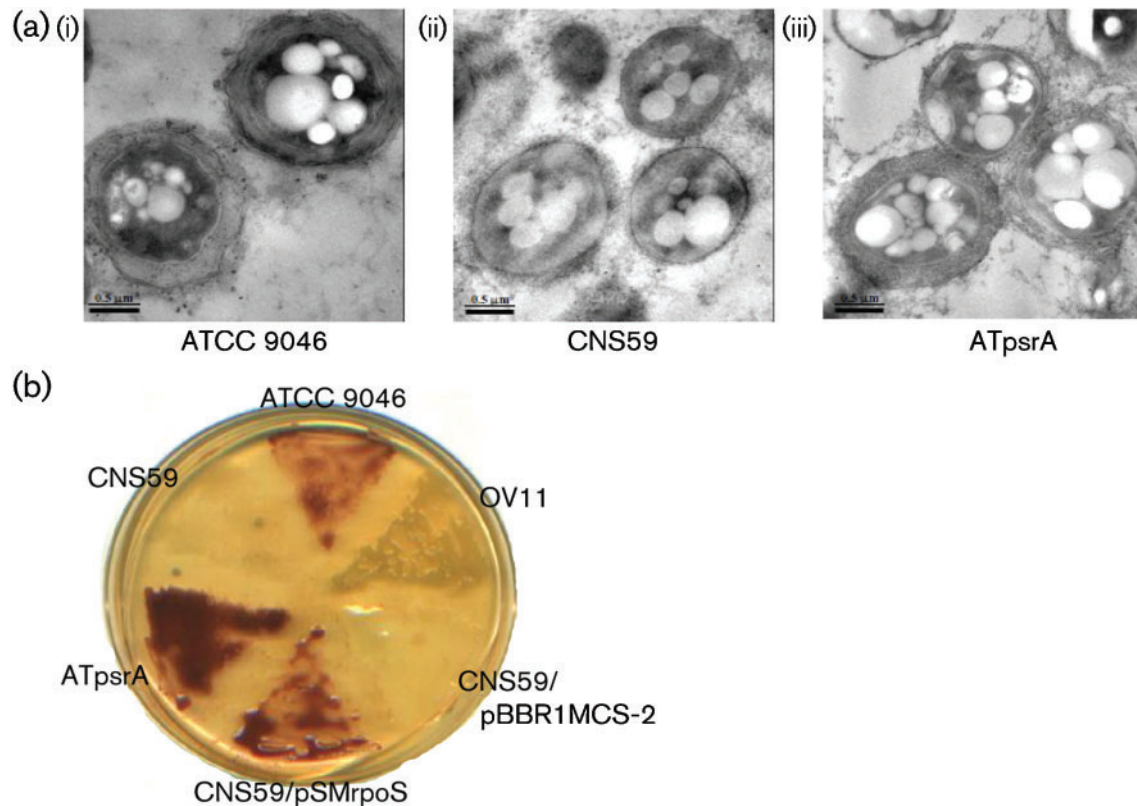


Fig. 1. Effect of *rpoS* or *psrA* mutation on cyst formation and alkylresorcinol synthesis. (a) Electron micrographs of the cysts formed by strains ATCC 9046 (i), CNS59 (ii) and ATpsrA (iii). Bar, 0.5 μm. (b) Alkylresorcinol staining of the wild-type strain ATCC 9046, the *psrA* mutant ATpsrA, the *rpoS* mutant CNS59 and the complemented strain CNS59/pSMrpoS. Strain *rpoS* with plasmid vector CNS59/pBBR1MCS-2 and the *arsA* mutant OV11, which are unable to produce alkylresorcinols, were used as controls. Cells were induced to encyst on BBOH medium for 5 days before staining.

Fig. 2(a) shows the binding of PsrA to this fragment, but not to a non-specific 245 bp DNA fragment corresponding to the *phbR* promoter region (Peralta-Gil *et al.*, 2002) used as a negative control. Competition assays using increasing concentrations of the unlabelled 225 bp fragment were carried out as controls to demonstrate specificity (Fig. 2b). These results indicate that PsrA directly activates the expression of *rpoS*.

Identification of the *rpoS* and *psrA* transcription start sites

We identified the transcription start sites upstream of the *rpoS* and *psrA* genes by primer extension analysis with total RNA isolated from stationary-phase cultures of strain ATCC 9046 grown on BS medium as described in Methods. The primers for mapping the promoters are shown in Supplementary Table S1 (available with the online version of this paper). Two transcriptional start sites were identified for *rpoS* (Fig. 3a). They were located 68 and 358 nt upstream of the ATG start codon, defining the Pr1 and Pr2 promoters (Fig. 3b). These two start sites have also been detected by S1-mapping analysis in the reference wild-type strain UW136

(data not shown), confirming the presence of the Pr1 and Pr2 promoters. Notably, the transcription start site of Pr2 is located 48 nt downstream of the putative PsrA binding sites (Fig. 3b), similar to the *Pseudomonas rpoS* transcription start site reported by Kojic *et al.* (2002).

For *psrA*, two transcriptional start sites, located 21 and 35 nt upstream of *psrA*, were also identified by primer extension (Fig. 4), and by S1-mapping analysis in strain UW136 (data not shown), defining promoters Ps1 and Ps2, respectively. The Ps1 –10 and –35 sequences (TGTC CGA_{N18}-TTCAAA) were similar to the *psrA* promoter from *P. putida* (TCAC CGA_{N18}-CTGAAA) (Fig. 4). The –10 sequence (CAATACA) of Ps2 overlapped with the Ps1 promoter (Fig. 4). No consensus sequence for the –35 region was observed for Ps2.

PsrA auto-regulation

In *P. aeruginosa*, PsrA negatively regulates its own expression by binding to the consensus PsrA binding sequences located between the –18 and +20 region of the *psrA* promoter (Kojic *et al.*, 2002). We determined the

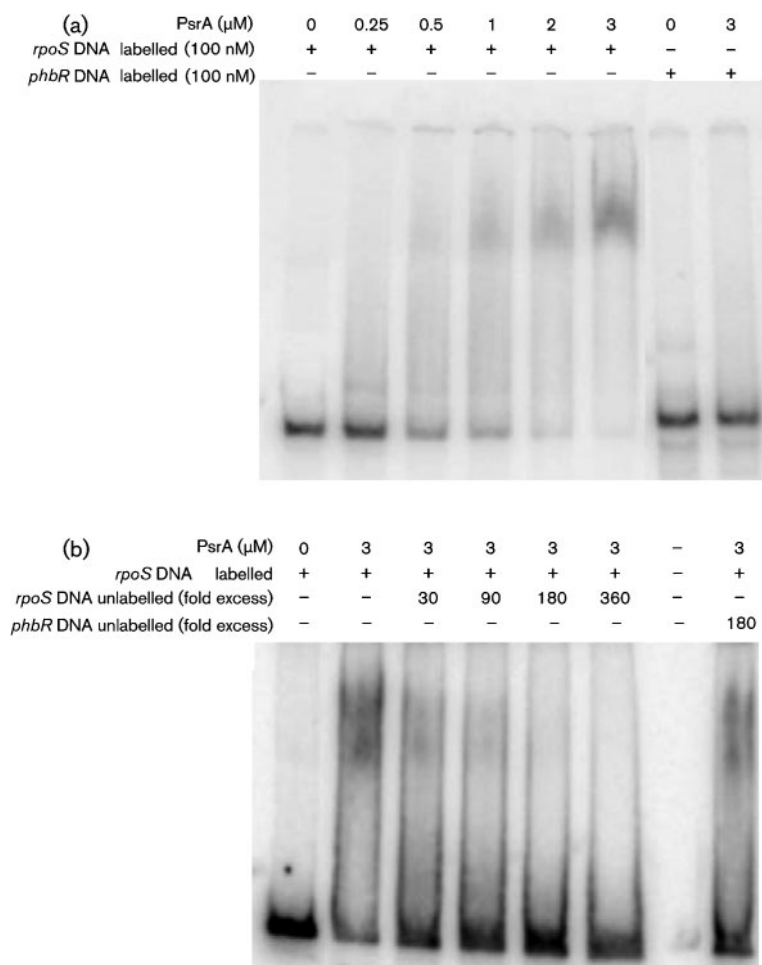


Fig. 2. (a) EMSA with different amounts of the purified PsrA protein, and a DNA fragment containing the *rpoS* promoter (Pr2) or the *phbR* promoter region used as negative control. (b) Competition with different amounts of the same unlabelled DNA fragments.

effect of the *psrA* mutation on the transcription of *psrA* *in vivo* by qRT-PCR. In the *psrA* mutant strain ATpsrA, the Sp-*gusA* cassette was inserted between nucleotides 240 and 241 of the 720 nt *psrA* coding sequence. Thus, we were able to monitor *psrA* transcription in this strain by qRT-PCR by using oligonucleotides corresponding to the first 100 nt of the *psrA* 5' coding region. Inactivation of *psrA* increased the relative level of the *psrA* mRNA by fivefold (4.93 ± 2) compared with the wild-type strain (1.0). We next determined whether *A. vinelandii* PsrA binds to its own promoter region to mediate the observed increase in *psrA* transcription. A 263 bp DNA fragment (RRpsrA), corresponding to the *psrA*-*lexA* intergenic region, was amplified by PCR and subjected to EMSA with purified PsrA. Fig. 5(a) shows the binding of PsrA to RRpsrA DNA. Competition assays using increasing concentrations of unlabelled RRpsrA were carried out as a specificity control (Fig. 5b). These results indicate that PsrA specifically interacts with its own promoter region to act as a repressor. No consensus sequences for PsrA binding (C/GAAAC N2-4 GTTTG/C) were identified in the *A. vinelandii* *psrA* regulatory region. However, the sequence CAAAG, corresponding to the -10 sequence of the Ps1 promoter (Fig. 4), could be the PsrA binding site for repression of *psrA*.

DISCUSSION

Here, we describe some phenotypic characteristics of *rpoS* and *psrA* mutants and show evidence of the involvement of these regulators in the process of encystment in *A. vinelandii*. When cells of the *rpoS* mutant strain CNS59 were induced to differentiate, the cysts completely lacked the exine and intine layers and were unable to form capsulated cyst cells. Consistent with this observation, *rpoS* mutant cysts were unable to resist desiccation. An early electron microscopy study of the development of *A. vinelandii* cysts (Wyss *et al.*, 1961) revealed that the exine appears 36–48 h after encystment induction, after which the exine thickens and the intine is formed between the exine and the central body. This time point seems to correlate with the stage at which cyst development is blocked in the *rpoS* mutant. Interestingly, it seems to be the same stage at which encystment stops in mutants that are unable to synthesize alginate, an essential component of the intine and exine layers of the cysts. However, inactivation of *rpoS* did not prevent alginate synthesis (Castañeda *et al.*, 2001; this study, data not shown). Therefore, the inability of the *rpoS* mutant to form the intine and exine layers is not caused by the absence of alginate. The involvement of RpoS in the control of encystment is also shown by the

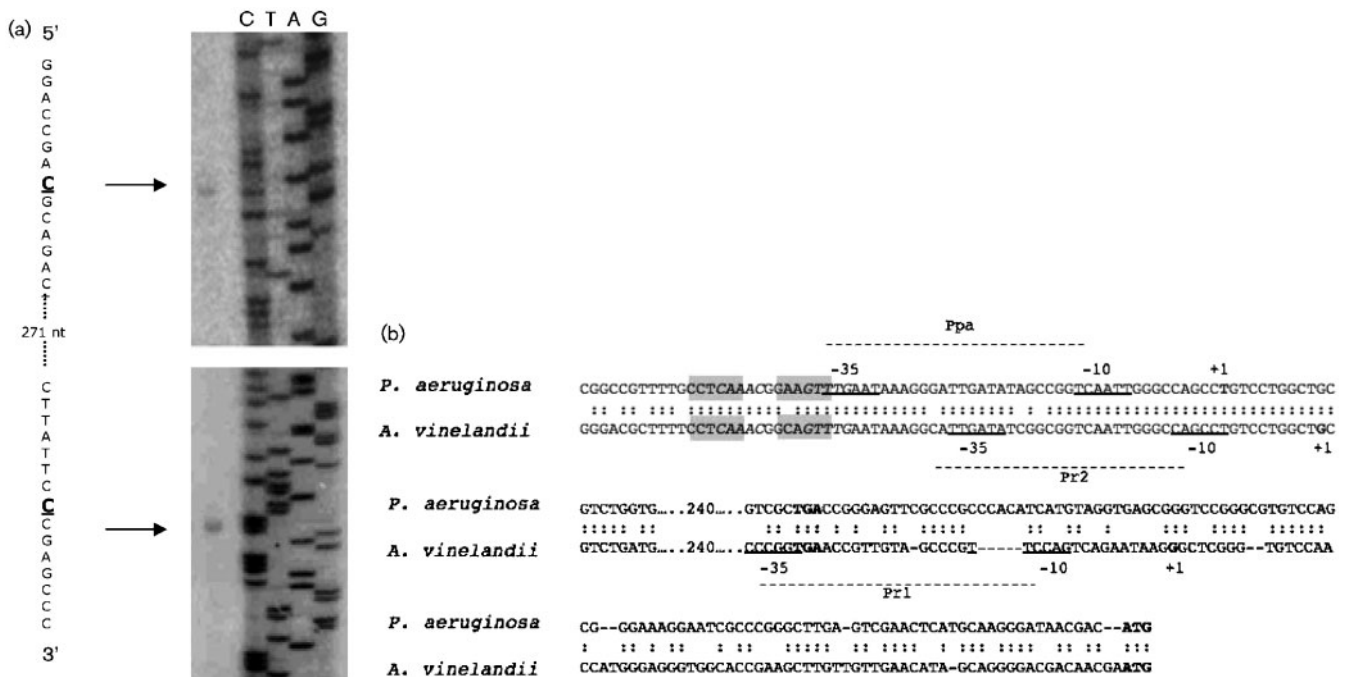


Fig. 3. (a) Identification of transcription start sites of *rpoS* by primer extension analysis by using total RNA isolated from strain ATCC 9046. (b) Alignment of the upstream sequences of the *rpoS* gene from *P. aeruginosa* and *A. vinelandii*. The sequences recognized by PsrA are shown in grey boxes. The *rpoS* promoters from *P. aeruginosa* (Ppa) and *A. vinelandii* (Pr1 and Pr2) are indicated. The transcription start site (+1), the *nlpD* stop codon (TGA) and the *rpoS* ATG translation start codon are shown in bold. Arrows indicate the start sites of transcription.

inability of the *rpoS* mutant strain CNS59 to synthesize cyst-specific alkylresorcinols (Segura *et al.*, 2009). However, the mechanism of alkylresorcinol regulation remains unknown. The lack of alkylresorcinols is not responsible for the inability of the *rpoS* mutant CNS59 to resist desiccation or to form mature cysts; we previously reported that although alkylresorcinols play a structural role in the exine layer, they are not essential for either cyst formation or desiccation resistance (Segura *et al.*,

2009). These results indicate that other genes under the control of RpoS are essential for cyst formation.

In *P. aeruginosa*, PsrA has roles as an activator of *rpoS* (Kojic & Venturi, 2001) and as an auto-repressor (Kojic *et al.*, 2002). This study showed that, similarly, in *A. vinelandii* PsrA also has a dual role as an activator of *rpoS* expression and as an auto-repressor. However, inactivation of *psrA* in *A. vinelandii* reduced transcription of *rpoS* by

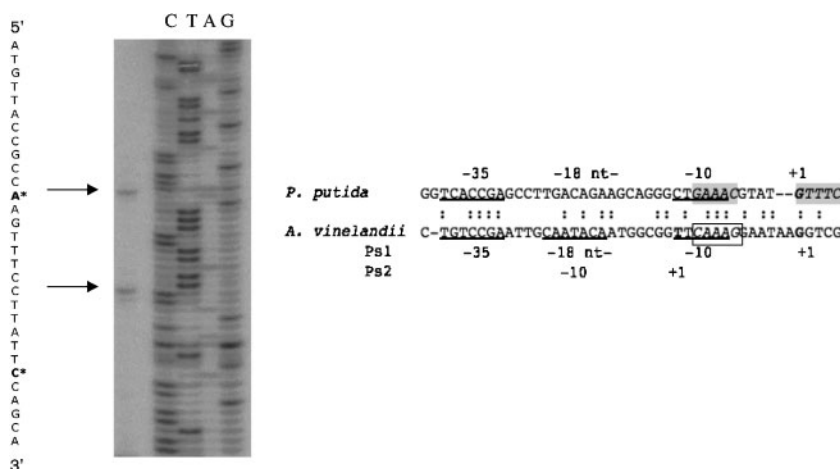


Fig. 4. Primer extension analysis of the *psrA* gene and comparison of the sequence of the promoter region of *psrA* from *P. putida* and *A. vinelandii*. The +1, -10 and -35 positions are shown. The sequences recognized by PsrA in *P. putida* are indicated as grey boxes and in *A. vinelandii* as a white box. Arrows indicate the start sites of transcription.

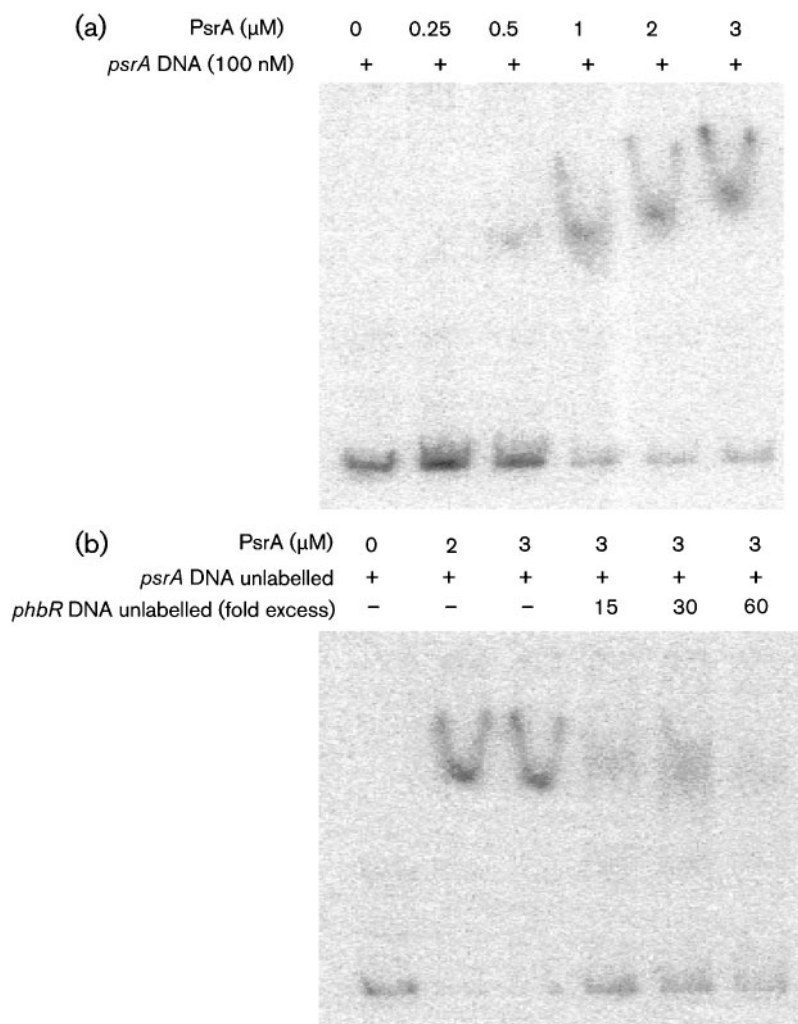


Fig. 5. (a) EMSA with different amounts of purified PsrA protein, and a DNA fragment containing the *psrA* promoters. (b) Competence with different amounts of the same unlabelled DNA fragments.

60%, whereas in *Pseudomonas* species *psrA*-null mutants show an 80% reduction in *rpoS* promoter activity (Kojic & Venturi, 2001). Thus, the level of activation of *rpoS* by PsrA seems to be lower in *A. vinelandii* than in *Pseudomonas*. In *A. vinelandii* the *rpoS* mutation caused an inability to encyst, to produce alkylresorcinols and to resist hydrogen peroxide-induced stress, whereas for the *psrA* mutant only a reduction in the synthesis of alkylresorcinols and in the formation of mature cysts were observed. We therefore conclude that although PsrA positively activates *rpoS* expression, the *psrA* mutant produced a level of RpoS protein that allowed encystment and alkylresorcinol synthesis, although to a reduced level.

A single promoter driving transcription of *rpoS* has been identified in *Pseudomonas* (Kojic *et al.*, 2002). In contrast, two transcription start sites were identified for the *rpoS* gene in *A. vinelandii*. One of these promoters (Pr2) is similar to the promoter identified in *Pseudomonas*; it is located far upstream of the *rpoS* start codon within the *nlpD* coding region and is close to the PsrA binding sites. The differences observed in the level of regulation of *rpoS*

by PsrA between *Pseudomonas* and *Azotobacter* could be related to the presence of a second promoter directing transcription of *rpoS* in *A. vinelandii*. Additionally, the difference in *rpoS* regulation might be related to the requirement of RpoS for encystment in *A. vinelandii*, a process not carried out by *Pseudomonas* species.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge Guadalupe Zavala and Paul Gaytan for technical support. This study was supported by PAPIIT through grant number IN222809-2. M. C. and A. S. wish to thank CONACyT for financial support.

REFERENCES

- Bali, A., Blanco, G., Hill, S. & Kennedy, C. (1992). Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1711–1718.
- Campos, M., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espin, G. & Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene

- coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **178**, 1793–1799.
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. & Espín, G. (2001).** The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**, 6787–6793.
- Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. S., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (2004).** Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 199–206.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 57–580.
- Kang, Y., Nguyen, D. T., Son, M. S. & Hoang, T. T. (2008).** The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* beta-oxidation operon. *Microbiology* **154**, 1584–1598.
- Kang, Y., Lunin, V. V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M. J. & Hoang, T. T. (2009).** The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **73**, 120–136.
- Kennedy, C., Gamal, R., Humphrey, 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 banks. *Mol Gen Genet* **205**, 318–325.
- Kojic, M. & Venturi, V. (2001).** Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J Bacteriol* **183**, 3712–3720.
- Kojic, M., Aguilar, C. & Venturi, V. (2002).** TetR family member *psrA* directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J Bacteriol* **184**, 2324–2330.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., II & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- León, R. & Espín, G. (2008).** *flhDC*, but not *fleQ*, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiology* **154**, 1719–1728.
- Lin, L. P. & Sadoff, H. L. (1968).** Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *J Bacteriol* **95**, 2336–2343.
- Mejía-Ruiz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G. & Espín, G. (1997).** Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 101–106.
- Moreno, S., Nájera, R., Guzmán, J., Soberón-Chávez, G. & Espín, G. (1998).** Role of alternative sigma factor algU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **180**, 2766–2769.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A. & Martínez-García, E. (2010).** Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 476–495.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008).** Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**, 244–254.
- Page, W. J. & von Tigerstrom, M. (1978).** Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can J Microbiol* **24**, 1590–1594.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. (2002).** Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* **184**, 5672–5677.
- Reusch, R. N. & Sadoff, H. L. (1983).** Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature* **302**, 268–270.
- Sadoff, H. L. (1975).** Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* **39**, 516–539.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandercock, J. R. & Page, W. J. (2008).** RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. *J Bacteriol* **190**, 946–953.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. & Greenberg, E. P. (2004).** The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973–985.
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003).** Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* **179**, 437–443.
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M. & Espín, G. (2009).** Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J Bacteriol* **191**, 3142–3148.
- Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espín, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D. & other authors (2009).** Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* **191**, 4534–4545.
- Shen, D. K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B. & Toussaint, B. (2006).** PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**, 1121–1129.
- Venturi, V. (2003).** Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol Microbiol* **49**, 1–9.
- Wyss, O., Neumnn, M. G. & Socolofsky, M. D. (1961).** Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J Biophys Biochem Cytol* **10**, 555–565.

Edited by: W. Achouak

ANEXO 2

Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., Velez-Pliego, L., Castañeda, M., Espín, G. A small heat shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology. [Epub ahead of print].

A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*

Miguel Cocotl-Yañez,¹ Soledad Moreno,¹ Sergio Encarnación,²
Liliana López-Pliego,³ Miguel Castañeda³ and Guadalupe Espín¹

Correspondence
Guadalupe Espín
espin@ibt.unam.mx

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

²Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

³Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

In *Azotobacter vinelandii*, a cyst-forming bacterium, the alternative sigma factor RpoS is essential to form cysts resistant to desiccation and to synthesize the cyst-specific lipids alkylresorcinols. In this study, we carried out a proteome analysis of vegetative cells and cysts of *A. vinelandii* strain AEIV and its *rpoS* mutant derivative AErpoS. This analysis allowed us to identify a small heat-shock protein, Hsp20, as one of the most abundant proteins of the cyst regulated by RpoS. Inactivation of *hsp20* did not affect the synthesis of alkylresorcinols or the formation of cysts with a WT morphology; however, the cysts formed by the *hsp20* mutant strain were unable to resist desiccation. We also demonstrated that expression of *hsp20* from an RpoS-independent promoter in the AErpoS mutant strain is not enough to restore the phenotype of resistance to desiccation. These results indicate that Hsp20 is essential for the resistance to desiccation of *A. vinelandii* cysts, likely by preventing the aggregation of proteins caused by the lack of water. To our knowledge, this is the first report of a small heat-shock protein that is essential for desiccation resistance in bacteria.

Received 18 September 2013
Accepted 27 December 2013

INTRODUCTION

Azotobacter vinelandii is a Gram-negative bacterium of the family *Pseudomonadaceae*. Under adverse conditions, this bacterium undergoes differentiation to form cysts resistant to desiccation. A mature cyst consists of a contracted cell known as the central body, which is surrounded by a capsule made up of a laminated outer layer called the exine and an inner layer called the intine, both without a lipid membrane. Both layers are composed of lipoproteins and alginate, an exopolysaccharide composed by two types of monomer: mannuronic acid and its epimer guluronic acid. Guluronic acid residues originate from a polymer-level epimerization process catalysed by a family of seven alginate epimerases, AlgE1–AlgE7 (Høidal *et al.*, 2000). Alginate is essential for the encystment process. Mutations that impair alginate synthesis also impair the formation of cysts (Campos *et al.*, 1996; Mejía-Ruiz *et al.*, 1997;

Castañeda *et al.*, 2001). Alginate monomer composition is also important for cyst formation, as the AlgE1–AlgE7 epimerases are altogether essential for the formation of mature cysts (Steigedal *et al.*, 2008).

Upon induction of encystment, a family of phenolic lipids known as alkylresorcinols is synthesized, which replace the phospholipids of the cyst membranes and form part of the exine layer (Reusch & Sadoff, 1983; Segura *et al.*, 2009). Strains unable to produce alkylresorcinols, due to the inactivation of alkylresorcinol biosynthetic genes, produce cysts with an altered exine morphology that resist desiccation, implying that these phenolic lipids play a structural role in the exine layer, but are not essential for desiccation resistance (Segura *et al.*, 2009).

Little is known about the regulation of gene expression during the encystment process. Mutations in the genes encoding the two-component system GacS/GacA impair alginate synthesis and therefore the formation of mature cysts (Castañeda *et al.*, 2001). This system regulates alginate biosynthesis by post-transcriptional control of the alginate biosynthetic gene *algD*, through the Rsm system. GacA activates transcription of seven small RNAs that counteract

Abbreviations: q, quantitative; RT, reverse transcription; SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment.

One supplementary figure and two supplementary tables are available with the online version of this paper.

the activity of RsmA, a protein, that binds the *algD* mRNA to inhibit its translation (Manzo *et al.*, 2011).

In a previous work, we reported that inactivation of *rpoS*, which codes for the alternative sigma factor, resulted in the inability to form cyst resistant to desiccation and to produce the cyst-specific alkylresorcinols (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). RpoS was shown to regulate the expression of ArpR, a LysR-type transcriptional regulator expressed only during encystment, which positively regulates transcription of the alkylresorcinol biosynthetic genes *arsABCD*. This activation is dependent on acetoacetyl-CoA, which could be a metabolic signal for encystment (Romero *et al.*, 2013). Although inactivation of *rpoS* did not affect alginate synthesis, the cysts produced by an *rpoS* mutant are unable to form the intine and exine layers of the cyst capsule (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). Therefore, RpoS controls unidentified genes that are essential for mature cyst formation. In the present study, we report that RpoS regulated the expression

of a small heat-shock protein essential for the resistance to desiccation of *A. vinelandii* cysts.

METHODS

Microbiological procedures. Bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. Medium and growth conditions were as follows. *A. vinelandii* was grown at 30 °C in Burk's fixed nitrogen-free salts medium (Kennedy *et al.*, 1986), supplemented with 2 % sucrose (BS) for vegetative growth, or 0.2 % *n*-butanol (BB) or 0.2 % β -hydroxybutyrate (BBHB) for encystment induction. *Escherichia coli* strain DH5 α was grown on Luria–Bertani medium at 37 °C. Antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli* were (μ g ml⁻¹): ampicillin, 0 and 100; nalidixic acid, 30 and 0; spectinomycin, 50 and 50; kanamycin, 1 and 30; and gentamicin, 1 and 10, respectively. Transformation and conjugation of *A. vinelandii* were carried out as described previously (Page & von Tigerstrom, 1978; Bali *et al.*, 1992). The staining of alkylresorcinols was carried out as described previously (Segura *et al.*, 2003). β -Glucuronidase activity was measured as reported by Romero *et al.* (2013).

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Reference or source
<i>Azotobacter vinelandii</i> strains		
AEIV	WT	Svein Valla (Norwegian University of Science and Technology)
AErpoS	AEIV derivative carrying a <i>rpoS</i> ::Sp mutation	This work
AEhsp20	AEIV derivative carrying a <i>hsp20</i> ::Gm mutation	This work
AEhsp625	AEhsp20 with pMC625 co-integrated	This work
AEhsp20/pBMCA6	AEhsp20 harbouring pBMCA6	This work
AEhsp20/pBBR1MCS-2	AEhsp20 harbouring pBBR1MCS-2	This work
AErpoS/pBMCA6	AErpoS harbouring pBMCA6	This work
AErpoS/pBBR1MCS-2	AErpoS harbouring pBBR1MCS-2	This work
AEhsp20PT	AEIV with <i>hsp20</i> :: <i>gusA</i> translational fusion	This work
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan (1983)
Plasmids		
pJET1.2/blunt	Cloning vector	ThermoScientific
pBBR1MCS-2	Cloning vector with a Km ^r cassette	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pET21a	Cloning and expression vector	Novagen
pBSL190	Plasmid used to obtain the Tc ^r cassette	Alexeyev <i>et al.</i> (1995)
pBSL97	Plasmid used to obtain the Km ^r cassette	Alexeyev <i>et al.</i> (1995)
pBSL98	Plasmid used to obtain the Gm ^r cassette	Alexeyev <i>et al.</i> (1995)
pUC19	Cloning vector	ThermoScientific
pAHFUTd-R	Plasmid used to obtain the <i>gusA</i> gene for translational fusion	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> (2012)
pSMhsp20	pJET1.2/blunt containing a 1 kb fragment with the <i>hsp20</i> gene	This work
pSMhsp20::Gm	pSMhsp20 containing a <i>hsp20</i> ::Gm mutation	This work
pJETHsp20	pJET1.2/blunt containing a 1.8 kb fragment corresponding to the <i>hsp20</i> -His6 gene	This work
pMC625	pJETHsp20 with Km ^r	This work
pBMCA6	pBBR1MCS-2 containing the <i>hsp20</i> gene under the kanamycin promoter	This work
pUMA	pUC19 containing a 1 kb fragment with the <i>mela</i> gene	This work
pUMATc	pUMA derivative with a Tc ^r cassette	This work
pUMATcgusAPT	pUMATc derivative with the <i>gusA</i> gene for translational fusions	This work
pUMAhspPT	pUMATcgusAPT with <i>hsp20</i> :: <i>gusA</i> translational fusion	This work
pMChsp20	pJET1.2/blunt containing 572 bp corresponding to the <i>hsp20</i> promoter region	This work

3

Nucleic acid procedures. DNA manipulations were performed according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Chromosomal DNA, used as template for PCRs, was obtained from *A. vinelandii* AEIV WT strain. DNA sequencing was done with a Perkin Elmer/Applied Biosystems DNA Sequencer. The sequences of the primers used in this work are shown in Table S1 (available in the online Supplementary Material).

Proteomics methodology. For the proteomic analysis, cells were collected at 30 h in BS medium (stationary phase) and 120 h in BBHB medium. Bacterial cell proteins were obtained by sonication at 24 kHz 1 min ON/1 min OFF for five cycles at 4 °C in a Vibra Cell (Sonics) in the presence of a protease inhibitor (Complete tablets; Roche Diagnostics). To further limit proteolysis, protein isolation was performed using phenol extraction (Hurkman & Tanaka, 1986). To solubilize and obtain completely denatured and reduced proteins, pellets were dried and resuspended as reported previously (Encarnación *et al.*, 2003). Prior to electrophoresis, samples were mixed with 7 M urea, 2 M thiourea, 4 % CHAPS, 2 mM tributylphosphine, 2 % ampholytes and 60 mM DTT. Sample preparation, 2D PAGE and image analysis were performed as described previously (Encarnación *et al.*, 2003). The 2D PAGE was performed with the Investigator System (Genomic Solutions). Ampholines at pH 3–10 were used for the first dimension. The separation in the second dimension was performed in 12 % polyacrylamide gels. For the first dimension, ~500 mg total protein was loaded. Gels were stained with Coomassie Blue G-250. Protein spots on all gels were detected at 127 × 127 mm resolution using a PDI image analysis system and PD-Quest software (Protein Databases). We were interested in spots that showed a twofold change at least and met the conditions of a statistical Student's test (significance level 95 %). The experiments were performed three times. Selected spots from Coomassie-stained 2D gels were excised, reduced, alkylated, digested and transferred automatically to a MALDI-TOF Bruker Daltonics Autoflex (Bruker Daltonics Bellerica) analysis target by a Proteomeer SP II and SP robot using the SPcontrol 3.1.48.0 v software (Bruker Daltonics). Mass spectra were obtained using a Bruker Daltonics Autoflex operated in the delayed extraction and reflectron mode. Spectra were calibrated externally using a peptide calibration standard (Bruker Daltonics 206095). Peak lists of the tryptic peptide masses were generated using FlexAnalysis1.2 v. SD1Patch2 (Bruker Daltonics). The search engine Mascot Server 2.0 was used to compare fingerprints against *A. vinelandii* National Center for Biotechnology Information non-redundant data set, with the following parameters: one missed cleavage allowed, carbamidomethyl cysteine as the fixed modification and oxidation of methionine as the variable modification. We accepted those proteins with scores >50 and a $P < 0.05$.

Construction of *hsp20* mutant strain. To generate the *hsp20* mutant strain (Fig. S1), primers upHsp20/lwHsp20 were used to amplify a PCR fragment of 1 kb, containing the complete *hsp20* gene. This fragment was ligated into the pJET1.2/blunt vector (ThermoScientific) to produce pSMhsp20. A *SphI* digest of pSMhsp20, made blunt with Klenow enzyme (ThermoScientific), was ligated to a *SmaI* fragment containing the gentamicin cassette excised from vector pBSL98 (Alexeyev *et al.*, 1995), resulting in pSMhsp20::Gm, that is unable to replicate in *A. vinelandii*. The AEIV strain was transformed with this plasmid and a gentamicin-resistant transformant (AEhsp20) was isolated, and confirmed to carry the *hsp20*::Gm mutation and the absence of the WT *hsp20* gene by PCR using upHsp20/lwHsp20 primers.

Complementation of *hsp20* and *rpoS* mutants with *hsp20*. A 591 bp fragment, corresponding to the *hsp20* gene lacking the first and last codons, was amplified by PCR using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoScientific) and Hsp20Bam/Hsp20Hind primers. The resultant PCR product was digested with *Bam*HI and *Hind*III, and ligated into pET-21a (Novagen). *E. coli* DH5 α

was transformed with this plasmid and a transformant carrying pMHsp20His was isolated. This plasmid was digested with *ScaI* and *Bgl*II. The 1.8 kb fragment that contains the *hsp20* gene with a tag of six histidines at the C terminal was cloned into pJET1.2/blunt, resulting in pJetHsp20. A *ScaI* digest of pJetHsp20, made blunt with Klenow enzyme, was ligated to a *SmaI* fragment containing the kanamycin cassette excised from vector pBSL97, resulting in pMC625, which is unable to replicate in *A. vinelandii*. The AEhsp20 strain was transformed with pMC625 for co-integration into the chromosome, producing strain AEhsp625 (Fig. S1).

A promoterless *hsp20* gene, flanked by *Hind*III and *Bam*HI restriction sites, and with a tag of six histidines at the N terminus, was amplified by PCR using AEIV chromosomal DNA and primers HisAmhindhsp20, whose sequence includes the His-tag, and HisAmbamhsp20. The product was digested and cloned into pBBR1MCS-2, digested with the *Hind*III and *Bam*HI enzymes. This produced pBMCA6, with *hsp20* under the control of the kanamycin promoter (Fig. S2). pBMCA6, which is able to replicate in *A. vinelandii*, was transferred by conjugation into strains AEhsp20 and AErpoS to produce strains AEhsp20/pBMCA6 and AErpoS/pBMCA6, respectively.

Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Expression of *hsp20* was measured by qRT-PCR as reported previously (Noguez *et al.*, 2008). For RNA extraction, the cultures were grown in BS or BB medium. Cells were collected at the 30 h for BS and 120 h for BB. The primers used for the qRT-PCR assays were: upRT-hsp20/dwRT-hsp20 for *hsp20* expression and fw-gyrA/rev-gyrA for *gyrA* expression. Amplification conditions were 10 min at 95 °C, a two-step cycle at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s, for a total of 45 cycles. The size of all amplicons was 100 bp. *gyrA* expression was used as internal control to normalize the results. All assays were performed in triplicate. The data are presented as fold change (mean $\pm$ SD) of mRNA levels of the mutant strain relative to those of the WT.

Primer extension analysis assays. A 572 bp fragment, corresponding to the promoter region of *hsp20* (nt -326 to +246), was amplified by PCR using primers upHsp20rr/dwHsp20rr. The product was cloned into pJET1.2/blunt, resulting in pMChsp20. Total RNA was isolated from AEIV cultures grown for 30 h in BS or 120 h in BB liquid medium. Primer extension experiments were carried out at 42 °C using 50 μ g RNA and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche), with primer primhsp20. The cDNAs were end-labelled with [γ -³²P]dATP using polynucleotide kinase (Roche). The sequencing ladders were generated with the same primers using a Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (USB) and pMChsp20 as template.

Construction of *hsp20*::*gusA* translational fusion. Primers MelAF/MelAR and *Pfu* DNA polymerase (ThermoScientific) were used to amplify a PCR fragment of 1.1 kb containing the *melA* gene. This fragment was cloned into pUC19 vector, which was restricted previously with *Eco*RI and *Hind*III, and blunted in order to remove its multiple cloning site, resulting in pUMA. A *XhoI* digest of pUMA was ligated to a *XhoI* fragment containing the tetracycline cassette obtained from vector pBSL190 (Alexeyev *et al.*, 1995). The resulting plasmid was called pUMATc. pUMATc was digested with *Pst*I and *Hind*III to clone the *gusA* reporter taken from pAHFUTd-Tc (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012), resulting in pUMATcgusAPT.

To generate an *hsp20*::*gusA* translational fusion, primers uphspXbafus/dwhspPstI were used to amplify a 247 bp DNA fragment containing the promoter, Shine-Dalgarno sequence and three codons of *hsp20*. This PCR fragment was digested with *Xba*I and *Pst*I, and cloned into pUMAgusAPT, digested with the same enzymes, to obtain pUMAhspPT.

AEIV WT strain was transformed with pUMAhsp20PT. A tetracycline-resistant transformant was selected, obtaining strain AEhsp20PT. The integration of the *hsp20*::*gusA* translational fusion by gene replacement

into the chromosome of AEIV was confirmed by PCR analysis using uphspXbafus/gusArev primers. The absence of the WT *mela* gene was confirmed by PCR analysis using melAFw/melARv primers.

Resistance to desiccation and electron microscopy assays.

Transfer of washed vegetative cells from 30 h liquid cultures on BS to BB medium plates induced encystment. Desiccation resistance assays were carried out as described previously (Campos *et al.*, 1996; Segura *et al.*, 2009). Approximately 10^6 c.f.u. of each strain were collected after 5 days in the induction medium and were desiccated at 30 °C on 0.2 mm membranes for 5 days. Surviving cells, quantified by viable cell count, were considered mature cysts resistant to desiccation. Electron microscopy was carried out as reported previously (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997).

RESULTS

Proteome analysis of the WT strain AEIV and its *rpoS* mutant derivative AErpoS

In order to identify genes under RpoS control involved in encystment, we carried out a search for proteins of the WT

strain that were upregulated during encystment, as compared to vegetative cells. We also identified which of these proteins were not upregulated in the *rpoS* mutant during encystment. Proteome expression profiles were carried out (as described in Methods) in the WT strain AEIV and its *rpoS* mutant derivative AErpoS, under vegetative and encystment conditions (Fig. 1). Visually, we detected changes in the expression of over 30 proteins in the WT encysted cells, as compared to vegetative cells. These protein spots were excised from the gel and analysed by MALDI-TOF. This analysis resulted in the identification of the 20 proteins listed in Table S2. Nine of these proteins were upregulated during encystment in the WT, but not in the AErpoS strain (Fig. 1).

These proteins, as annotated in the genome of *A. vinelandii* DJ (Setubal *et al.*, 2009), are (Table 2): a small heat-shock protein Hsp20, which was among the most abundant proteins in cyst cells of the WT strain; the alginate epimerases AlgE1 and AlgE6, which have been shown

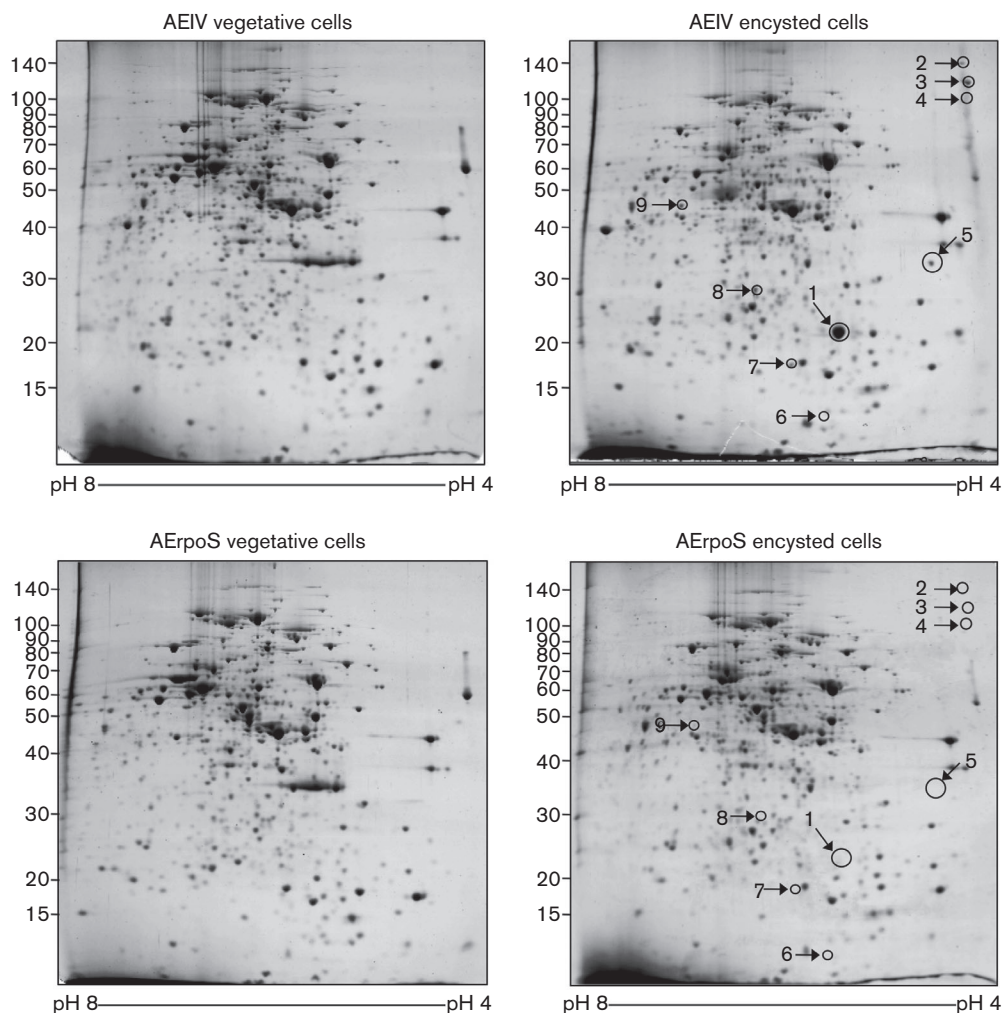


Fig. 1. Results of 2D PAGE from the WT AEIV and *rpoS* mutant AErpoS vegetative and encysted cells.

previously to be involved in encystment (Steigedal *et al.*, 2008); a calcium-binding protein encoded within an alginate epimerases gene cluster; two proteins involved in polysaccharide export and biosynthesis; an haemerythrin HHE cation-binding protein, which was detected with two different molecular masses and pIs, suggesting that it undergoes a post-translational modification; and an hypothetical protein. Due to its abundance in cysts, Hsp20 was chosen for further analysis, to investigate its regulation by RpoS and its role in the encystment process. The gene encoding Hsp20 is located downstream of and in the opposite direction to Avin25760, which codes for a putative dihydroorotate oxidase, and upstream of and in the opposite direction to Avin25780 (GroL). The Hsp20 amino acid sequence contains the typical α -crystalline domain present in small heat-shock proteins (Arrigo & Landry, 1994) and shares 29% identity with Hsp16.5 from *Methanococcus jannaschii*, a protein whose crystal structure has been determined (Kim *et al.*, 1998). This identity is shared between the α -crystalline region, but not in the amino acids of C-terminal regions.

Hsp20 was transcribed from an RpoS-dependent promoter

As shown in Fig. 1, the level of the Hsp20 protein is very high under encystment conditions and is reduced significantly in vegetative cells or in the *rpoS* mutant. To confirm the role of RpoS in the regulation of *hsp20* expression, qPCR was used to determine the effect of the *rpoS*::Sp mutation on the expression of *hsp20*, measured under vegetative (BS) and encystment conditions (BB). The qPCR assays showed that inactivation of *rpoS* diminishes the expression of *hsp20* under both conditions (0.0084 ± 0.0035 in BS and 0.02 ± 0.02 in BB), as compared to the WT (1.0).

We also determined the transcription start site for the *hsp20* gene. Primer extension analysis was carried out with

total RNA isolated from the WT and the *rpoS* mutant grown on encysting and vegetative media in stationary-phase cultures. A single transcriptional start site was identified, located 120 nt upstream of the *hsp20* ATG start codon (Fig. 2). No transcript was detected in the *rpoS* mutant, suggesting that this promoter is recognized by RpoS. In fact, the -10 region of the P_{hsp20} promoter has the CTATCCT sequence, which corresponds to the RpoS-dependent promoter sequence reported for *phbB* and *algD* genes in *A. vinelandii* (Castañeda *et al.*, 2001; Peralta-Gil *et al.*, 2002). The primer extension analysis (Fig. 2) suggested that the level of the *hsp20* transcript is higher under vegetative conditions than under encystment conditions. This result was unexpected, as the proteome analysis showed that the level of the Hsp20 protein was higher in cysts than in vegetative cells. We therefore measured and compared the level of *hsp20* transcripts by qPCR, under encystment conditions versus vegetative conditions. In agreement with the results observed in the primer extension analysis, the relative expression level of the *hsp20* mRNA was lower under encysting (0.42 ± 0.23) than under vegetative conditions (1.0).

Post-transcriptional regulation of Hsp20

The proteome analysis, the primer extension analysis of *hsp20*, and the qPCR performed under vegetative and encystment conditions suggested that *hsp20* is transcribed mainly in vegetative cells, but its translation is favoured under encystment conditions. To test this hypothesis, strain AEhsp20PT, carrying a translational *hsp20*::*gusA* gene fusion integrated into the chromosome, was constructed. The induction kinetics of *hsp20* translation were determined *in vivo* by measuring the β -glucuronidase activity in strain AEhsp20PT, under vegetative and encysting conditions. As shown in Fig. 3, although Hsp20 translation occurred under both conditions, the maximum translation was observed in cells undergoing encystment. These data indicated a post-transcriptional regulation of *hsp20*.

Table 2. Proteins identified by MALDI-TOF, as annotated in the *A. vinelandii* genome

Spot no.	Protein	Mass (kDa)/pI (theoretical)	Fold change in AErpoS vs WT under encystment conditions	Genome annotation
1	Heat-shock Hsp20 protein, Hsp20	22.2/5	—*	Avin25770
2	Secreted mannuronan C-5 epimerase, AlgE1	147.1/3.96	—*	Avin51190
3	Calcium-binding protein	119.6/4.1	—*	Avin51240
4	Secreted mannuronan C-5 epimerase, AlgE6	90.1/4.21	—*	Avin51230
5	Polysaccharide export protein	36.6/4.54	—*	Avin05380
6	Haemerythrin HHE cation-binding protein	18/5.34	—1.3	Avin00300
7	Haemerythrin HHE cation-binding protein	18/5.34	—*	Avin00300
8	Hypothetical protein	28.5/5.52	—*	Avin34590
9	Polysaccharide biosynthesis protein, WbpO	47.4/5.98	—4	Avin29910

*Ratio could not be measured because the protein spot was undetectable in the *rpoS* mutant strain AErpoS.

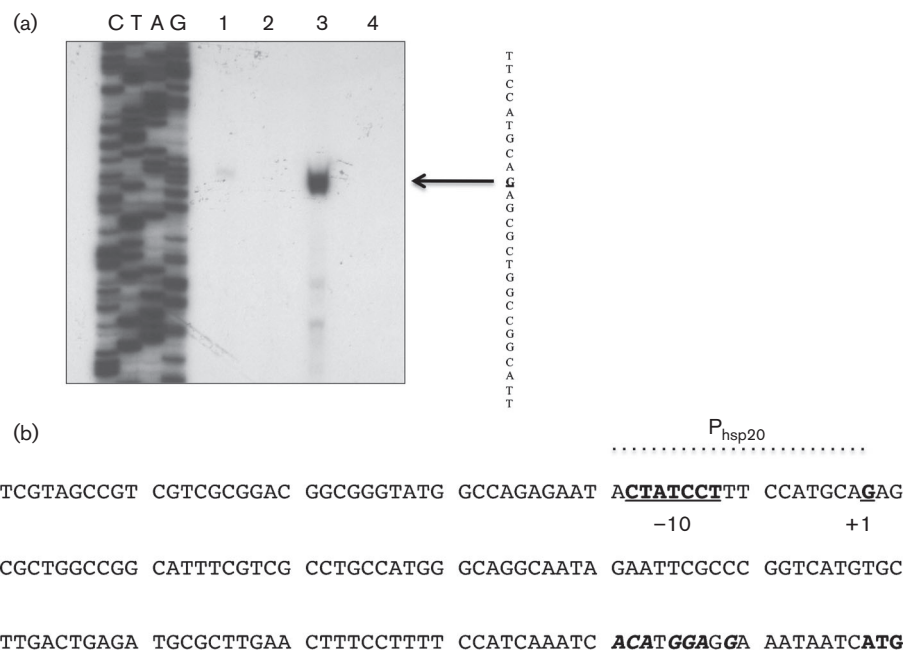


Fig. 2. (a) Identification of the transcription initiation start site of *hsp20* by primer extension analysis using total RNA isolated from strain AEIV under encystment (lane 1) and vegetative conditions (lane 3) and from strain AErpoS under encystment (lane 2) and vegetative conditions (lane 4). (b) The *hsp20* promoter (P_{hsp20}) is indicated, and the transcriptional start site (+1), the -10 box and the *hsp20* ATG translation start codon are shown in bold and underlined. The predicted RsmA-binding site is shown in bold italic.

Inactivation of *hsp20* impaired cyst resistance to desiccation

In order to determine the role of Hsp20 protein in the encystment process, strain AEhsp20, an AEIV derivative carrying a *hsp20::Gm* mutation, was constructed. The

growth and alginate production of this strain in BS medium was similar to the WT AEIV strain (data not shown). The AEhsp20, AErpoS and WT AEIV strains were induced for encystment by transferring cells grown in liquid BS medium to BB plates. Similar to the *rpoS* mutant, strain AEhsp20 was unable to produce cysts resistant to desiccation (Table 3).

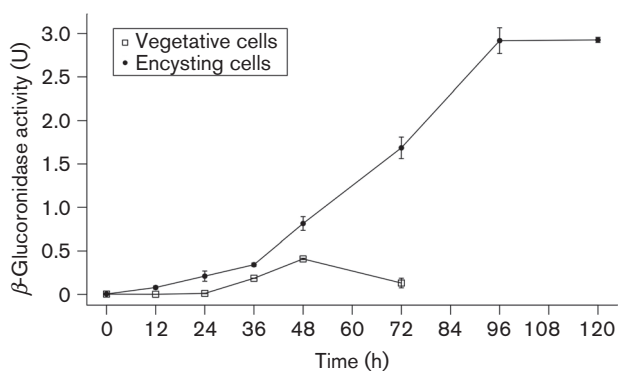


Fig. 3. Translation of *hsp20* during growth in liquid BS or BB media, measured as β -glucuronidase activity of an *hsp20::gusA* translational fusion in the WT strain AEIV. One unit β -glucuronidase activity corresponds to 1 nmol substrate (X-Gluc) hydrolysed min⁻¹ (mg protein)⁻¹. Means $\pm$ SD are shown.

Electron microscopy of the cysts made by the *hsp20* mutant was carried out and compared to cysts made by the WT and the *rpoS* mutant. As shown in Fig. 4(a), the cysts formed by the *hsp20* mutant were indistinguishable from those formed by the WT. Similar to the WT strain, cysts of the *hsp20* mutant were composed of a compacted cell surrounded by the intine and exine layers. To confirm that the inability to resist desiccation of the cysts formed by the *hsp20* mutant strain was caused by the absence of the Hsp20 protein, we carried out the complementation of the AEhsp20 strain. pMC625, carrying a WT *hsp20* copy tagged with a tail of six histidines in the C terminus, was co-integrated into the chromosome of AEhsp20, producing strain AEhsp625 (Fig. S1). Integration of the plasmid was confirmed by PCR and Western blot analysis (data not shown). The AEhsp625 strain produced cysts resistant to desiccation (Table 3). These results confirmed that *hsp20* is essential for the survival of mature cysts under desiccation.

Table 3. Desiccation resistance in *A. vinelandii*

Strain	Genotype	Desiccation resistance (%)
AEIV	WT	13.9 ± 2.6
AErpoS	<i>rpoS</i> ::Sp	<0.0001
AHsp20	<i>hsp20</i> ::Gm	<0.0001
AHsp625	<i>hsp20</i> ::Gm/ <i>hsp20</i>	21.8 ± 2.03
AHsp20/pBMCA6	<i>hsp20</i> ::Gm/ <i>hsp20</i>	4.3 ± 0.5
AHsp20/pBBR1MCS-2	<i>hsp20</i> ::Gm/ pBBR1MCS-2	<0.0001
AErpoS/pBMCA6	<i>rpoS</i> ::Sp/ <i>hsp20</i>	<0.0001
AErpoS/pBBR1MCS-2	<i>rpoS</i> ::Sp/pBBR1MCS-2	<0.0001

Synthesis of the cyst-specific lipids alkylresorcinols was not affected in the *hsp20* mutant strain.

Inactivation of alkylresorcinol biosynthetic genes results in strains that produce cysts with an altered exine morphology, but that are able to resist desiccation (Segura *et al.*, 2009). As shown in Fig. 4(a), the AHsp20 strain produced cysts with WT exine morphology, suggesting that the synthesis of alkylresorcinols is not affected by the *hsp20* mutation. Indeed, when cells of AHsp20 induced for encystment were stained with Fast Blue to visualize alkylresorcinol production, we found that the *hsp20* mutant strain developed a red colour similar to that of the WT strain, indicating the presence of alkylresorcinols, while the *rpoS* mutant strain (used as a negative control) remained white (Fig. 4b).

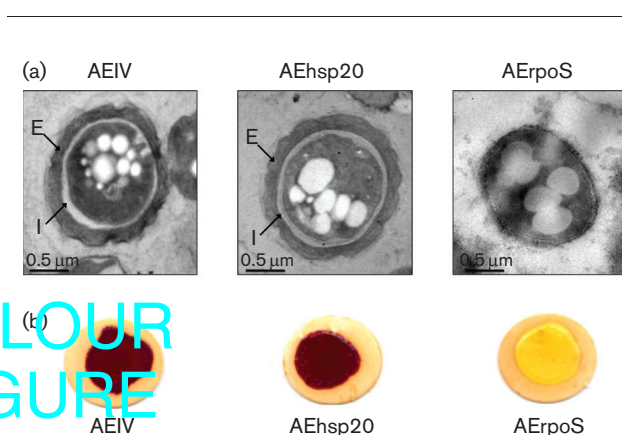


Fig. 4. Effect of *hsp20* mutation on cyst formation and alkylresorcinol synthesis. (a) Electronic micrographs of the cysts formed by strains AEIV, AHsp20 and AErpoS. Bar, 0.5 µm. E, Exine; I, intine. (b) Alkylresorcinol staining of the WT strain AEIV, the *hsp20* mutant AHsp20 and the *rpoS* mutant AErpoS. The cells were induced to encyst on BB medium for 5 days before staining.

Expression of *hsp20* from an RpoS-independent promoter did not restore resistance to desiccation to the *rpoS* mutant.

The question of whether, in addition to ArpR (the activator of alkylresorcinol synthesis) and Hsp20, other proteins under the control of RpoS are required for the formation of the cyst capsule (mature cysts) and desiccation resistance was raised. We therefore tested if expression of the *hsp20* gene, from an RpoS-independent promoter, restored resistance to desiccation in the *rpoS* mutant. pBBR1MCS and its derivative pBMCA6, which carry a WT copy of *hsp20* (tagged with six histidines in the N terminus) under the control of the kanamycin promoter, were conjugated into the *rpoS* mutant strain AErpoS and the *hsp20* mutant strain AHsp20. The expression of Hsp20 in the strains harbouring pBMCA6 was confirmed by Western blot analysis (data not shown). As expected, pBMCA6 restored cyst desiccation resistance to strain AHsp20 (Table 3). The cysts formed by AErpoS harbouring pBMCA6 neither resisted desiccation nor produced alkylresorcinols. This indicated that, in addition to ArpR and Hsp20, other proteins under the control of RpoS were necessary for the formation of mature cysts resistant to desiccation.

DISCUSSION

Cysts of *A. vinelandii* are metabolically dormant cells that are resistant to desiccation. In the laboratory, they are viable for >10 years upon storage in dry soil (Vela, 1974). The RpoS sigma factor is essential to form functional cysts resistant to desiccation and to synthesize alkylresorcinols (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2013). In order to find genes specifically induced upon encystment and regulated by RpoS, we carried out a proteome analysis that revealed the presence of several proteins putatively under the control of RpoS that are specific to cysts. Among these, we found a haemerythrin-like protein and the alginate epimerases AlgE1 and AlgE6. Haemerythrins are non-haem oxygen-binding proteins in which oxygen binds to a di-iron centre (Stenkamp, 1994). In prokaryotes, these proteins have putative functions such as binding oxygen either as a storage (Karlsen *et al.*, 2005), sensory or detoxification mechanism (Xiong *et al.*, 2000; Isaza *et al.*, 2006). Whether the haemerythrin-like protein present in cysts of *A. vinelandii* plays these roles remains to be investigated. The presence of AlgE1 and AlgE6 epimerases in cysts is not surprising, since the AlgE1–AlgE7 epimerases altogether are essential to form cysts resistant to desiccation (Steigedal *et al.*, 2008). Moreover, the inactivation of *rpoS* did not prevent alginate synthesis. The novel finding in this case is the regulation of AlgE epimerases by RpoS.

Heat-shock proteins are distributed widely in every domain of the life, their function being to prevent the misfolding or aggregation of proteins exposed to stress. Heat-shock protein expression is activated by heat, oxidative stress, starvation, UV radiation, desiccation and other stresses

(Vayssier & Polla, 1998.). The proteome analysis also revealed the presence of Hsp20 as one of the most abundant proteins in the cysts, although a low level of this protein was also detected in vegetative cells. Unexpectedly, the *hsp20* mRNA level found in the qPCR and by primer extension analysis was higher in vegetative cells than in cysts, suggesting that *hsp20* translation is inhibited in vegetative cells and favoured under encystment conditions. Indeed, the *gusA::hsp20* fusion used here showed that translation of *hsp20* is lower in vegetative cells and translation of its mRNA begins upon the encystment process. Thus, we propose that in vegetative cells translation of the *hsp20* mRNA is inhibited by the translational repressor RsmA, which was shown recently to be a repressor of *algD* (Manzo *et al.*, 2011), encoding a key enzyme of the alginate biosynthetic pathway that is essential for the formation of mature cysts (Campos *et al.*, 1996). In fact, the *hsp20* Shine–Dalgarno region possesses a potential RsmA-binding site that matches in seven out of 12 positions with the SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)-derived consensus binding sequence (Dubey *et al.*, 2005) and overlaps the Shine–Dalgarno sequence (Fig. 2b). This sequence matched the RsmA-binding sequence present in the *algD* and *phbR* transcripts (Manzo *et al.*, 2011; Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). Interestingly, in *Artemia franciscana* cysts, the amounts of small heat-shock proteins have been suggested to be under transcriptional and translational regulation (King *et al.*, 2013).

Transcription of *hsp20* is dependent directly on the RpoS sigma factor, which is unusual because in bacteria, and particularly in *E. coli*, the master regulator of heat-shock proteins, including small heat-shock proteins, is RpoH (Tilly *et al.*, 1986; Grossman *et al.*, 1987). Additionally, *A. vinelandii* has an RpoH sigma factor and no promoter sequence recognized by RpoH is present in the *hsp20* regulatory region.

We found that expression in the *rpoS* mutant of *hsp20* from an RpoS-independent promoter is not enough to restore cyst resistance to desiccation, implying that in addition to Hsp20 and ArpR, other proteins under RpoS control are necessary for cyst formation and desiccation resistance. We propose that these proteins include some alginate epimerases, as AlgE1 and AlgE6 were identified here as putative targets of RpoS.

This study shows that the Hsp20 protein plays an essential role in tolerance to desiccation, as cysts of the *hsp20* mutant strain were unable to resist desiccation. This inability is not caused by changes in the structure of the cyst, since they are similar to the cysts formed by the WT strain. Consistent with this phenotype, the *hsp20* mutant strain is not affected in the synthesis of alkylresorcinols, as these phenolic lipids play a role in cyst structure, but are not essential for desiccation resistance (Segura *et al.*, 2009). In the desiccation stage, the lack of water in the cell is one of the most damaging stresses. Protein–protein aggregation occurs as a consequence of a loss of water. Small heat-shock proteins are able to bind proteins to protect them by avoiding aggregation (Lee *et al.*,

1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Haslbeck *et al.*, 1999). As a small heat-shock protein, Hsp20 is likely to interact with proteins that are important to maintain viability of *A. vinelandii* cysts, in order to protect them against misfolding or aggregation under desiccation.

Finally, small heat-shock proteins have been related to desiccation protection in eukaryotic organisms, as they are found in high amounts in the encysted embryos of several branchiopod crustaceans (Clegg, 2001, 2005; Willsie & Clegg, 2001; King *et al.*, 2013). Additionally, sHsp20 and P23 transcripts accumulated in the larvae of the chironomid *Polypedium vanderplanki* during desiccation (Gusev *et al.*, 2011). To our knowledge, the present paper is the first report in bacteria of a small heat-shock protein that is essential for cyst desiccation resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CONACYT (grant no. 131856). M. C.-Y. wishes to thank CONACYT for financial support during his PhD studies. We wish to acknowledge A. G. Martinez-Batallar and M. Hernández for their technical support in the proteomics methodology, H. Sámano-Sánchez for critical reading, and Guadalupe Zavala and Paul Gaytan for technical support.

REFERENCES

- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63–67.
- Arrigo, A. P. & Landry, J. (1994). Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, pp. 335–373. Edited by R. Morimoto, A. Tissieres & C. Georgeopoulos (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bali, A., Blanco, G., Hill, S. & Kennedy, C. (1992). Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1711–1718.
- Campos, M., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **178**, 1793–1799.
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**, 6787–6793.
- Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **128**, 613–624.
- Clegg, J. S. (2005). Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile, *Artemia*. *Integr Comp Biol* **45**, 715–724.
- Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, 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.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T. & Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* **11**, 1579–1587.

- Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* **16**, 221–229.
- Encarnación, S., Guzmán, Y., Dunn, M. F., Hernández, M., del Carmen Vargas, M. & Mora, J. (2003). Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *Proteomics* **3**, 1077–1085.
- Grossman, A. D., Straus, D. B., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1987). Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **1**, 179–184.
- Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T. & Okuda, T. (2011). Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedium vanderplanki*. *Cell Stress Chaperones* **16**, 81–90.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. & Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J* **18**, 6744–6751.
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F. & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* **158**, 1953–1963.
- Høidal, H. K., Glaerum Svanem, B. I., Gimmestad, M. & Valla, S. (2000). Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*. *Environ Microbiol* **2**, 27–38.
- Hurkman, W. J. & Tanaka, C. K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* **81**, 802–806.
- Isaza, C. E., Silaghi-Dumitrescu, R., Iyer, R. B., Kurtz, D. M., Jr & Chan, M. K. (2006). Structural basis for O₂ sensing by the hemerythrin-like domain of a bacterial chemotaxis protein: substrate tunnel and fluxional N terminus. *Biochemistry* **45**, 9023–9031.
- Karlsen, O. A., Ramsevik, L., Bruseth, L. J., Larsen, Ø., Brenner, A., Berven, F. S., Jensen, H. B. & Lillehaug, J. R. (2005). Characterization of a prokaryotic haemerythrin from the methanotrophic bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEBS J* **272**, 2428–2440.
- Kennedy, C., Gamal, R., Humphrey, 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 banks. *Mol Gen Genet* **205**, 318–325.
- Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S. H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**, 595–599.
- King, A. M., Toxopeus, J. & MacRae, T. H. (2013). Functional differentiation of small heat shock proteins in diapause-destined *Artemia* embryos. *FEBS J* **280**, 4761–4772.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., II & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. & Vierling, E. (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J* **16**, 659–671.
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L. & other authors (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **21**, 147–159.
- Mejía-Ruiz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G. & Espín, G. (1997). Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 101–106.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008). Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**, 244–254.
- Page, W. J. & von Tigerstrom, M. (1978). Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can J Microbiol* **24**, 1590–1594.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* **184**, 5672–5677.
- Reusch, R. N. & Sadoff, H. L. (1983). Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature* **302**, 268–270.
- Romero, Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G. & Segura, D. (2013). Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **195**, 1834–1844.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* **179**, 437–443.
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M. & Espín, G. (2009). Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J Bacteriol* **191**, 3142–3148.
- Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espín, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D. & other authors (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* **191**, 4534–4545.
- Steigedal, M., Sletta, H., Moreno, S., Maerk, M., Christensen, B. E., Bjerkkan, T., Ellingsen, T. E., Espín, G., Ertesvåg, H. & Valla, S. (2008). The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the *in vivo* control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. *Environ Microbiol* **10**, 1760–1770.
- Stenkamp, R. E. (1994). Dioxygen and hemerythrin. *Chem Rev* **94**, 715–726.
- Tilly, K., Erickson, J., Sharma, S. & Georgopoulos, C. (1986). Heat shock regulatory gene *rpoH* mRNA level increases after heat shock in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **168**, 1155–1158.
- Vayssier, M. & Polla, B. S. (1998). Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell Stress Chaperones* **3**, 221–227.
- Vela, G. R. (1974). Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl Microbiol* **28**, 77–79.
- Willis, J. K. & Clegg, J. S. (2001). Nuclear p26, a small heat shock/alpha-crystallin protein, and its relationship to stress resistance in *Artemia franciscana* embryos. *J Exp Biol* **204**, 2339–2350.
- Xiong, J., Kurtz, D. M., Jr, Ai, J. & Sanders-Loehr, J. (2000). A hemerythrin-like domain in a bacterial chemotaxis protein. *Biochemistry* **39**, 5117–5125.

Edited by: W. Achouak