



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE TERMINAL: MICROBIOLOGIA

TESIS

*Análisis de la expresión diferencial del sistema Rsm en Azotobacter
vinelandii en condiciones de fijación de Nitrógeno y en presencia de
amonio*

Para obtener el título de
Licenciado en Biomedicina

Presenta: Luis Angel Garcia Tejeda

Director de Tesis:

D. C. Liliana López Pliego

CODIRECTOR:

D.C Miguel Castañeda Lucio

Puebla, Pue., 9 de enero de 2025

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1.-Introducción.....	6
1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
1.2 Fijación de Nitrógeno.....	8
1.4 Sistema GacS/GacA.....	10
1.5 Sistema postranscripcional Rsm.....	13
1.6 Producción y Funciones biológicas de los Biopolímeros de interés biotecnológico.....	14
1.7 Sistema de multicomponente <i>A. vinelandii</i>	16
2.- Antecedentes.....	19
2.1 Estudio del efecto del amonio en la expresión de los snc-RNA no codificantes del sistema Rsm <i>A. vinelandii</i>	20
3.- Planteamiento del problema.....	22
4.- Hipótesis.....	22
5.- Objetivos.....	22
5.1 General.....	22
5.2 Particulares.....	22
6.- Material y Métodos.....	23
6.1 Diagrama de Trabajo.....	23
6.2 Obtención de las secuencias.....	23
6.3 Análisis y tratamiento de las secuencias.....	24
6.4 Análisis de la expresión diferencial.....	25
6.5 Análisis de la cuantificación de amonio.....	26
7.- Resultados.....	28
7.1 Análisis de PCA.....	28
7.2 Gráficas de Expresión Diferencial del sistema rsm.....	29
7.3 Cuantificación de amonio de las cepas mutantes del gel <i>nifL</i> en <i>A. vinelandii</i> AEIV.....	31
8.- Discusión de los resultados.....	32
9.- Conclusiones.....	35
10.-Perspectivas.....	35
12.- Bibliografía.....	38

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram negativa, de vida libre, encontrada principalmente en los suelos, ha sido ampliamente estudiada, debido a su capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno, por su producción de polímeros de interés industrial, su alta tasa de respiración, entre otras (Noar, J & Barcena, B. 2018) La producción de metabolitos secundarios como los alginatos y el poli- β -hidroxibutirato (PHB) han sido estudiadas desde un punto de vista biotecnológico, ya que estos polímeros pueden servir como emulsificantes y viscosificantes, los primeros y los segundos como sustitutos alternativos a los polímeros derivados del petróleo. Se han realizado diversos esfuerzos para poder obtener cepas hiperproductoras de polímeros para que la producción sea rentable. Diversos estudios genéticos se han realizado al respecto y se ha demostrado que el sistema de regulación GacS/GacA/Rsm está regulando la producción de los polímeros en *A. vinelandii*.

El sistema Rsm consta de dos elementos: un grupo de pequeños RNAs (snc-RNA) los cuales tienen la función de contrarrestar el efecto de una proteína regulador negativo de la expresión génica a nivel post-transcripcional, RsmA, se une a una región cercana a la secuencia Shine Dalgarno de los RNA mensajeros blancos de regulación. Los snc-RNA regulan a esta proteína gracias a un sitio de unión de mayor afinidad el cual posee una estructura de tallo y asa, secuestrando a la proteína RsmA liberando el RNAm y permitiendo que se lleve a cabo a la traducción de los metabolitos secundarios.

En el presente estudio se realizó un análisis bioinformático de un transcriptoma de la cepa DJ de *A. vinelandii*, establecido bajo 2 condiciones, en un medio Burk sacarosa (Bs) y en un medio Burk sacarosa adicionado con amonio (Bs-NH₄ 10 mM) (Barney *et. al.* 2017). Se realizó un análisis de expresión diferencial en el cual se observó el comportamiento de la expresión de los snc-RNA del sistema Rsm y de la proteína RsmA; así como los genes *nifHDK*, que se sabe son reprimidos en presencia de amonio, sirviendo como grupo control del análisis de datos. Como

resultado podemos observar que la presencia de amonio abate la expresión de los snc-RNA del sistema Rsm de la familia RsmZ, mientras que hubo un ligero aumento de la expresión de RsmY. Así mismo, la proteína RsmA se ve expresada en presencia de amonio lo que quiere decir que la presencia o ausencia de amonio influye mucho en la expresión de los genes reguladores *rsm*, ya que al haber amonio en el medio la bacteria ya no necesita entrar a un estado de fijación de nitrógeno por ende se ve reducida esta expresión.

Por último, se realizó la cuantificación de amonio, de una cepa de *A. vinelandii* realizada la cual tenía una mutación en el gen *nifL* (mutaciones polar y no polar)(victoria; 2019), para comprobar si estas mutantes en comparación con la cepa *A. vinelandii* AEIV, en presencia de amonio en el medio seguían fijando y produciendo amonio. Observamos que no existía una gran diferencia en la producción de amonio extracelular en las mutantes con respecto a su cepa parental AEIV, esto podría deberse a la mutación es diferente en comparación a las de Barney et. al. 2017 en la cual su mutante sigue produciendo amonio en un medio adicionado con amonio.

Palabras clave:

AZBB163: cepa mutante en el gen *nifL* de *A. vinelandii*.

Gm: Gentamicina

Nal: ácido nalidixico.

***nifA*:** activador transcripcional nitrogenasa.

***nifL*:** represor transcripcional nitrogenasa.

PCA: análisis de componentes principales

PHB: poli- β -hidroxibutirato

rsmA: Proteína reguladora.

snc-RNA: pequeños RNAs no codificantes,

1.-Introducción

1.1 *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii es una bacteria de vida libre, una γ -proteobacteria perteneciente a la familia de las Pseudomonadaceae, es gram negativa, poliploide, 1,5 a 2 μm de diámetro, su forma es pleomórfica ya que se puede observar en forma de cocos a bacilos. Respecto al ciclo de vida, esta bacteria presenta dos fases, una fase vegetativa y una fase de vida de latencia. Al comienzo del proceso de diferenciación, las células pierden sus flagelos y finalmente tienen una división celular que produce dos células esféricas. La cual consta de dos capas, llamadas pared interior y la otra llamada pared exterior, compuestas por 13% y 32% de alginato respectivamente, así como de lipoproteínas (Lin *et. al.*1969). Una vez formadas estas capas, se forman los quistes maduros los cuales consisten en una matriz central que contiene Poli- β - hidroxibutirato (PHB) como fuente de carbono de reserva, mientras que tiene un ciclo de vida vegetativo cuando las condiciones de vida son favorables para el organismo (Hitchins & Sadoff.1970).

A. vinelandii produce al menos dos polímeros de interés industrial, los alginatos y el PHB. El PHB es un polímero perteneciente a la familia de poliésteres polihidroxicanoatos (PHAs), este se produce en la bacteria gracias a un desbalance de carbono y nitrógeno, las bacterias lo producen en la etapa tardía de crecimiento, en la fase exponencial. El PHB puede llegar a acumularse hasta el 79% en una cepa silvestre, dependiendo de sus condiciones de crecimiento. Este polímero es de importancia biotecnológica ya que se tiene la perspectiva de ser utilizado como reemplazo a plásticos derivados del petróleo (Muñoz *et. al.* 2019; Noar & Barcena, 2018; Suaza & Coy, 2014).

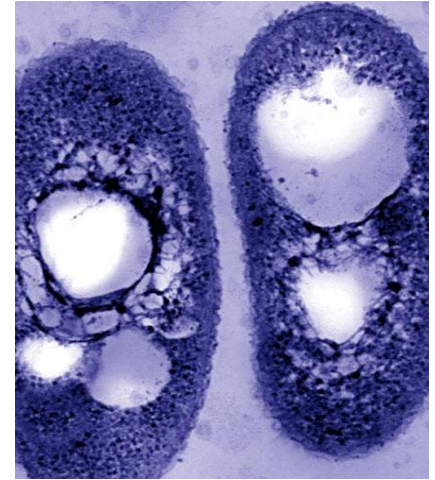


Figura 1. *Azotobacter vinelandii* (INVDES 2018)

Por otra parte, el alginato es un polímero de interés en el área alimenticia, farmacéutica y dental, teniendo una demanda alta para estas industrias; es un polisacárido lineal conformado por ácido manurónico y el ácido gulurónico unidos por enlaces β 1-4, que le confieren propiedades viscosificantes y gelificantes importantes a nivel industrial. *A. vinelandii* produce estos polímeros tanto en la fase vegetativa y en la fase de enquistamiento. En la primera tienen la función de servir como un polímero de protección a la nitrogenasa y generar condiciones microaerófilas dentro de la bacteria; durante la fase de enquistamiento, este polímero es parte de una capa externa importante del quiste llamada exina (Flores *et. al.* 2013, Wu *et. al.* 2019).

Además de la producción de polímeros de interés industrial, ha sido ampliamente estudiado como modelo en el proceso de fijación de nitrógeno; ya que es capaz de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno, particularidad que es muy conveniente en estudios funcionales para definir el proceso. Posee tres complejos de nitrogenasas, una dependiente de cofactores Fe-Fe (hierro- hierro), otra de Fe-Mo (hierro-molibdeno) y la última de Fe-Va (hierro-vanadio), que se expresan dependiendo de la disponibilidad de los cofactores presentes en el medio (Dixon 1972). La nitrogenasa es una proteína altamente sensible al oxígeno; sin embargo, *A. vinelandii* posee varios mecanismos relacionados para su protección como son: una respiración controlada por la tasa carbono/nitrógeno (C/N), ligado al uso del O₂ y la reducción de H₂ gracias a la actividad hidrogenasa, o como cambios conformacionales en la propia enzima para que no pierda actividad, así como la producción de alginato, que actúa como una barrera física que impide la difusión del O₂, hacia la enzima y del substrato (N₂) al sitio activo del complejo enzimático. (Sadoff, 1975). Este microorganismo produce metabolitos secundarios como fitohormonas (reguladores del crecimiento vegetal), y sideróforos (importantes para la interacción que establece con plantas y microorganismos) (Narula *et. al.* 2000).

1.2 Fijación de Nitrógeno.

La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual el nitrógeno gaseoso (N₂) del aire se convierte en formas biodisponibles, como compuestos de nitrógeno en el suelo y las plantas. El nitrógeno es un elemento esencial para la vida, pero la mayoría de los organismos no pueden usar el nitrógeno atmosférico directamente debido a sus triples enlaces moleculares. En la naturaleza, la fijación de nitrógeno la llevan a cabo principalmente en microorganismos llamados bacterias fijadoras de nitrógeno y las cianobacterias (Howard & Rees, 1996). Estos microorganismos pueden convertir el nitrógeno gaseoso en amonio (NH₄), una forma que las plantas pueden asimilar y metabolizar. Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno viven en simbiosis en nódulos en las raíces de las plantas donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Otras bacterias fijadoras de nitrógeno están libres en el suelo y también realizan la fijación de nitrógeno (Cheng, 2008; Ribbe, 2011).

El equipo bioquímico necesario para el proceso de biofijación de nitrógeno es proporcionado por un sistema enzimático llamado nitrogenasa. Las nitrogenasas son metaloenzimas complejas las cuales son inestables en presencia de Oxígeno. Este complejo está formado por dos elementos: el primero, un dímero llamada diazotasa reductasa, también llamada ferritina, actúa como donante de electrones dependiente de ATP; el otro es un heterodímero llamado ferroproteína de molibdeno o diazotasa para abreviar; contiene el sitio catalítico de la enzima (centro catalítico P y cofactor FeMo (Dixon & Kahn, 2004; Ribbe, 2011).

La unidad transcripcional que codifica para los genes necesarios para crear este complejo enzimático se llama *nifHDK*. Éste complejo trabaja en conjunto para reducir el nitrógeno en amonio a través de la siguiente reacción: $N_2 + 8e^- + 16MgATP + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16P_i$ (Hamilton *et. al.* 2011, Dixon & Kahn, 2004). En cuanto a la regulación de la genética, NifA es una proteína la cual tiene un papel de activador transcripcional del operón *nifHDK* de la nitrogenasa, NifL es un regulador negativo de la proteína NifA. ya que el activador del operón NifA se encuentra unido a NifL impidiendo su función (Ribbe, 2011).

1.3 Sistema de doble componente,

Los sistemas de dos componentes (SDC) se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, arqueas y algunos organismos eucariotas (Appleby *et. al.* 1996). Son proteínas que les permiten a las bacterias monitorear el medio ambiente y generar respuestas en consecuencia de los estímulos percibidos. Un SDC está formado por dos proteínas: Una proteína histidina cinasa (HK) se encuentra generalmente en la membrana citoplasmática, que se encarga de detectar el estímulo y transmitirlo al dominio receptor del regulador de respuesta (RR) el cual media una respuesta adaptativa. Una de las clasificaciones utilizadas para explicar la naturaleza de la transmisión de la señal, se basa en el dominio citoplasmático; en donde las cinasas son clasificadas como clásicas, híbridas y heterodoxas (Jung *et. al.* 2012). En las clásicas el dominio transmisor tiene un dominio de entrada y un dominio el cual transmite la señal, este último se divide en dos regiones: la región DHP/HisKA (de dimerización y fosforilación), conteniendo un residuo de histidina que será fosforilado y la región catalítica (CA/HATPasa) que es el responsable de la unión de ATP y de fosforilar la His del DHP. Las HKs híbridas contienen dominios adicionales REC encargados de recibir la señal de fosforilación y llevar a cabo el efecto de respuesta. Por último, las HKs heterodoxas aparte del dominio REC poseen un dominio histidina fosfotransferasa (Hpt) (Appleby *et. al.* 1996; R & M, 2000; Wolanin, *et. al.* 2002; Gao & Stock. 2009).

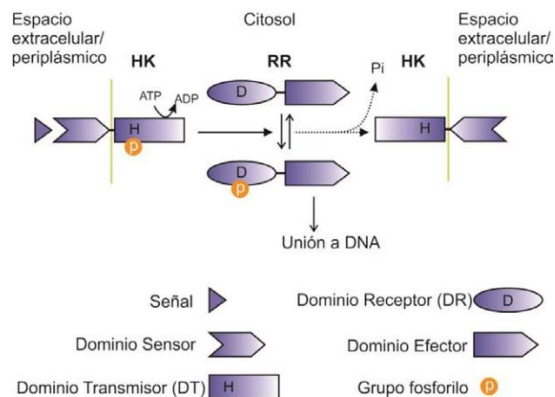


Fig.2 Sistema de doble componente, características y su estructura (Álvarez 2016).

1.4 Sistema GacS/GacA.

El sistema de dos componentes GacS/GacA se encuentran ampliamente distribuidas entre un gran número de bacterias gram negativas, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella* y *Vibrio*, entre otras (Lapouge *et. al.* 2008, Huihui *et. al.* 2023). Su nombre deriva de “for global antibiotic and cyanide control” ya que la mutación GacS regula la síntesis de ácido cianhídrico en *Pseudomonas*. El TCS GacS/A está constituido por la HK no ortodoxa GacS y su RR GacA. GacS fue originalmente descrito en *Pseudomonas syringae pv. syringae* como un regulador clave de los factores de virulencia (Hrabak & Willis, 1992). Actualmente se sabe que el sistema tiene influencia sobre la patogenicidad y virulencia de diversos patógenos. GacA fue descrito inicialmente como un regulador maestro de metabolitos antifúngicos en *Pseudomonas protegens* (antes *Pseudomonas fluorescens CHA0*) (Laville *et. al.* 1992). La función de este sistema es la activación de la expresión de pequeños RNAs reguladores los cuales antagonizan la función de la proteína RsmA la cual regula positiva y negativamente la expresión de diferentes RNA mensajeros blanco a nivel post-transcripcional (Lapouge *et. al.* 2007).

En estudios genómicos y proteómicos se ha demostrado que existen diversas vías reguladas por GacA, como la producción de moléculas señal de N-homoserín lactonas y metabolitos secundarios, participando en la infección aguda o crónica, en *P. aeruginosa*, regula a través de la activación de GacS/GacA que regula la producción de ncRNAs RsmY y RsmZ que a su vez interactúan con la proteína rsmA inhibiéndola de su función, podemos observar que esta vía regula fenotipos como: la formación de biofilm, movilidad y resistencia a antibióticos, entre otros más. Es destacable que en esta bacteria se demostró la interacción de otras cinasas con GacS/GacA formando un sistema de multicomponentes. En *P. aeruginosa* se descubrió que la cinasa RetS bloquea la autofosforilación de GacS formando un heterodímero inhibiendo esta vía, en cambio la cinasa LadS se propone controla la expresión de los genes de *rsmY* y *rsmZ* interactuando con el sistema GacS/GacA

esto lo hace mediante un mecanismo de fosforelevo donde LadS utiliza los dominios H1-2 y D1 de GacS formando así un sistema de traducción de señales de multicomponente (Chambonnier G *et. al.* 2016; Huihui *et. al.* 2023).

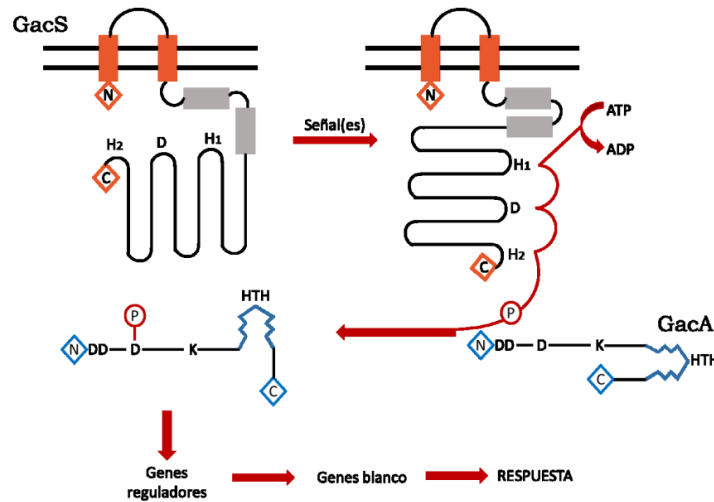


Fig.3 Cuadro Modelo de la vía de transducción de señales mediado por el sistema de doble componente GacS/GacA (Adaptado de Heeb & Hass, 2001).

En la bacteria *E. coli* existe un homólogo del sistema GacS/A ampliamente estudiado, BarA/UvrY la cual se encuentra regulando el cambio en el metabolismo central, así mismo el metabolismo secundario en la producción de factores de virulencia, movilidad, formación de biofilm, quorum sensing y la resistencia al estrés oxidativo. La proteína UvrY activa la expresión de los ncRNAs CsrB y CsrC antagonizando la función de la proteína CsrA homóloga de RsmA. Ambos RNAs no codificantes son blancos de CsrD, responsable de activar la degradación dependiente de RNAsa-E (Morin *et. al.* 2017). Este sistema está ampliamente conservado en diferentes gama-protobacterias como son BarA/SirA (*Salmonella*), VarS/VarA (*Vibrio*), ExpS/ExpA (*Pectobacterium*) y LetS/LetA (*Legionella pneumophila*), en los cuales principalmente regulan metabolismo del carbono, formación de biopelículas, fenotipos asociados a patogenicidad, resistencia al estrés y algunos factores de virulencia (Camacho *et. al.* 2016).

Tabla 1. Estudio sobre GacS/GacA y sus TCS homólogos, incluidos los miembros del sistema Csr/Rsm regulados aguas abajo y los principales fenotipos reguladores.

Especie	Homólogos de GacS/GacA	Proteínas de unión al ARN	ARNs regulados	Principales fenotipos reguladores
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GacS/GacA	RsmA, RsmF	RsmY, RsmZ	AHLs, virulencia, biofilm, motilidad, metabolismo, T3SS, T6SS
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GacS/GacA	RsmA, RsmE	RsmX, RsmY, RsmZ	Metabolismo, proteasa, fosfolipasa, RpoS, motilidad
<i>Pseudomonas syringae</i>	GacS (LemA)/GacA	RsmA1-5	RsmX1-5, RsmY, RsmZ	Crecimiento, siringomicina, motilidad, alginato, virulencia, metabolismo, QS
<i>Escherichia coli</i>	BarA/UvrY	CsrA	CsrB, CsrC	Metabolismo, motilidad, biofilm, resistencia al estrés, virulencia, QS
<i>Legionella pneumophila</i>	LetS/LetA	CsrA	RsmY, RsmZ	Citotoxicidad, virulencia, motilidad, morfología celular, respuesta al estrés, T4SS
<i>Vibrio cholerae</i>	VarS/VarA	CsrA	CsrB, CsrC, CsrD	QS, biopelícula, virulencia, forma de célula
<i>Salmonella enterica</i>	BarA/SirA	CsrA	CsrB, CsrC	Virulencia, motilidad, metabolismo, supervivencia al estrés, biofilm
<i>Pectobacterium wasabiae (Erwinia carotovora)</i>	ExpS/ExpA	RsmA	RsmB	Enzimas extracelulares, virulencia, flagelos, arpin _{Ecc} , T2SS, T6SS, PCWDE
<i>Azotobacter vinelandii</i>	GacS/GacA	RsmA	RsmZ1-7, RsmY	Alginato, PHB, ARs, flagelos

Fig.4 tabla de los sistemas doble componente gacS/GacA y sus homólogos en otras bacterias, así como su sistema de regulación y sus fenotipos (recuperado de Huihui et. al 2023).

1.5 Sistema postranscripcional Rsm.

El sistema Rsm regula el metabolismo secundario, refiriéndose al acrónimo “Repressor of secondary metabolites” porque RsmA se asocia como inhibidor global de metabolitos secundarios (Cui *et. al.* 1995). Otros autores lo definen como “Regulator of secondary metabolism” por su capacidad de regular el metabolismo secundario de diversas bacterias. Esto es incluyendo snc-RNA y RsmA. Esta última es una proteína que normalmente actúa como un inhibidor sobre la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) diana regulados. RsmA bloquea su traducción al unirse al sitio de unión del ribosoma.

El sistema Csr/Rsm (regulador/represor de almacenamiento de carbono de metabolitos secundarios) es un sistema regulador global multicomponente que está bien conservado en bacterias y controla la expresión genética de muchas funciones celulares importantes. El sistema Csr inhibe el metabolismo de la glucosa hepática, la gluconeogénesis, la formación de biopelículas y la detección de quórum mientras activa la glucólisis, la motilidad celular, la virulencia y la patogénesis en especies como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Pseudomonas* o *Vibrio*, como se muestra en las gamma proteobacterias (Esquerré *et. al.* 2016). Los primeros estudios de la unión del homólogo de la proteína RsmA se realizaron en CsrA de *E. coli* en los cuales se observó que su unión promueve la desestabilización del RNA mensajero blanco, ya que CsrA se une a la secuencia Shine-Dalgarno y con ello bloquea la secuencia de unión al ribosoma y por ende la traducción del RNAm (Soberano & Valverde, 2020).

Los snc-RNA tienen una estructura muy parecida a la que reconoce la proteína RsmA, cuentan con múltiples motivos GGA que se encuentran expuestos en las asas de las estructuras secundarias de tallo y asa, estos motivos se han identificado como sitios de unión a la proteína RsmA, lo que les da la capacidad de secuestrar a la proteína permitiendo la traducción de los RNAs mensajeros blanco de regulación (Valverde *et. al.* 2003; Valverde *et. al.* 2004).

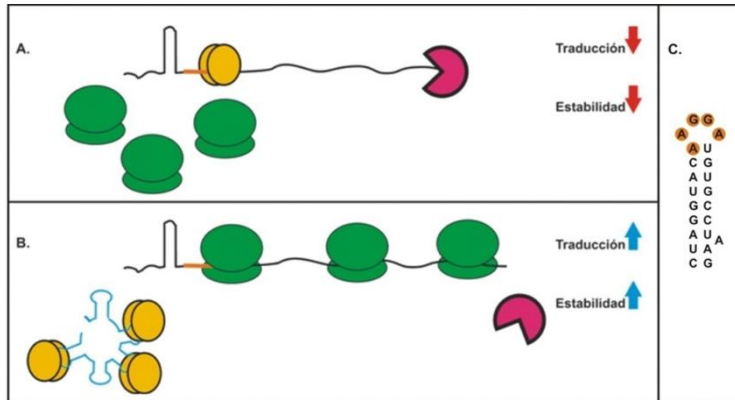


Fig. 4. Esquema de la función de la proteína RsmA y represión por Parte de ncRsm. En en el apartado A) se puede observar a la proteína rsmA representada con la figura de color amarillo unida a la secuencia Shine-Dalgarno del RNAm impidiendo al unió del ribosoma representado con la figura de color verde y por ende impidiendo la traducción, B) se puede ver a los snc-RNA secuestrando a la proteína rsmA liberando el sitio de unión del ribosoma y permitiendo llevar a cabo la traducción (Lapouge et. al. 2008).

Dentro de la familia Pseudomonadaceae, estas moléculas de RNA se han clasificado en cinco familias según su secuencia y estructura secundaria: RsmV, RsmW, RsmX, RsmY y RsmZ. Dicha clasificación se realizó primero en *P. protegens CHA0*, de las cuales se clasificaron las tres últimas (Molls et. al. 2010), mientras que las dos primeras moléculas (RsvmV y RsmW) se describieron posteriormente en *P. aeruginosa*. RsmV y RsmW fueron los únicos nc-RNA en este sistema con regulación no relacionada al sistema de dos componentes GacS/GacA por lo que se ha sugerido un origen evolutivo diferente (CL et. al. 2016; Janssen et. al. 2018).

La comparación entre bacterias entéricas y otras especies relacionadas, mostraron que el número de los snc-RNA varia, pero generalmente se ha observado que la mayoría de las bacterias poseen un numero pequeño de snc-RNA de entre 2 a 4, exceptuando a *A. vinelandii* la cual posee el mayor número de snc-RNA actualmente descritos teniendo ocho snc-RNA de la familia RsmZ y uno de la familia RsmY (Esquerré et. al. 2016; Manzo et. al. 2011; Pliego et. al 2019).

1.6 Producción y Funciones biológicas de los Biopolímeros de interés biotecnológico.

A. vinelandii a lo largo de los años ha sido una de las bacterias más estudiadas a nivel genético, ya que participa en muchos procesos biológicos importantes como son: cinética enzimática, el estudio de las vías metabólicas, la regulación genética, la fijación de nitrógeno, absorción de hidrógeno, entre otras más. En los últimos años el estudio de esta bacteria tiene su importancia debido a su capacidad en la producción de polímeros de interés industrial como son alginatos, poli- β -hidroxibutirato (PHB) y alquilresolsinoles. El primero por sus propiedades como estabilizante, emulsificante, gelificante, principalmente en el área médica, farmacéutica, dental y alimentaria; el segundo por su potencial de generar plásticos biodegradables provenientes de una fuente renovable y el último, por sus propiedades biológicas tales como antifúngicas, antibacterial, citotóxica, antioxidante y como biomarcadores (Muñoz *et. al.* 2019; Noar & Barcena, 2018; Suaza & Coy, 2014).

Los alginatos son polímeros compuestos de ácido manurónico y su epímero el ácido gulurónico provenientes de la fructosa 6-fosfato. En *A. vinelandii* los alginatos son sintetizados principalmente en la fase vegetativa y actúan como barrera para la difusión de oxígeno que es una de sus funciones principales. Durante la fase de enquistamiento los alginatos son el componente principal de las capas exina e intina de los quistes, y son esenciales para la formación de quistes maduros (Moser *et. al.*, 2021; Muhammadi & Ahmed, 2007).

A. vinelandii es una de las bacterias ampliamente estudiadas en cuanto a la regulación de la producción de estos polímeros, el sistema de doble componente GacS/GacA, es uno de los más estudiados, debido a su correlación con el sistema Rsm y al funcionar como antagonistas de la función de la proteína RsmA, actúa regulando a nivel postranscripcional la expresión de genes clave para la expresión de dichos polímeros. El sistema GacS/Rsm regula 1) la producción de PHB a través de la regulación de *phbR* que codifica para el operón biosintético, *phbBAC* encargados de la producción de este polímero, 2) regula la síntesis del alginato mediante, la regulación post-transcripcional del gen *algD*, clave en la síntesis de alginato (Castañeda *et. al.* 2001; Hernández *et. al.* 2012).

1.7 Sistema de multicomponente *A. vinelandii*.

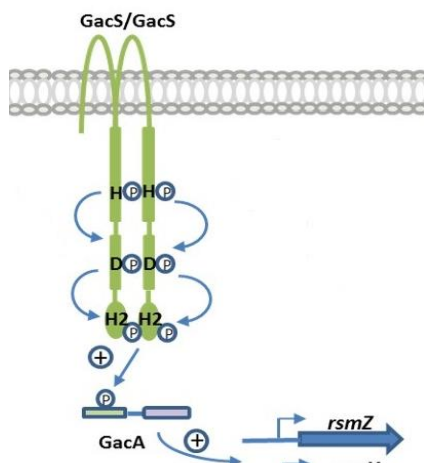


Fig. 5. Sistema de GacS/GacA en *A. vinelandii*.

En *A. vinelandii*, se exploró la posibilidad de que existiera como en *P. aeruginosa*, la participación de un sistema de multicomponente, donde el estado de fosforilación de la proteína GacS pudiera ser influenciado por alguna otra cinasa.

En *A. vinelandii* mediante estudios *in silico* se reconocieron 39 cinasas histidínicas, de las cuales 27 son consideradas como clásicas, 4 no ortodoxas, 7 como híbridas y una clasificada como CheA (datos no publicados).

Se encontró una proteína homóloga a la proteína RetS del multicomponente descrito en *P. aeruginosa*, sin embargo, en vez de tener una participación como un represor transcripcional, se observó que funciona como regulador positivo del sistema Rsm en condiciones de fijación de nitrógeno, regulando de manera positiva la producción de alginato (Rosales *et. al.* 2024).

Pliego *et. al.* 2022 por medio de un análisis de BlastP encontraron una proteína con una identidad muy parecida a LadS codificada por HrgS (Avin_34990), la predicción de los dominios contenidos en la proteína demostró una arquitectura característica de los homólogos de LadS. Además de que demostraron la participación de HrgS en la vía de regulación del sistema Rsm, esto se comprobó por medio de fusiones transcripcionales de *gusA* en *rsmZ1*, *rsmZ2* y *rsmY* observando un aumento significativo en la transcripción de estos, gracias a la mutación en HrgS. Así mismo, se observó que esta histidina cinasa no interactúa con GacS y HptB, por último, no posee un dominio Hpt; sin embargo, participa en la regulación de la producción de alginato a través de la regulación de la expresión de los snc-RNA (López *et. al.* 2022).

1.8 Sistema Rsm de *A. vinelandii*.

La regulación a nivel post-transcripcional controla la expresión del RNA mensajero hacia la producción de una proteína. Este paso puede ser controlado de diversas formas, a través de la unión de proteínas de unión a RNA, RNAs de interferencia, riboswitches, entre otros. El sistema Rsm y su homólogo Csr en *E. coli*, es un sistema de control post-transcripcional que funciona a través de la unión de la proteína reguladora RsmA a sus RNA mensajeros blanco con la finalidad de desestabilizar a la molécula y promover su degradación. Por su parte los sRNAs son moléculas pequeñas de RNA que mimetizan la unión de la proteína y por lo tanto promueven la expresión de los blancos de regulación (Vakulskas *et. al.* 2015)

A. vinelandii presenta ocho snc-RNA, 7 de la familia Z (*rsmZ1-Z7*) y uno de la familia Y (*rsmY*) (Manzo *et. al.* 2011; Pliego *et. al.* 2019). Esto refleja la complejidad de la regulación en este nivel. La unión de RsmA a los RNA mensajeros blancos, promueve su degradación al adherirse cerca del sitio de unión del ribosoma, previniendo su traducción y promoviendo la degradación por complejos de RNasa E (Romero *et. al.* 1998; Hernández *et. al.* 2012; Manzo *et. al.* 2011). Por su parte, los sRNA de *A. vinelandii*, han mostrado tener una expresión diferencial en medio mínimo Burk-sacarosa, teniendo una expresión mínima *rsmZ1*, *rsmZ3* y *rsmZ5*; mientras que *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ6* y *rsmZ7*, *rsmZ1* presentan un nivel de expresión mínimo en comparación con *rsmZ2* que presenta la máxima expresión a lo largo de la curva de crecimiento Fig. 6.

Las diferencias en los niveles de expresión de los alelos *rsmZ* pueden ser debido a las diferencias en las regiones reguladoras; así que fueron agrupadas en aquellas con regiones reguladoras grandes (presentes en *rsmZ1* y *Z2*) y las que presentan regiones reguladoras pequeñas (*rsmZ3-7*). Otra diferencia es la posición del sitio al activador transcripcional GacA (Pliego *et. al.* 2018).

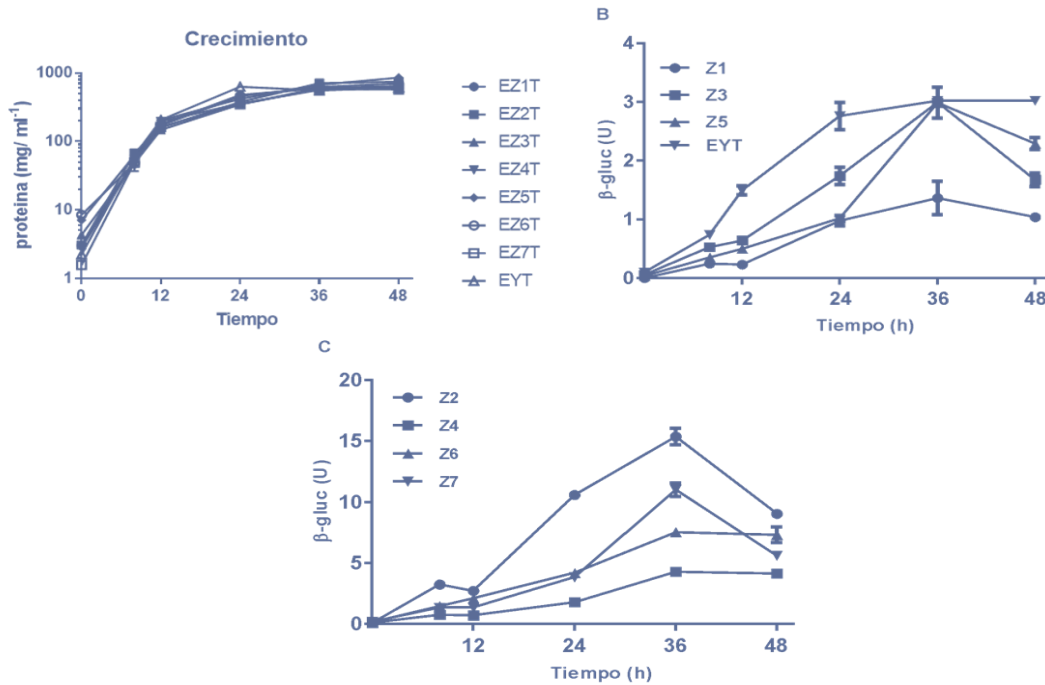


Fig. 6. Perfiles de expresión de los genes *rsmZ1–7* sRNA en *A. vinelandii*. (A). Cinética de crecimiento de las cepas que llevan *rsmZ1–7*-. B y C) Fusiones transcripcionales de *gusA* (EZ1T–EZ7T). Actividad promotora de la *rsmZ1* (Z1), *rsmZ3* (Z3) y *rsmZ5* (Z5) (B) o *rsmZ2* (Z2), *rsmZ4* (Z4), genes *rsmZ6* (Z6) y *rsmZ7* (Z7) medidos a lo largo de la curva de crecimiento, usando las fusiones transcripcionales *rsmZ1–7-gusA*. Células se cultivaron en medio de sacarosa de Burk. Barras de desviación estándar de tres experimentos independientes (repeticiones biológicas).

Pliego *et. al.* 2019, realizaron un estudio en el cual se aportó evidencia genética de que *rsmY1* y *rsmY2* constituyen una sola unidad transcripcional gracias este estudio solo se tomaría en cuenta un solo *rsmY*. Los estudios transcripcionales mostraron que *rsmY* tiene su mayor expresión durante la fase de crecimiento estacionario, y en ausencia de RsmZ1, *rsmY* aumenta su transcripción, además, se encontró que GacA regula positivamente la transcripción de *rsmY*, estos resultados se obtuvieron a partir de una fusión transcripcional de la región reguladora de *rsmY* con el gen reportero *gusA*.

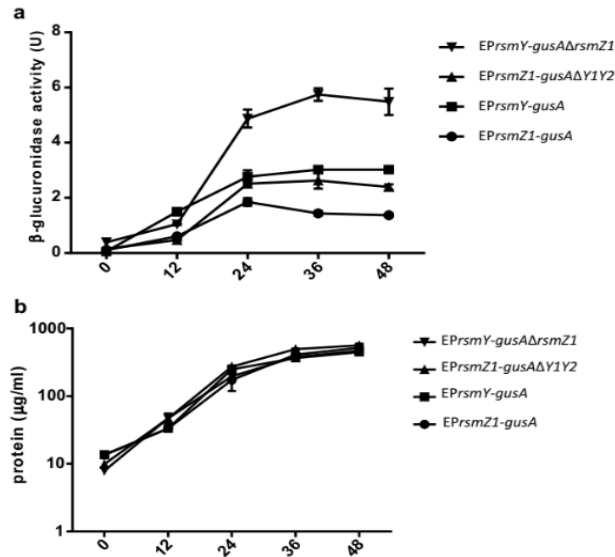


Fig. 7. Estudio transcripcional de *rsmY*. actividad de la β -glucuronidasa (a) y Crecimiento (b) en el medio de Burk complementado con 2% sacarosa se muestran para las cepas *EPrsmY-gusA* (línea continua con cuadrado), *EPrsmY-gusA rsmZ1* (línea continua con triángulo invertido), *EPrsmZ1-gusA* (línea continua con círculo) y *EPrsmZ1-gusAΔY1Y2*.

2.- Antecedentes

Diversos estudios han revelado que una interrupción en el gen *nifL* genera la activación del activador transcripcional *nifA* y como consecuencia la expresión de los genes *nif* que codifican para la nitrogenasa de *A. vinelandii*. NifL actúa como un represor de la actividad de NifA que es un activador transcripcional dependiente del factor sigma 54 responsable de transcribir los genes del operón *nifHDK* que codifican para la nitrogenasa dependiente de molibdeno. En consecuencia, se generó la mutación en el gen que codifica para el regulador NifL y se observó que la desregulación de la expresión de la nitrogenasa permite la acumulación de amonio en el medio extracelular hasta de 30mM durante la fase estacionaria de crecimiento (Barney *et. al.* 2017).

En el estudio de Barney *et. al.* 2017, se generó una cepa mutante en el gen *nifL* llamada AZBB163. El estudio realizado proporciona una representación gráfica de los valores de FPKM (Fragments per kilo base per million mapped reads) obtenidos en el análisis de RNA-Seq. Se seleccionó este método para proporcionar una visión

de los cambios transcripcionales entre diferentes cepas y condiciones, así mismo para mostrar las cantidades relativas de transcripciones encontradas para genes individuales, los resultados representan los promedios y las desviaciones estándar de los valores de FPKM para todos los puntos temporales de muestreo. En el estudio se analizó la cepa *A. vinelandii* DJ en diferentes condiciones: en un medio con ausencia de amonio y en medio adicionado con amonio, comparado con la cepa mutante AZBB163 y la cepa silvestre DJ; demostrando que los niveles de producción de amonio, así como de la expresión de las nitrogenasas era mayor en la cepa mutante que en la DJ en las distintas condiciones (Barney *et. al.* 2017).

Los datos obtenidos por Barney, se utilizaron para realizar el presente estudio con el número GEO GSE97402 para analizar los cambios en la expresión de los nc RNAs del sistema Rsm en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno, a través de un análisis de expresión diferencial. Utilizamos los datos para realizar un estudio bioinformático para obtener la expresión diferencial del sistema Rsm, así como los datos de los genes de biosíntesis de la nitrogenasa (*nifHDKH*) utilizados como control de estudio, puesto que se sabe que la presencia de amonio reprime la fijación de nitrógeno (Barney *et. al.* 2017).

2.1 Estudio del efecto del amonio en la expresión de los snc-RNA no codificantes del sistema Rsm *A. vinelandii*.

En el laboratorio de genética molecular microbiana se realizó un estudio en el cual se generó una cepa mutante en el gen *nifL*, (represor de la expresión de los genes necesarios en la síntesis de la nitrogenasa). Se ha propuesto que mutaciones en el gen *nifL* genera cepas con la capacidad de fijar nitrógeno aún en presencia de amonio, así como exportarlo al medio de cultivo. La mutación del gen *nifL* se realizó por inserción de un casete de resistencia a gentamicina utilizando la enzima *Sall*.en las cepas que contienen las fusiones transcripcionales de los sRNAs rsmZ1-7 generando una mutación polar y otra no polar (Juárez, 2019; Bali *et. al.* 1992).

En este estudio analizaron la expresión de los snc-RNA del sistema Rsm en estas condiciones con el objetivo de saber si la presencia de Amonio disminuye la

expresión de los snc-RNA o si la condición fisiológica de fijación o no fijación intervenía en esta expresión como una señal a tomar en cuenta. El análisis se realizó mediante la medición de la expresión de los snc-RNA en las fusiones transcripcionales con la mutación en *nifL*; a través de la cuantificación de la actividad β -glucuronidasa en medio mínimo BS, esto para poder observar la diferencia en la expresión entre la cepa silvestre AEIV y el efecto causado por la mutación. Según la gráfica 1 podemos observar un efecto negativo en la expresión de los snc-RNA del 2-7 en cambio para rsm Z1 un ligero aumento. Los resultados de expresión obtenidos demuestran que hay un efecto de represión de la expresión de los snc-RNA en presencia de amonio y en la mutante *nifL* en medio mínimo BS sin la adición de amonio (Juárez, 2019).

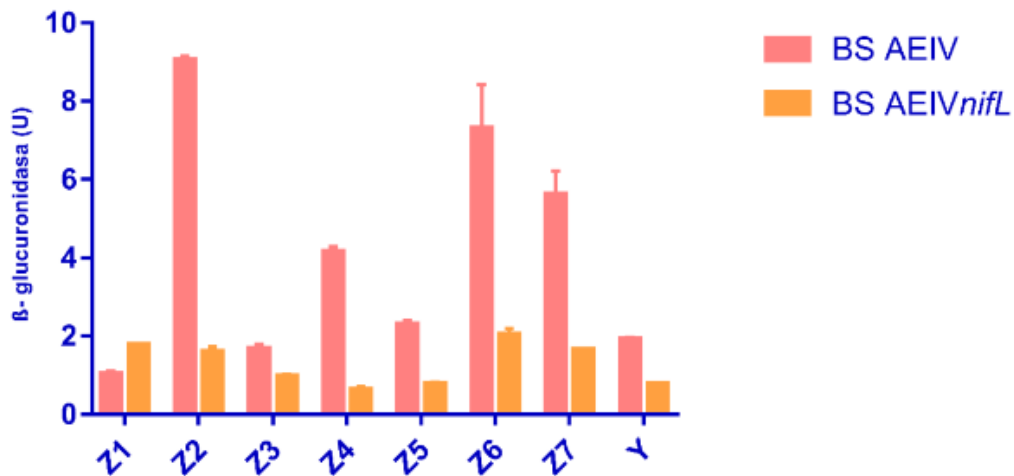


Fig. 8.- Expresión en las fusiones transcripcionales de los sRNAs rsmZ1-7 y rsmY en la cepa AEIV y de la mutantes *NifL*, en medio mínimo BS. Se observa claramente que la expresión es significativamente mayor en la cepa silvestre (AEIV), que en las fusiones con la mutación *nifL*; con la excepción de rsmZ1, en la cual se puede percibir un ligero aumento en la expresión de la mutante (Juárez, 2019).

3.- Planteamiento del problema

El sistema de regulación post-transcripcional Rsm juega un papel importante en la regulación de genes para producción de metabolitos secundarios de interés industrial, como son alginatos y PHB en *A. vinelandii*. El análisis expresión diferencial del sistema Rsm, nos permitirá analizar la repercusión de las diferentes condiciones en la expresión de los sRNAs, permitiendo incidir sobre las estrategias para mejorar su producción.

4.- Hipótesis

- Los snc-RNA del sistema Rsm de la cepa *A. vinelandii* DJ presentan una disminución de su expresión en presencia de amonio.

5.- Objetivos

5.1 General

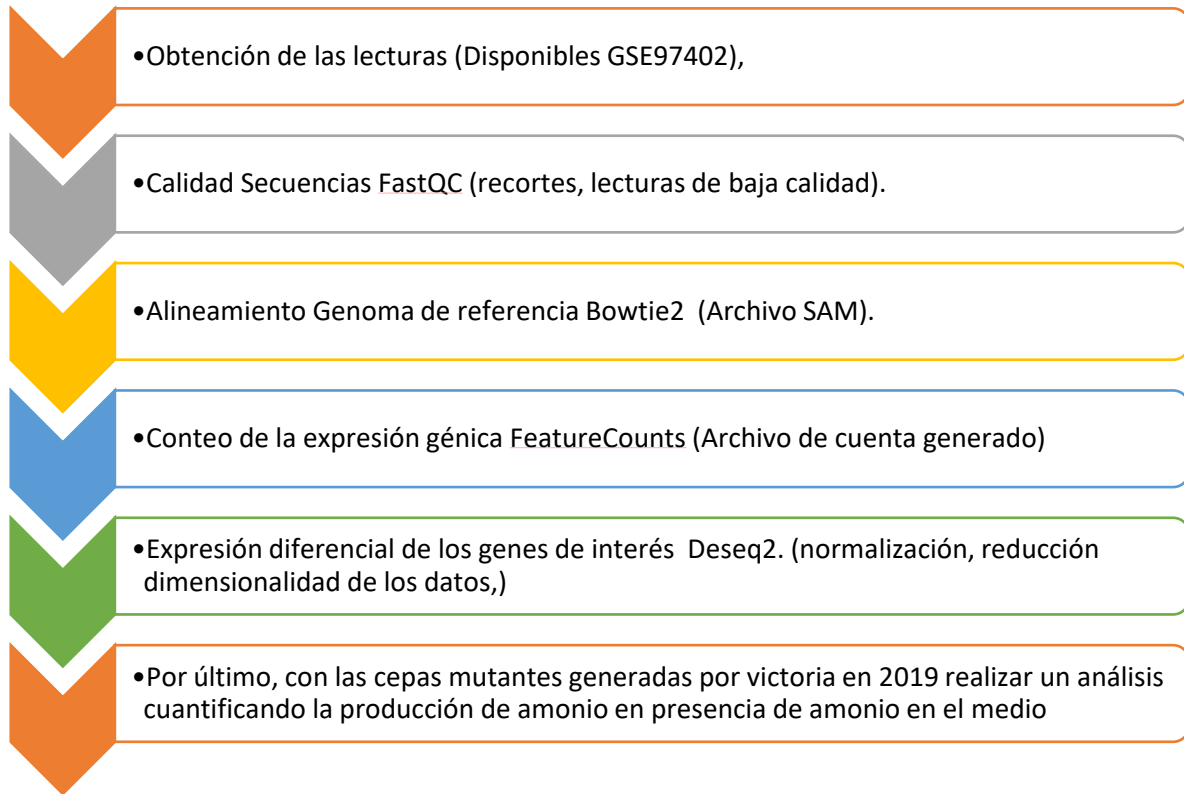
- Obtener la expresión diferencial de los genes que codifican para los snc-RNA de la familia Rsm en *A. vinelandii* DJ en condiciones de fijación de nitrógeno y en presencia de amonio.

5.2 Particulares

- Realizar análisis de la expresión diferencial del sistema rsm en el transcriptoma en *A. vinelandii* DJ en condiciones diazotróficas y adiazotróficas
- Obtener la expresión diferencial en el transcriptoma en *A. vinelandii* DJ de los elementos del sistema Rsm en condiciones de fijación de nitrógeno y en presencia de amonio
- Cuantificar la producción de amonio extracelular en las mutantes *A. vinelandii* AEIV de *nifL*.

6.- Material y Métodos

6.1 Diagrama de Trabajo



6.2 Obtención de las secuencias

Las secuencias se obtuvieron del NCBI Gene Expression Omnibus, del número GSE97402, este archivo contiene los resultados del análisis de la expresión diferencial para dos cepas diferentes; la cepa *A. vinelandii* (WT) y la cepa mutante AZBB163, la cual está desregulada para la fijación de nitrógeno. En dos tipos de medio, Burk estándar (B) y Burk enriquecido con 20 mM de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ (BNH4).

Tabla 1.- Datos recopilados para el análisis a realizar.

Numero de Secuencia	Replicado	Cepa	Día	Tipo de Medio
SRR5417186	a	AvWT	1	B
SRR5417187	b	AvWT	1	B
SRR5417188	a	AvWT	2	B
SRR5417189	b	AvWT	2	B
SRR5417190	a	AvWT	3	B
SRR5417192	a	AvWT	1	BNH4
SRR5417193	a	AvWT	2	BNH4
SRR5417194	b	AvWT	2	BNH4

(B corresponde al medio Burk mientras que BNH4 representa el medio adicionado con sulfato de amonio) así como las diferentes etapas de crecimiento representada en días. el día 1 corresponde a la fase exponencial de crecimiento, días 2 y 3 Fase estacionaria.

6.3 Análisis y tratamiento de las secuencias.

Una vez obtenido los datos de la secuenciación (RNA-seq), se realizó el análisis de la calidad de las secuencias detectando las regiones de baja calidad así mismo la presencia de adaptadores ya que este tipo de artefactos afectan a la continuación del análisis. Por medio del programa FastQC se visualiza la calidad de todas las secuencias permitiéndonos seleccionar y eliminar aquellas secuencias que podrían afectar al análisis a realizar posteriormente.

Una vez seleccionadas las muestras de alta calidad se realizó un alineamiento de las muestras obtenidas del RNA-seq con el genoma de referencia de *A. vinelandii* este proceso se llevó a cabo por medio del programa Bowtie2 (Langmead *et. al.* 2012) el cual nos dio un archivo de tipo SAM con los datos de la posición de cada secuencia en base al genoma de referencia.

Posteriormente, se realizó un conteo del número de veces que se expresa un gen o transcrito de la muestra a estudiar, para ello se utilizó el programa FeatureCounts (Liao *et. al.* 2014) el cual mediante el archivo SAM generado en el paso anterior, permite obtener una tabla, llamada tabla de cuentas, con el identificador de la muestra en las columnas y en las filas el número de cuentas por gen identificado.

Los datos obtenidos en la tabla de cuentas, representan al tipo de gen o transcrito, la muestra, el número de RNA mapeados por gen, cabe destacar que de las 8 muestras a analizar se obtuvo información de la expresión de más de 5 mil genes en específico, genes referentes a la fijación de nitrógeno que *nifHDK* que servirán como grupo control y los genes de interés rsm los cuales nos permitirán cuantificarlos en base a su expresión relativa, permitiendo realizar un análisis de expresión diferencial comparándolo con las distintas muestras.

6.4 Análisis de la expresión diferencial

El análisis de la expresión diferencial tiene la función de identificar la expresión de los genes y su variabilidad en esta expresión, en distintas condiciones en el caso de nuestro análisis, en condición uno que sería en un medio Burk -sacarosa estándar y en condición 2 en un medio Burk adicionado con sulfato de amonio 20 mM y ver la expresión diferencial en estas condiciones. Para realizar este análisis hay que normalizar la profundidad de la secuenciación, para esto utilizamos el programa Deseq2 (Love *et. al.* 2014), una vez normalizado obtendremos lo datos de la expresión diferencial de las muestras.

Al tener esta gráfica de expresión diferencial de los genes se realizaron diferentes tipos de análisis estadísticos para comparar y analizar el comportamiento de estos. Utilizamos el PCA (análisis de componentes principales) el cual tiene como fin

observar a la dimensionalidad del conjunto de datos, identificando los componentes principales que ayudan a maximizar la varianza de las observaciones.

Por último, tomando los IDs del rsm (Z1-7, Y, A) realizamos una gráfica comparativa de expresión diferencial en el cual se visualizó la varianza en la expresión de los Rsm teniendo como control de comparación a rsmA, el cual tiene relación con los mismos.

6.5 Análisis de la cuantificación de amonio

La cuantificación de amonio se realizó de la siguiente manera: se realizó un precultivo de la cepa AIEV y la mutante *nifL* polar y *nifL* no polar (realizadas por Victoria en 2019), en 25 ml de medio mínimo Burk-Sacarosa adicionado con los antibióticos Nal (ácido nalidixico) y Gm (Gentamicina) (tabla 3).

Posteriormente, se realizó un cultivo por triplicado adicionado con NH₄Cl (15 mM) y un grupo control, con medio mínimo BS sin amonio; se dejó crecer por 48 horas a 200 rpm de agitación. Pasadas las 48 hrs se tomaron 5 ml de cultivo y se cosecharon las células a 10,000 rpm por 5 minutos, se colectó el sobrenadante para hacer la cuantificación del amonio con el método de Berthelot (1997). Además, se realizó una curva estándar para correlacionar la concentración de amonio.

La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera debido a que se realizaron modificaciones para la estabilización de la reacción. Para la realización de la curva estándar se utilizaron 200µl de fenato de sodio, 20 µl nitroprusiato de sodio, 100 µl hipoclorito de sodio (0.1M) se le agrego agua destila para aforar a 1 mililitro. Respecto al amonio se utilizaron las concentraciones de 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.20, 0.300, 0.400 mM para la medición de la concentración de las diferentes muestras, del sobrenadante de cada muestra se tomaron 400 µl para AIEV *nifL*polar y no polar, aforando a 1 ml de volumen final con agua destilada. Todas las muestras se procedieron a medir a una absorbancia $\lambda=625$ nm, para observar su comportamiento.

Tabla 2.- Tabla Material biológico, medios, soluciones y antibióticos utilizados.

Material Biológico	Medios utilizados	Antibióticos	Soluciones
<i>Azotobacter vinelandii</i>: AEIV	Medio mínimo Burk-Sacarosa.	Ácido nalidixico (Nal).	Nitroprusiato de sodio
<i>Azotobacter vinelandii</i>: Mutante <i>nifL</i> polar	Medio mínimo Burk-Sacarosa. Adicionado con NH ₄ Cl [15 mM]	Gentamicina (Gm)	Fenato de sodio al 20%
<i>Azotobacter vinelandii</i>: mutante <i>nifL</i> no polar			Hipoclorito de sodio [0.1 M]

7.- Resultados

Gracias a la utilización de las herramienta DESeq2 y del programa de Rstudio se obtuvieron los resultados necesarios para realizar el análisis estadístico de PCA en el que se compararon las muestras del medio Burk y el medio Burk adicionado con sulfato de amonio 20 mM, así mismo se realizó el análisis la expresión diferencial en el cual se buscó observar la expresión de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno, así como los del sistema Rsm en *A.vinelandii*, en base a las dos condiciones descritas.

7.1 Análisis de PCA

El análisis de PCA tiene como finalidad observar la varianza de la expresión, así como identificar la dimensionalidad de los datos analizados. En la Fig.9 Podemos observar que los componentes se agrupan a en diferentes extremos del gráfico, además de tener un valor de más del 50% de varianza entre sí. Lo cual nos indica que hay expresión de diferentes genes entre un medio con respecto el otro lo que quiere decir que se puede continuar con el siguiente análisis y realizar una expresión diferencial observando el comportamiento de los genes de interés en estas dos condiciones.

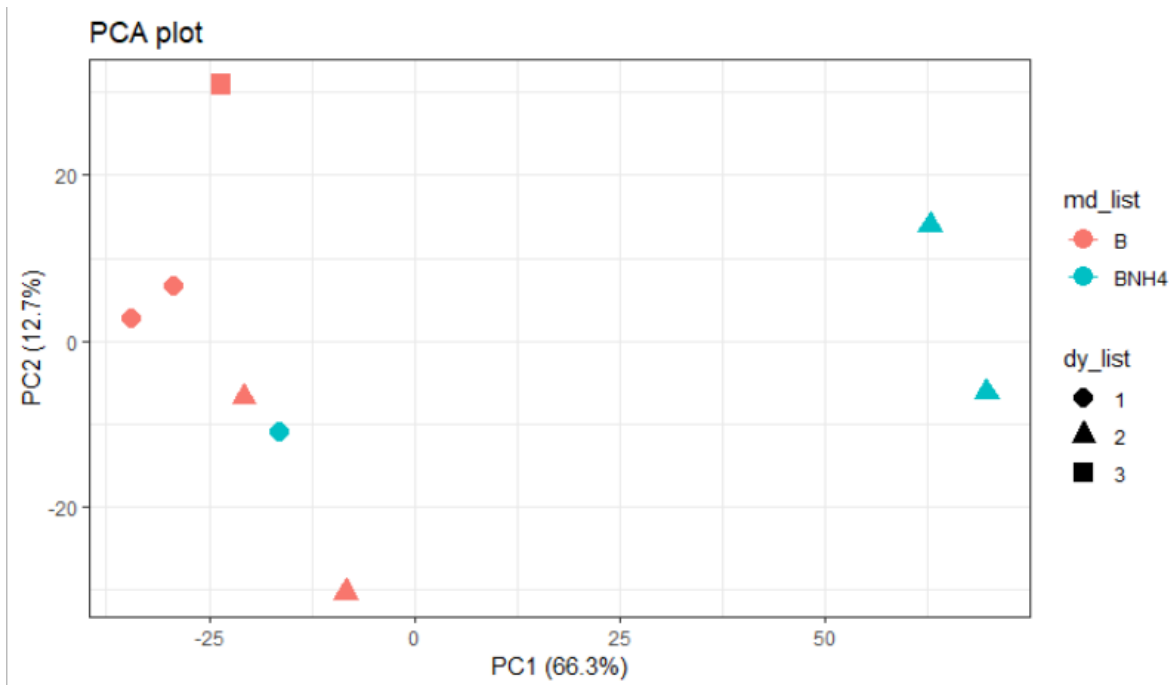


Fig.9 PCA, PC1 valor de 66.3% y PC2 valor de 12.7% de la varianza total. Podemos observar que los componentes se agrupan a en diferentes extremos del gráfico, además de tener un valor de más del 50% de varianza entre sí. el día 1 corresponde a la fase exponencial de crecimiento, días 2 y 3 Fase estacionaria.

7.2 Gráficas de Expresión Diferencial del sistema rsm.

La finalidad de este trabajo fue observar el comportamiento del sistema Rsm de *Azotobacter vineladii*, en 2 diferentes condiciones, medio mínimo Burk- sacarosa y otro medio Burk-sacarosa adicionado con sulfato de amonio 20 mM.

Como grupo control de datos, se tomaron los genes que codifican para la nitrogenasa (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*), ya que se ha demostrado experimentalmente que su expresión es reprimida cuando se tiene una fuente de nitrógeno disponible. Se observó la represión de los genes estructurales que codifican para la nitrogenasa; sin embargo, los genes reguladores *nifL* y *nifA* se expresan a niveles bajos. (Fig. 10).

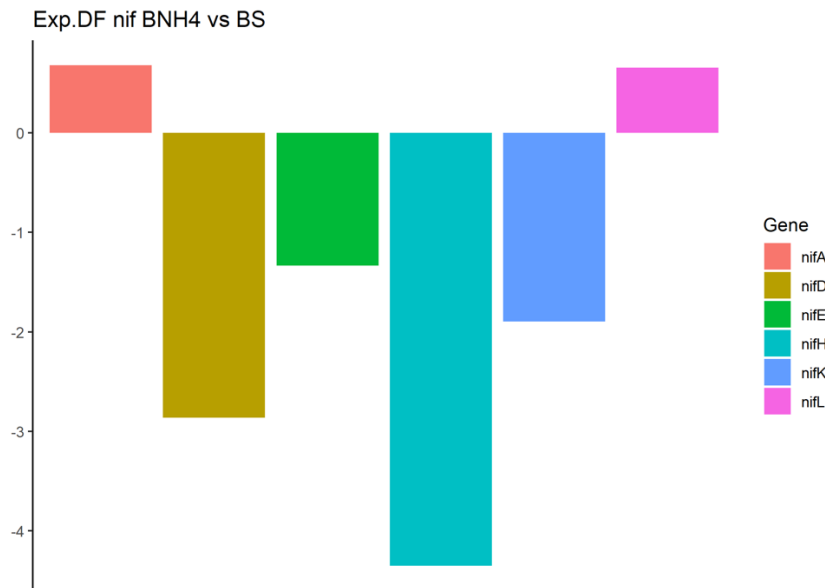


Fig.10 Expresión diferencial de los genes del grupo control encargados de la fijación de nitrógeno genes nif. Se observa que nifA y nifL están altamente expresados en cambio los demás tienen una muy baja expresión.

Se obtuvo la expresión diferencial de los genes relacionados con el sistema Rsm, los snc-RNA (RsmZ1-7 y RsmY) y el gen que codifica para la proteína RsmA. Podemos observar que el gen *rsmA* aumenta su expresión en presencia de amonio; así mismo, el snc-RNA RsmY, el cual se ha demostrado que codifica para un solo alelo (Lopez-Pliego et al 2019), pero en la anotación del genoma de referencia se mantiene como dos alelos separados que se expresan en la misma magnitud, *rsmY1* y *rsmY2*.

De los snc-RNA de la familia RsmZ, se muestra una expresión reprimida de manera general, ya que el alelo que muestra una ligera expresión, *rsmZ4*, posee valores por debajo del 1, los cuales no son significativos Fig. 11

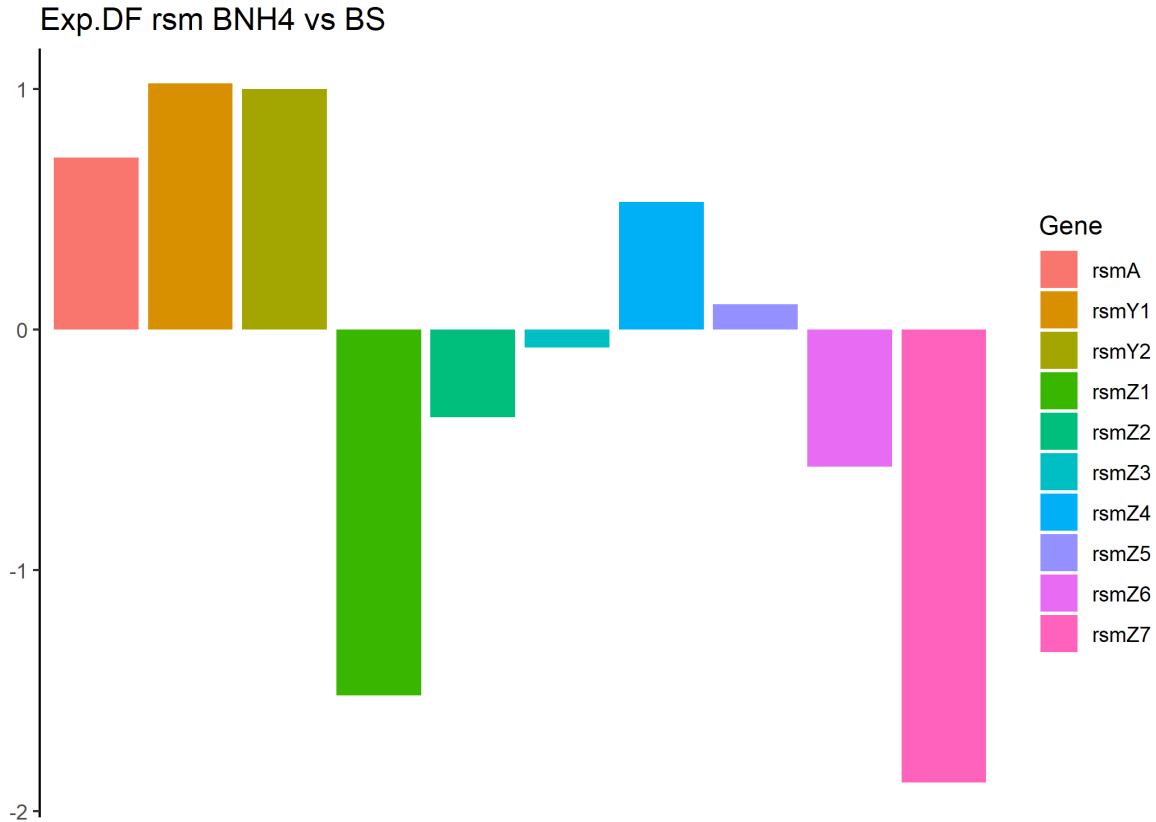


Fig.11 Grafico de expresión diferencial del sistema Rsm de *A. vinelandii*. El eje “y” representa el cambio en la expresión (valor log2FoldChange) observando una sobre expresión de *rsmA*, *rsmY1*, *rsmY2* y en menor medida para *rsmZ4* y *rsmZ5*.

7.3 Cuantificación de amonio de las cepas mutantes del gen *nifL* en *A. vinelandii* AEIV.

En antecedentes se mostró que se tenía una cepa mutante de *A. vinelandii* del gen *nifL* por interrupción con un cassette de gentamicina (Juarez; 2019), se decidió realizar la cuantificación de amonio que se tenía como perspectiva. Se realizó la medición de amonio en el sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria, con el método de Betherlot.

Se puede observar que tanto la cepa silvestre AEIV, como las cepas mutadas *nifL* polar y *nifL* no polar no presentan una diferencia significativa en cuanto a la producción de amonio (Fig.12).

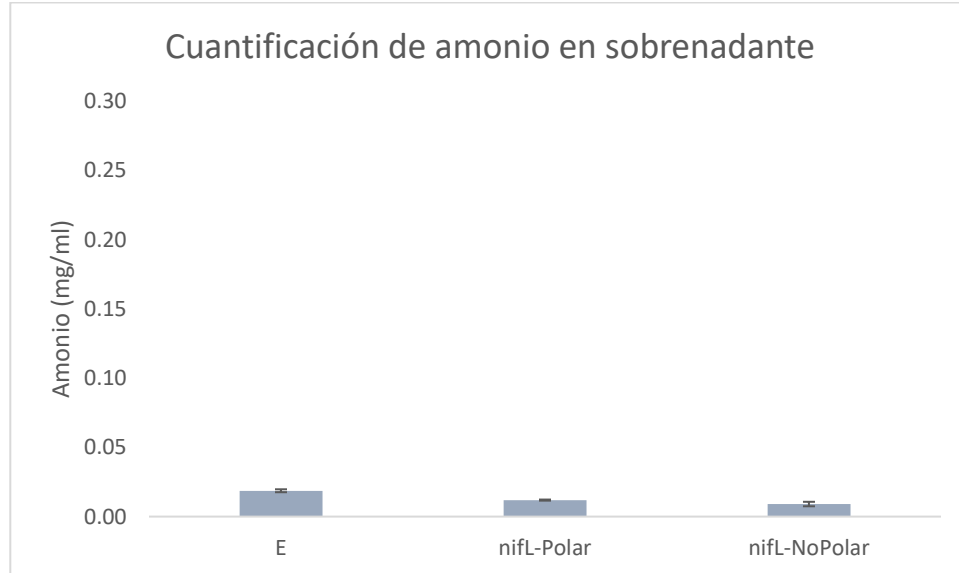


Fig.12 Grafico comparativo de la concentración de amonio de las tres cepas analizadas por triplicado cada una.

8.- Discusión de los resultados

Una vez obtenidos los datos de la expresión diferencial BS-NH₄ vs BS, partimos del grupo control utilizado, los genes que codifican para la nitrogenasa *nifHDK*, la expresión de estos genes está regulada negativamente en presencia de amonio. El resultado anterior, nos permitió tener confiabilidad en los resultados, debido a que a la expresión de los genes *nif* debe ser negativa en presencia de amonio, ya que no necesitaría más amonio si este se encuentra en el medio, por lo tanto, se pudo continuar con el análisis de los datos de interés, los elementos del sistema Rsm, y observar la expresión diferencial en presencia y ausencia de amonio

Una parte importante para analizar fue *rsmA* debido a que es una parte esencial del sistema Rsm ya que como sabemos el sistema Rsm es un sistema de regulación global, que puede promover, pero generalmente promueve la degradación de sus RNAm blanco (Morin *et. al.* 2017). Pudimos observar que la proteína RsmA se encuentra expresada en presencia de amonio en bacterias como *E. coli* donde regula ciertas vías del metabolismo del carbono (Morin *et. al.* 2017), aunque no se

conoce si ésta misma proteína en *A. vinelandii* regula genes relacionados con el cambio fisiológico que va de un estadio de fijación a uno de no fijación de nitrógeno. En la condición de fijación de nitrógeno, se ha visto que produce el metabolito secundario alginato, mientras que, en condiciones de no fijación de nitrógeno, no se produce, posiblemente por la participación de la proteína RsmA como regulador negativo y la ausencia de los sRNA Z1-Z7, promoviendo que la proteína ejerza su efecto represor sobre los genes blancos de regulación (soberano & Valverde, 2020).

Respecto a los RNAs del sistema Rsm, podemos observar que solamente el RNA regulador RsmY se encuentra expresado. En *Pseudomonas aeruginosa*, se conoce que adicionalmente al sistema de dos componentes GacS/A que promueve la expresión de los sRNAs del sistema, existe una vía alterna HptB, en donde una cinasa histidínica llamada SagS, puede fosforilar al elemento de fosfotransferencia HptB, que confluye en la expresión del sRNA RsmY (Petrova *et. al.* 2011; Francis *et. al.* 2019).

En *A. vinelandii*, Hernández-Campos (2019) describió la presencia de un homólogo de la HK SagS, la cual, esta codificada por el gen *Avin_15460* y al ser modificado, se observó una disminución en la producción de alginato. Posteriormente, Mondragón C. 2024, observó que la proteína SagS interactúa con HptB y que la producción de alginato se ve afectada por la ausencia de alguno de estos dos reguladores, lo que el efecto observado se deba a la promoción de la transcripción de RsmY por esta vía. Sin embargo, no se puede descartar que el sistema GacS/A, no se encuentre participando en esta condición, ya que no se ha estudiado experimentalmente.

Por otra parte, en *A. vinelandii* se han encontrado proteínas homólogas a las del sistema de multicomponente en *P. aeruginosa*; RetS es una proteína que participa en el control del estado de fosforilación de GacS y que además se ha visto que puede participar en una cascada de señalización alterna que activa a la proteína de fosfotransferencia HptB. Contrariamente a lo que sucede en *P. aeruginosa*, una mutación de la proteína RetS en *A. vinelandii* produce una disminución de la producción de alginatos y alquilresorcinolos, lo cual sugiere que la función de la

proteína es de un activador de la producción de los metabolitos secundarios bajo una condición particular de crecimiento, en medio mínimo en condiciones de fijación de nitrógeno. Bajo una condición de no fijación de nitrógeno, en donde se adiciona amonio, es notable que RetS se encuentra expresándose al mismo tiempo que RsmY (Fig. 13). Sin embargo, bajo esa condición fisiológica, la bacteria no produce los metabolitos secundarios alginatos y alquilresorcinoles, ya que los metabolitos se producen como consecuencia de su crecimiento en condiciones de fijación de nitrógeno, como un mecanismo de protección a la nitrogenasa principalmente y al mismo tiempo formando parte de la exina en la formación del quiste (Rosales *et al.* 2024).

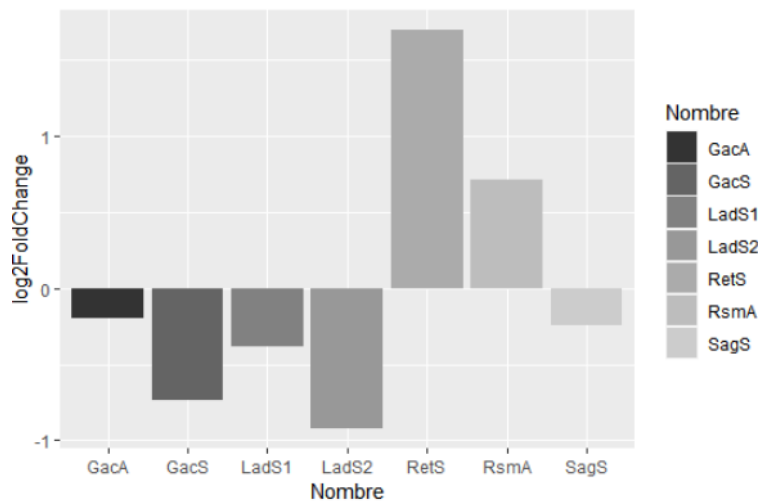


Fig.13 ,- Expresión diferencial de las cinasas en *A. vinelandii*, sobre expresión de la cinasa RetS (Derio, M. 2024).

Respecto a la cuantificación de amonio medida en la cepa silvestre E y las mutantes en el gen *nifL*, podemos notar que las mutantes generadas no producen amonio extracelular. Posiblemente pueda ser debido a que la mutación realizada se encuentra en un sitio diferente a la realizada por Barney *et al.* 2017.

9.- Conclusiones

Gracias a esta investigación logramos observar que Los sRNAs de la familia RsmZ se encuentran reprimidos en presencia de amonio 20 mM.

RsmY se expresa en presencia de amonio, así como el gen que codifica para la proteína RsmA.

Las mutaciones generadas por Juárez (2019) en el gen *nifL* no producen amonio de forma extracelular.

10.-Perspectivas

- Cuantificar la expresión de RsmY en condiciones en medio adicionado con amonio para comprobar que se encuentra expresado.
- Verificar si la expresión de RsmY en presencia de amonio es dependiente de GacA o de HptB.

11.- Material Suplementario

ID gene	Gene	log2FoldChange
Avin_04040 Avin_04050	rsmY2	0.99895607
Avin_65100	rsmY1	1.02158273
Avin_65010	rsmZ1	-1.51978417
Avin_65020	rsmZ2	-0.36510791
Avin_65030	rsmZ3	-0.07374101
Avin_65110	rsmZ4	0.53057554
Avin_08930 Avin_08950	rsmZ5	0.10431655
Avin_65040	rsmZ6	-0.57014388
Avin_65050	rsmZ7	-1.88129496
Avin_34440	rsmA	0.71368128

Tabla 1.- Valores de cambio del sistema rsm Expresión diferencial

ID	Nombre	log2FoldChange
Avin_01380	nifH	-4.3503858
Avin_01390	nifD	-2.86357753
Avin_01400	nifK	-1.89438751
Avin_01450	nifE	-1.33537742
Avin_50990	nifL	0.65521178
Avin_51000	nifA	0.67849557

Tabla2.- valores de cambio de los genes de nitrogenasa

valores	Concentración (g/ml)	Absorbancia
0	0	0.009
1	0.02	0.086
2	0.04	0.179
3	0.08	0.354
4	0.16	0.567
5	0.2	0.727
6	0.3	1.034
7	0.4	1.588

Tabla 3.- Datos de obtenidos de absorbancia curva de calibración

Muestra	ABS	Concentración (g/ml)	
E1	0.342	0.089410188	
E2	0.379	0.099329759	
E3	0.349	0.091286863	
NLP1	0.237	0.061260054	
NLP2	0.223	0.057506702	
NLP2	0.233	0.060187668	
NLNP1	0.15	0.037935657	
NLNP2	0.173	0.044101877	
NLNP3	0.21	0.054021448	

Tabla 4.- Datos Muestras cepa E y mutantes junto con su cálculo de concentración

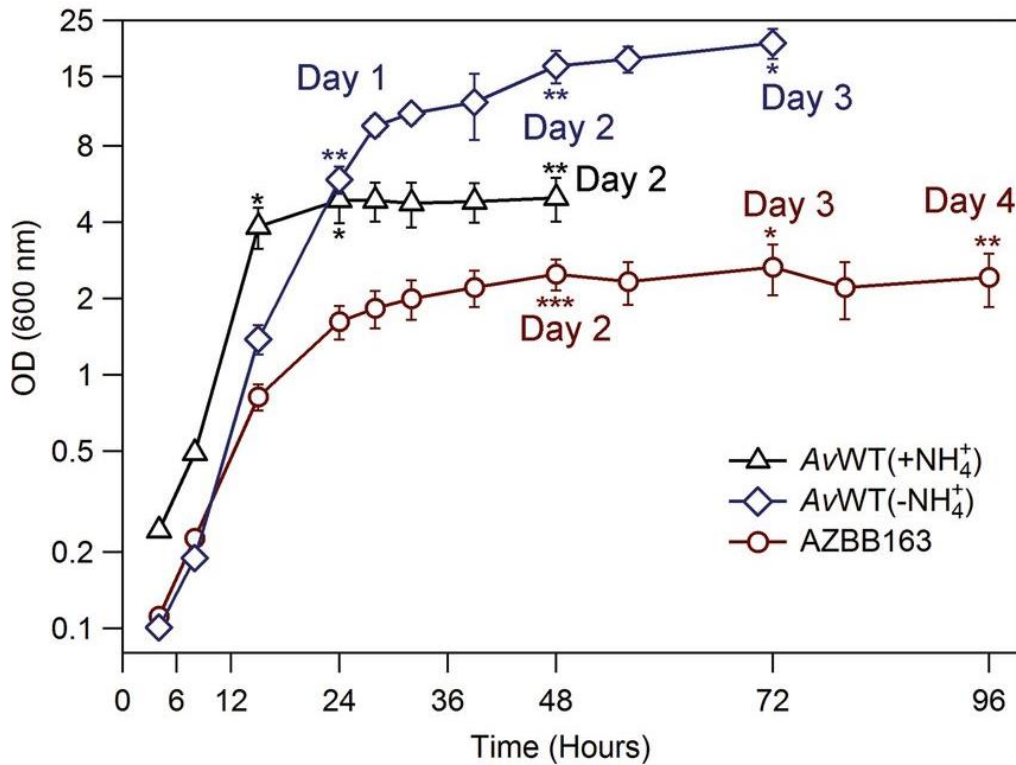


Fig. 1.- Etapas de crecimiento de las muestras WT y AZBB163 .

12.- Bibliografía

Álvarez, A. F., & Georgellis, D. (2016). Características y funcionamiento de los Sistemas de Dos Componentes de organismos procariontes y eucariotas. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México Revista Química Viva - Número 3, año 15, diciembre 2016

Appleby, J. L., Parkinson, J. S., & Bourret, R. B. (1996). Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay: Not Necessarily a Road Less Traveled. *Cell*, 86(6), 845–848. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80158-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80158-0)

Barney BM, Plunkett MH, Natarajan V, Mus F, Knutson CM, Peters JW. Transcriptional Analysis of an Ammonium-Excreting Strain of *Azotobacter vinelandii* Dereglated for Nitrogen Fixation. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Sep 29;83(20):e01534-17. doi: 10.1128/AEM.01534-17. PMID: 28802272; PMCID: PMC5626987.

Bali, A; Blanco, G; Hill, S; Kennedy, C. (1992). Excretion of Ammonium by a *nifL* Mutant of *Azotobacter vinelandii* Fixing Nitrogen. *Applied And Environmental Microbiology*, 58(5), 1711-1718

Bullard, j; Purdom, E; Hansen, K y Dudoit, S. (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differentail expresión in mRANA-Seq experiments. *BMC bioinforamtics*, 11 (94), 1-13.

Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2624–2628. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762268>

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*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6787–6793. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001>

Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, Fadel F, Filloux A, Sivaneson M, de Bentzmann S, Bordi C. El híbrido histidina quinasa LadS forma un sistema de transducción de señales multicomponente con el sistema de dos componentes GacS/GacA en *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*. 13 de mayo de 2016; 12(5):E1006032. doi: 10.1371/journal.pgen.1006032.

Cheng, Q. (2008). Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *Journal Of Integrative Plant Biology*, 50(7), 786-798.

CL, M., M, R., SL, K., T, C., S, H., & KP, L. (2016). RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-016-0771-Y>

Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., & Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *Journal of Bacteriology*, 177(17), 5108–5115. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5108-5115.1995>

Dixon RA, Postgate JR. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature*. 1972 May 12;237(5350):102-3. doi: 10.1038/237102a0. PMID: 4555442.

Dixon R, Kahn D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Review Microbiology*, 2(8):621–631.

Esquerré, T., Bouvier, M., Turlan, C. *et. al.* El sistema Csr regula la estabilidad y transcripción del ARNm en todo el genoma y, por lo tanto, la expresión génica en *Escherichia coli*. *Sci Rep* 6, 25057 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep25057>

Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C., & Galindo, E. (2013). Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(2), 85–91. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.04.010

Francis, V. I., Waters, E. M., Finton-James, S. E., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A. R., & Porter, S. L. (2018). Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04640-8>

Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>

Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63, 133–154. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>

Hamilton, T., Ludwig, M., Dixon, R., Boyd, E., Dos Santos, P., & Setubal, J. et. al. (2011). Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal Of Bacteriology*, 193(17), 4477-4486.

Haas, D. & Defago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 3:307–319. doi:10.1038/nrmicro1129.

Huihui Song, Yuying Li, Yan Wang, Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors, *Engineering Microbiology*, Volume 3, Issue 1, 2023, 100051, ISSN 2667-3703, <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100051>.

Hernández-Eligio et. al. (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*. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 492–498.

Howard, J. & Rees, D. (1996). Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chemical Reviews*, 96(7), 2965-2982.

Hrabak, E. M., & Willis, D. K. (1992). The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two component regulators. *Journal of Bacteriology*, 174(9), 3011–3020.

<https://doi.org/10.1128/jb.174.9.3011-3020.1992>

Jung, K., Fried, L., Behr, S., & Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology*. 88
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>

Kogenaru,S; Yan,Q; Guo,Y; y Wang, N. (2012). RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC genomics*, 13 (629). 1-16

Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012, 9:357-359.

Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T., & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241–253.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x>

Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G., & Haas, D. (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1562–1566.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1562>

Liang, S; Wang, B; Pan, L; Ye, Y; He, M; Wang, X y Lin, Y. (2012). Comprehensive structural annotation of *pichia pastoris* transcriptome and the response to various

carbon sources using Deep paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics*, 12 (738), 1-14.

Liao Y, Smyth GK and Shi W (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923-30.

López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E.A. et. al. Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Biotechnol* 60, 670–680 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>

López-Pliego, L., Mena-Muñoz, G., Terán-Melo, J.L. et. al. Study of the sRNA RsmY involved in the genetic regulation of the synthesis of alginate and alkyl resorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Arch Microbiol* 202, 579–589 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01769-y>

Liliana López-Pliego, Verónica González-Acocal, Diana Laura García-González, Jimena Itzel Reyes-Nicolau, Zaira Sánchez-Cuapio, Alan Shared Meneses-Carbajal, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, Miguel Castañeda, HrgS (Avin_34990), a novel histidine-kinase related to GacS, regulates alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 369, Issue 1, 2022, fnac024, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac024>

Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550 (2014). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Noar JD, Bruno-Bárcena JM. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology (Reading)*. 2018 Apr;164(4):421-436. doi: 10.1099/mic.0.000643. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29533747.

Moser, C., Jensen, P. Ø., Thomsen, K., Kolpen, M., Rybtke, M., Lauland, A. S., Trøstrup, H., & Tolker-Nielsen, T. (2021). Immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Frontiers in immunology*, 12, 625597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625597>

Muhammadi, & Ahmed, N. (2007). Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Current genomics*, 8(3), 191–202. <https://doi.org/10.2174/138920207780833810>

Muñoz-Bonilla A, Echeverría C, Sonseca Á, Arrieta MP, Fernández-García M. *Materiales poliméricos: superficies, interfaces y bioaplicaciones*. *Materiales (Basilea)*. 22 de abril de 2019; 12(8):1312. DOI: 10.3390/MA12081312.

Narula, N. (2000). *Azotobacter in sustainable agriculture*, CBS publishers

Romero et. al. (1998). “Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB” *Molecular Microbiology* 29(6):1321–1330.

Romero Y, Guzmán J, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Vences-Guzmán MÁ, Castañeda M, et. al. (2016) The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE* 11(4): e0153266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153266>

Plunkett, M.H., Knutson, C.M. & Barney, B.M. Key factors affecting ammonium production by an *Azotobacter vinelandii* strain deregulated for biological nitrogen fixation. *Microb Cell Fact* 19, 107 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01362-9>

R, D., & M, I. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(1). [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01503-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01503-0)

Ribbe, M. (2011). *Nitrogen Fixation*. Totowa, NJ: Springer Science+Business Media, LLC.

Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M.A., Castañeda, M.et. al. (2016) The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE* 11(4): e0153266. doi:10.1371/journal.pone.0153266

Rosales-Cruz A, Reyes-Nicolau J, Minto-González E, Meneses-Carbajal A, Mondragón-Albarrán C, López-Pliego L, Castañeda M. A Homolog of the Histidine Kinase RetS Controls the Synthesis of Alginates, PHB, Alkylresorcinols, and Motility in *Azotobacter vinelandii*. *Curr Microbiol.* 2024 Aug 17;81(10):311. doi: 10.1007/s00284-024-03835-1. PMID: 39153035; PMCID: PMC11330419.

Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov 1;2(11):a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427. PMID: 23125205; PMCID: PMC3543102.

Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516–539.

Suaza-García, E. R., & Coy-Barrera, E. (2014). Alquilresorcinoles: Compuestos Naturales con Importancia Biológica. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 10(2), 210–222. <https://doi.org/10.18359/rfcb.332>

Sobrero PM, Valverde C. Genómica comparativa y análisis evolutivo de proteínas de unión al ARN de la familia CsrA en el género *Pseudomonas*. *Frente Mol Biosci.* 10 de julio de 2020;7:127. doi: 10.3389/fmolb.2020.00127. PMID: 32754614; PMCID: PMC7366521.

Skerker JM, Perchuk BS, Siryaporn A, Lubin EA, Ashenberg O, Goulian M, et. al. (2008) Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* 133: 1043–1054 DOI: 10.1016/j.cell.2008.04.040.

S, M., DJ, S., P, S., CR, M., SW, C., & MJ, F. (2010). Construction of an rsmX covariance model and identification of five rsmX non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *RNA Biology*, 7(5).

Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 79(2), 193–224.

Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., & Haas, D. (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1361–1379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x>

Valverde, C., Lindell, M., Wagner, E. G. H., & Haas, D. (2004). A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25066–25074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401870200>

Wolanin, P. M., Thomason, P. A., & Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013>