



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---



INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

“ESTUDIO DEL SISTEMA RSM EN  
*AZOTOBACTER VINELANDII*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**M.C. LILIANA LÓPEZ PLIEGO**

**ASESOR DE TESIS:**

**D. C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO**

PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE, 2018

# Agradecimientos

## ❖ INSTITUCIONALES

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme permitido crecer profesionalmente.
- Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas y a la Coordinación del Posgrado en Microbiología por haberme dado la oportunidad de realizar el doctorado y por el apoyo por todos los que gestionan el posgrado que siempre estuvieron disponibles cuando los necesité.
- Al Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, por darme la oportunidad de formarme dentro de este espacio.
- A la Vicerrectoría de Investigación y estudios de posgrado, por el apoyo otorgado para poder presentar el trabajo realizado en distintos congresos internacionales llevados a cabo durante el doctorado
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo de la tesis presentada con número de becario 261240.

## ❖ ACADÉMICOS

- A mi asesor de tesis, Migue gracias por ser una guía durante este proyecto, por enseñarme a hacer ciencia a pesar de las condiciones en este país y aún a pesar de mis condiciones personales. Gracias por creer siempre en mí y apoyarme siempre que lo he necesitado, eres un gran investigador y una persona a la que admiro mucho.
- A las Dras. Guadalupe Espín y Cinthia Nuñez, por haber participado activamente en la realización de este proyecto y haber aportado su experiencia en el tema con el fin de darle forma al proyecto.
- A Luis y Jesús e Ygnacio por su participación durante la realización de este proyecto como comité tutorial, siempre estuvieron abiertos a la discusión de los resultados. Y gracias por dejar que los torturara un poco cada vez que realizaba la presentación.
- A D.C. Miguel Cocotl Yañez que, a pesar de no haber estado desde el principio en la realización del proyecto, tus aportaciones en la revisión de tesis me han servido muchísimo.

# A mi familia y amigos

A mi familia:

Gracias a Damian y a Axel por apoyarme todo el tiempo, durante la realización de este proyecto. No puedo decir otra cosa más que sin su apoyo no lo habría logrado. Damian, gracias por apoyarme constantemente, por creer en mí y por darme la libertad de dedicarme a lo que cualquier otra persona diría que no tiene sentido y que para mí es mi vocación.

A mi madre:

Gracias por enseñarme a sobreponerme a pesar de los momentos malos y a disfrutar de la vida cuando esta nos lo permite. Siempre he dicho que eres una fortaleza, gracias por estar a mi lado.

A mis hermanas:

Realmente son una parte fundamental en mi vida, gracias a Sony y a Yina por todo el amor que siempre me han demostrado. Nunca olvidaré todas las veces que cuidaron a mi niño hermoso para que pudiera ir a terminar mis experimentos. O la vez que Axel paso todo el verano en tu casa para que pudiera preparar los resultados de mi presentación de seminario. Dios me ha premiado en esta vida por tenerlas a ustedes dos a mi lado.

A mis compañeros de laboratorio:

He tenido la oportunidad de convivir con distintas generaciones del laboratorio de Genética molecular microbiana y me gustaría decir que con cada generación he vivido momentos inigualables que siempre van a estar en mi mente y en mi corazón, pero todas las generaciones en las que he estado a lo largo de los años en este laboratorio tienen un denominador común: compañerismo, entusiasmo, capacidad y talento. De todas las generaciones con las que he compartido en el laboratorio, siempre hay algo que me enseña, me motiva y les agradezco infinitamente el haber coincidido conmigo en este espacio.

A mis contemporáneos en el Doctorado:

Ustedes bien saben lo que es cursar un Doctorado en una institución de provincia, todos hemos tenido que trabajar muchísimo para poder lograr el grado y agradezco muchísimo a todos aquellos que han compartido el proceso desde la preparación de los seminarios hasta

tener que preparar el manuscrito y la resolución de los revisores del artículo. También quiero mencionar a las personas que de alguna manera han contribuido a analizar desde diferentes puntos de vista el trabajo experimental y aquellos que me han ayudado con mi locura de querer adentrarme al mundo de la bioinformática.

# ABSTRACT

In *A. vinelandii* the GacS/A system controls the alginate and alkylresorcinols production through the Rsm system. The RsmA protein represses the *algD* and *arpR* mRNA expression. These genes are key factors in alginate and alkylresorcinols production. RsmZ1 is a small RNA (sRNA) that acts releasing the RsmA repression. In *Pseudomonadaceae* the sRNAs of Rsm family are grouped in three families, RsmX, RsmY and RsmZ. Besides RsmZ1, in *A. vinelandii* seven sRNAs of the RsmZ exist and one of the RsmY family. However, until now the signals or conditions regulating the expression of the sRNAs in mucoid strains have not been described.

In this study the Rsm sRNAs expression kinetics was studied, finding that RsmZ family reaches their maximal expression at 48 hours of growth, while RsmY has its maximal expression at 24 hours. In addition, the effect of the carbon source in the growth media over the sRNAs expression was measured. Two types of carbon sources were used in this study, the glycolytic and the gluconeogenic, (glucose, fructose and succinate respectively). The results show that the addition of fructose and succinate increases the sRNAs expression. The alginate and alkylresorcinols production were measured in single sRNAs *rsmZ1-Z7* and *Y* mutants with the aim to establish a possible relation between the sRNAs expression and the alginate and alkylresorcinols production. The results suggest the existence of additional elements involved in the sRNAs regulation and the alginate and ARs production.

Besides, the effect in the sRNAs expression comparing diazotrophic and no diazotrophic growth conditions was determined. The expression of the sRNAs was repressed by the addition of ammonia to the growth media. These findings suggest either that ammonia may be a repressor signal regulating the *rsmZ1-Z7* and *rsmY* expression or that the change in the bacterial physiology promotes the sRNAs repression in an independent way.

Bioinformatic sRNAs searching results show two *rsmY* alleles in *A. vinelandii* genome, *rsmY1* and *rsmY2*. However, in the genomic context one gene lays beside the other separated only by 89 pb and the absence of the GacA binding site in the *rsmY2* allele suggests the existence of a large transcriptional unit. Previous studies demonstrated the large transcriptional unit (named *rsmY*). However, the presence of the Rho independent terminators between *rsmY1* and *rsmY2* suggest the existence of two sRNAs, one large including *rsmY1* and *rsmY2* and one short only including the *rsmY1* gene. In order to study the functionality of this two transcriptional units, a genetical analysis was made. Through complementation genetic assays the functionality of the large transcriptional unit and the control of the *algD* gene post-transcriptionally was demonstrated.

Finally, the regulation of the *algD* mRNA was studied in RsmA mutants and the results suggest transcriptional and post-transcriptional regulation. furthermore, the *rsmA* gene was essential in alginate producer strains.

# RESUMEN

En *Azotobacter vinelandii* el sistema GacS/A controla la producción de alginato y alquilresorcinoles a través del sistema Rsm; en este sistema la proteína RsmA actúa como represor de la expresión de los RNA mensajeros de los genes *algD* y *arpR* que son claves en la producción de alginato y alquilresorcinoles. RmZ1, es un RNA pequeño no codificante que actúa liberando la represión ejercida por RsmA. En las *Pseudomonadaceas* los RNAs pequeños (sRNAs) de la familia Rsm se han agrupado en tres familias RsmX, RsmY y RsmZ. Además de RsmZ1, en *A. vinelandii* existen siete RNAs de la familia RsmZ y uno de la familia RsmY; sin embargo, no se han descrito las señales o condiciones que regulan la expresión de estos sRNAs en la cepa E de *A. vinelandii*.

En el presente trabajo se estudió la cinética de expresión de los sRNAs del sistema Rsm encontrando que los pertenecientes a la familia RsmZ alcanzan su máxima expresión a las 48 horas mientras que RsmY tiene un máximo de expresión a las 24 horas. Así mismo, se midió el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la expresión de los sRNAs, en este estudio se usaron dos fuentes de carbono glucolíticas (glucosa y fructosa) y una fuente de carbono gluconeogénica, (succinato). Los resultados obtenidos demuestran que el medio con fructosa y succinato favorecen la expresión de los sRNAs. Se midió la producción de alginato y alquilresorcinoles (ARs) en las mutantes individuales de cada uno de los genes que codifican para los sRNAs RsmZ1-7 y RsmY con el objetivo de establecer una posible relación entre la expresión de los sRNAs y la producción de alginato y ARs. Los resultados obtenidos demuestran que no existe una correlación directa entre la expresión presentada en las distintas fuentes de carbono evaluadas con la producción de alginato y ARs, sugiriendo la existencia de elementos adicionales involucrados en la regulación que establecen los sRNAs en la producción de estos metabolitos.

Se determinó el efecto que tiene el crecimiento en condiciones diazotróficas en comparación con condiciones no diazotróficas en la expresión de los sRNAs, encontrándose que la adición de amonio al medio tiene un efecto represor de todos los sRNAs, lo cual sugiere que el amonio puede ser una molécula señal del sistema o bien, un elemento que promueve un cambio en la fisiología del microorganismo que desencadena la represión de los pequeños RNAs de manera indirecta.

En la búsqueda bioinformática de sRNAs en el genoma de *A. vinelandii* los resultados arrojaron la presencia de dos alelos de la familia RsmY nombrados RsmY1 y RsmY2; sin embargo, en el contexto genómico se presentan uno seguido del otro y la ausencia del sitio de unión al activador GacA en el alelo *rsmY2* sugiere la presencia de una unidad transcripcional larga de 330 ribobases (rb). En estudios previos la unidad transcripcional larga fue demostrada; sin embargo, la presencia de terminador independiente de la proteína Rho entre el gen *rsmY1* y *rsmY2* sugiere la existencia de dos RNAs, uno largo que incluye los genes *rsmY1*- *rsmY2* y uno corto incluyendo únicamente al gen *rsmY1*. Para estudiar la funcionalidad de esta unidad transcripcional, un estudio genético fue realizado. A través de ensayos de complementación genética la funcionalidad de la unidad transcripcional larga y el efecto sobre el RNAm de *algD* a nivel post-transcripcional fue demostrado.

Finalmente, la regulación del RNA mensajero del gen *algD* fue estudiada en mutantes RsmA y los resultados obtenidos sugieren la regulación a dos niveles, transcripcional y post-transcripcional. Además, se demostró que el gen *rsmA* es esencial en cepas de *A. vinelandii* productoras de alginato.



## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	11
Pequeños RNAs reguladores bacterianos.....	11
Familia de sRNAs CsrB/Rsm .....	13
Clasificación de los sRNAs del sistema Rsm.....	15
La estabilidad de los sRNAs del sistema Csr/Rsm está altamente controlada .....	16
Familia de proteínas reguladoras CsrA/RsmA .....	16
El sistema Csr/Rsm es activado a través del sistema de dos componentes GacS/GacA y su homólogo BarA/UvrY .....	20
ANTECEDENTES GENERALES .....	21
Características generales de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	21
Regulación de la producción de metabolitos secundarios: sistema de dos componentes GacS/A- Rsm en <i>A. vinelandii</i> .....	22
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	23
JUSTIFICACIÓN .....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
Objetivo General.....	28
Objetivos particulares:.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
Procedimientos de manejo de ácidos nucleicos.....	29
Construcción de las fusiones transcripcionales <i>ErsmZ1-7</i> y <i>ErsmY</i> .....	29
Construcción de la fusión transcripcional <i>EgyrAT</i> .....	29
Mutantes generadas en la cepa E de <i>A. vinelandii</i> .....	30
Mutaciones del sRNA <i>rsmY</i> .....	30
Complementación de las mutantes <i>EY1</i> y <i>EY1Y2</i> .....	30
Generación de mutantes <i>rsmA</i> .....	30
Métodos analíticos.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm.....	33
Evaluación de la expresión de los sRNAs <i>rsmZ1-7</i> en diferentes fuentes de carbono....	35
Efecto de la mutación de los sRNAs <i>rsmZ1-7</i> sobre la producción de alginato .....	38
Efecto de los sRNAs <i>RsmZ1-7</i> en la producción de alquilresorcinoles .....	40

Discusión .....	41
Caracterización funcional del gen <i>rsmY</i> .....	44
Discusión .....	48
La mutación del gen <i>rsmA</i> afecta la expresión del gen <i>algD</i> a nivel transcripcional y post-transcripcional en cepas de <i>A. vinelandii</i> no productoras de alginato con actividad parcial de la proteína GDP-manosa deshidrogenasa.....	50
Discusión .....	53
Anexos.....	56
Anexo I. Cepas utilizadas en este estudio.....	56
Anexo II. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	62

Anexo III. ARTICULO:

**López-Pliego, L.,** García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E.A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., Núñez, C., Castañeda, M. Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. (2018). Mol Biotechnol 60: 670-680.

<https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>

# INTRODUCCIÓN

El RNA es una molécula con diversas funciones dentro de la célula. Las primeras funciones que se reconocieron fueron la de reservorio de información y la biocatalítica; la primera tiene como objetivo servir como un intermediario de la expresión genética, mientras que la segunda se ha descrito en el funcionamiento del ribosoma, pero también en las ribozimas y en las RNPzimas (proteínas dependientes de RNA para su catálisis) como la telomerasa, entre otras. Una de las funciones del RNA reconocida en los últimos años, es la regulación de la expresión genética a través de RNAs no codificantes para proteínas (Tomizawa et. al. 1981), con mecanismos tan simples que van desde los RNAs antisentido, cuya función se establece a través del apareamiento de bases hasta la interacción de RNAs con proteínas por imitación de estructuras encontradas en otros ácidos nucleicos (Gottesman et. al. 2011).

En organismos eucariotas diversos RNAs regulan la expresión genética; pequeños RNAs de doble cadena como los RNAs de interferencia y micro RNAs regulan la estabilidad y traducibilidad del RNA mensajero, los RNAs de interferencia también pueden estar involucrados la regulación de la estructura de la cromatina manteniéndola altamente condensada. Finalmente, los RNAs no codificantes largos, que comúnmente actúan de manera local donde son sintetizados o también llamados en “cis”, pueden apagar la expresión atrayendo proteínas que modifican la estructura de la cromatina. El efecto puede extenderse a todo un cromosoma como es el caso de Xist RNA que condensa uno de los dos cromosomas X en mamíferos hembras (Volpe et. al. 2011).

Así mismo diversos virus transcriben RNAs no codificantes que son utilizados como armas de evasión que burlan las defensas del hospedero o manipulan la maquinaria celular para sus propios propósitos. Las bacterias han evolucionado para contender contra los efectos de los virus que son capaces de infectarlas a través de un sistema llamado CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat); donde la información del genoma invadido es almacenada en forma de DNA, pero es convertida posteriormente en RNAs pequeños guías que reconocen e interfieren a invasores subsecuentes (Jore et. al. 2011).

## Pequeños RNAs reguladores bacterianos

Los pequeños RNAs reguladores bacterianos son moléculas de RNA no codificantes que tienen una longitud que va de 50 a 500 nucleótidos y se han dividido en RNAs antisentido y RNAs pequeños llamados sRNAs. Los primeros pueden estar codificados en *cis* (Fig. 1), ya que son transcritos en sentido opuesto a los genes que regulan compartiendo así una gran identidad con sus genes blanco de regulación. Sin embargo, también existen RNAs que presentan una complementariedad limitada respecto a los genes que regulan, puesto que estos, son transcritos en una localización diferente a la región codificante del RNA mensajero blanco. A estos RNAs se les ha denominado RNAs de interferencia codificados en *trans* (Brantl 2002; Storz et. al. 2011).

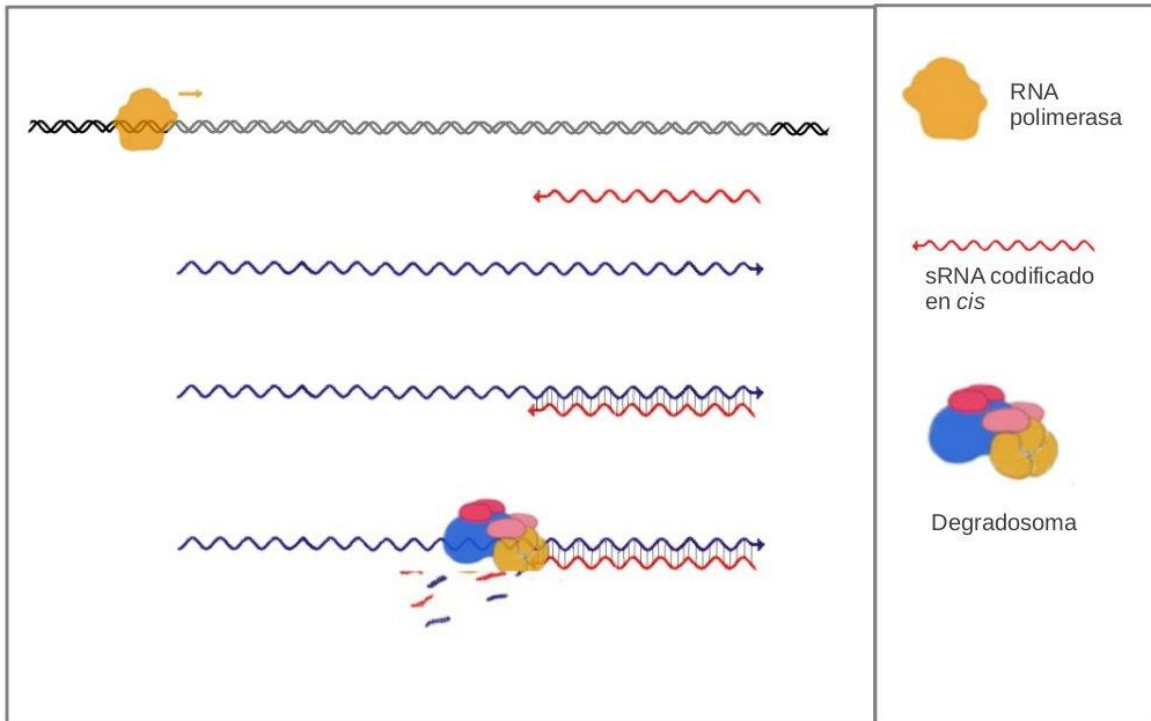


Fig. 1.- Los RNAs antisentido codificados en *cis* son transcritos a partir de la hebra complementaria del gen que codifica para el RNA mensajero blanco de regulación que es degradado por un complejo proteico denominado degradosoma.

La función que desempeñan estas moléculas de RNA puede llegar a tener diferentes resultados, por lo general estos RNAs se aparean en el sitio de unión al ribosoma lo que da como resultado el bloqueo de la traducción como en el caso del sRNA RybB de *Salmonella* que se aparea con el RNA mensajero de *ompN* (Bouvier et. al. 2008). RybB puede bloquear su traducción incluso cuando su región de apareamiento está alejada del sitio de unión al ribosoma. Otra de las funciones descrita es promover la traducción de sus genes blanco a través de mecanismos que en la mayoría de los casos se establecen previniendo la formación de estructuras de apareamiento (como son las estructuras de tipo horquilla) que impiden el acceso al sitio de unión al ribosoma (Morfeldt et. al 1995; Majdalani et. al 2005; Prévost et. al. 2007).

Aunque los RNAs de interferencia bacterianos codificados en *trans* tienen la capacidad de interactuar con su RNAm blanco y ejercer su actividad de regulación, generalmente su capacidad de apareamiento es limitada y se ha observado la necesidad de una proteína chaperona de RNA llamada Hfq que facilita el apareamiento (Fig. 2). Hfq está relacionada con proteínas de la familia Sm/Lm involucradas en el decaimiento de RNAm y el procesamiento de corte y empalme (*splicing*) en organismos eucariotas. Hfq tiene la capacidad *in vitro* de unirse tanto al RNA de interferencia como a RNAs mensajeros y estimular su apareamiento (revisado en Brennan y Link 2007).

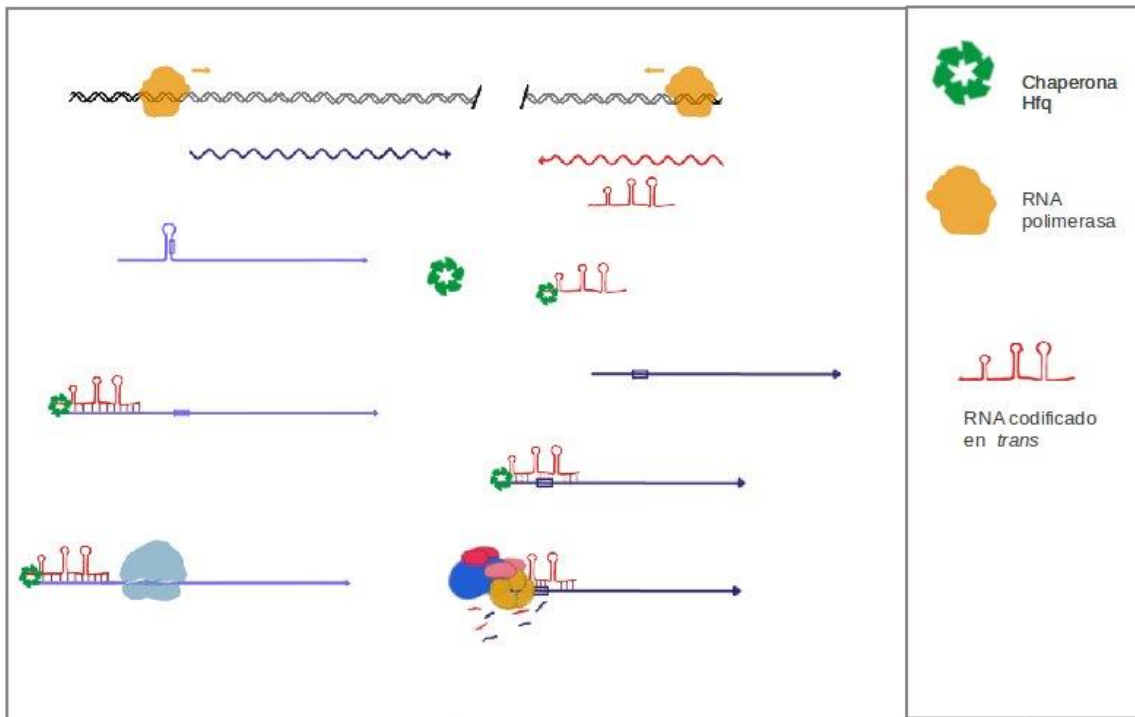


Fig. 2.- Los sRNAs codificados en *trans* son transcritos en una región del genoma diferente al RNA mensajero que regulan. El sRNA se une a la proteína Hfq y puede regular de forma positiva (izquierda) promoviendo la traducción del RNAm blanco de regulación, evitando que se formen estructuras secundarias intrínsecas del blanco de regulación. En el caso de una regulación negativa (derecha), el sRNA se une a la proteína Hfq promoviendo la unión del sRNA con la secuencia Shine Dalgarno (SD) impidiendo el inicio de la traducción y promoviendo la degradación del RNAm blanco.

Por otra parte, existen sRNAs bacterianos que tienen la capacidad de interactuar con proteínas modificando sus actividades por mimetismo, compitiendo con el DNA o RNA blanco de regulación. En bacterias, dos familias de sRNAs que pueden mimetizar otros ácidos nucleicos han sido caracterizadas ampliamente, la primera es ejemplificada con el RNA 6S de *Escherichia coli*, que mimetiza al complejo abierto en un promotor del DNA e interactúa con la RNA polimerasa (Wassarman & Storz 2000), mientras que en el segundo caso los sRNAs regulan la función de proteínas, por ejemplo, la familia de proteínas CsrA/RsmA, (Lui et. al. 1997; BouverLapouge et. al. 2008).

## Familia de sRNAs CsrB/Rsm

La familia de sRNAs Csr/Rsm es una familia conservada entre las Gamma proteobacterias que controla la actividad de la proteína CsrA/RsmA titulándola y permitiendo una liberación de la represión ejercida sobre los RNA mensajeros blancos de regulación del sistema (Fig. 3) (Lui et. al 1995; Liu & Romeo 1997; Romeo 1998; Schubert et. al. 2007). El sistema Csr (por sus siglas en inglés: “carbon storage regulator”) hasta ahora, el modelo de regulación más estudiado es el de *E. coli* bacteria en la que funciona como un regulador del metabolismo carbonado, la producción de biopelícula, virulencia y movilidad (Suzuki et. al.

2002). El principal antagonista de la proteína CsrA es el sRNA CsrB (Chao & Vogel 2010; Weilbacher et. al. 2003), que cuando es mutado, presenta efectos sobre los genes blanco de la proteína CsrA observándose fenotipos pleiotrópicos. Adicionalmente, *E. coli* produce otros sRNAs capaces de controlar la actividad de CsrA, llamados CsrC y McaS los cuales son capaces de interactuar *in vitro* con la proteína CsrA además de compensar los efectos de la eliminación de CsrB cuando son sobre expresados (Weilbacher et. al. 2003, Suzuki et. al 2002).

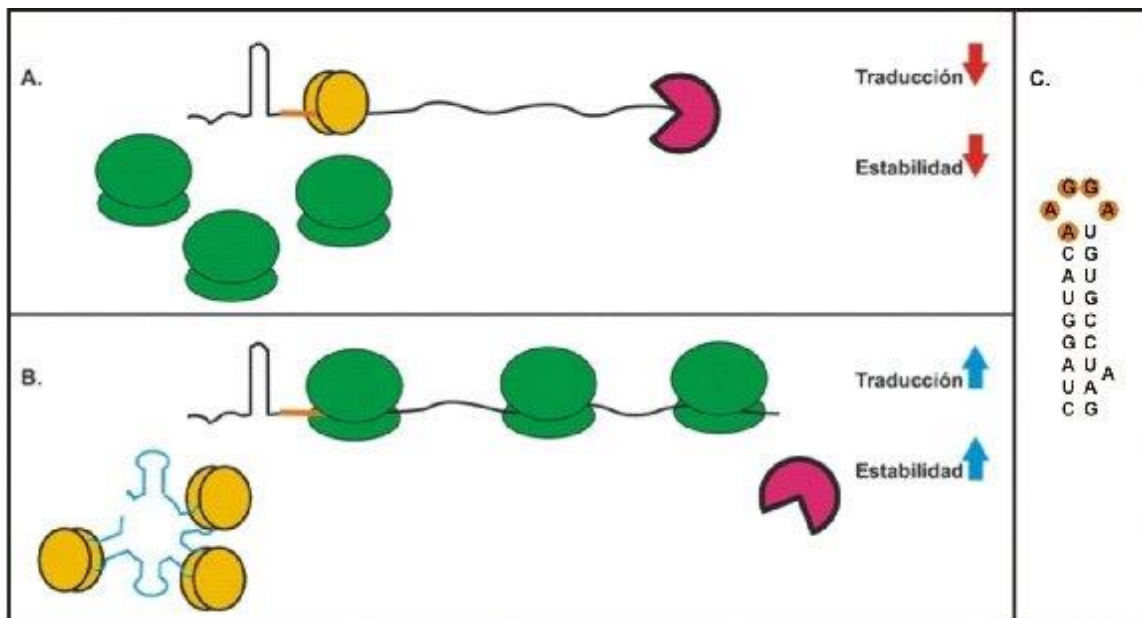


Fig. 3.- La familia de sRNAs Csr/ Rsm tienen la función de titular al represor CsrA/RsmA que promueve la degradación de los RNAm blancos de regulación. La inhibición mediada por el homodímero de CsrA/RsmA (amarillo) se realiza a través de la unión de la proteína con la secuencia SD (naranja) del RNAm blanco impidiendo la unión de la maquinaria ribosomal (verde), lo que inhibe la traducción y disminuye la estabilidad del mensajero por la acción de las RNAsas (morado). Tomado de Aguilar 2009.

Fuera de las enterobacterias se han encontrado sistemas homólogos al sistema Csr, en *Pectobacterium carotovorum* (previamente llamada *Erwinia carotovora*), el sistema Rsm (repressor of secondary metabolites por sus siglas en inglés) modula la producción de enzimas extracelulares, metabolitos secundarios y movilidad (Mukherjee et. al. 1996). En *Pseudomonas aeruginosa* el sistema Rsm participa en la determinación del proceso de infección regulando los procesos asociados con la infección aguda y crónica. RsmA positivamente controla factores asociados con la infección aguda incluyendo los genes controlados por el sistema Vfr, el sistema de secreción tipo III y el pili tipo IV y negativamente controla factores relacionados con la infección crónica, incluyendo el sistema de secreción tipo VI y la producción de exopolisacáridos que promueven la formación de biopelícula (Bordi et. al. 2010). En *P. fluorescens* recientemente llamada *P. protegens*, una bacteria que ha servido como agente de biocontrol, ya que protege a plantas contra patógenos fúngicos, el sistema Rsm controla genes involucrados en la producción y secreción de factores antimicrobianos: metaloproteasas alcalinas, ácido cianhídrico y 2,4-diacetilfluoroglucinol (Reimann et. al. 2005; Heeb et. al. 2002, Blumer et. al. 1999); en

este microorganismo la activación de los elementos RsmX/Y/Z es dependiente de la densidad poblacional y se ha logrado inducir su expresión a través de la extracción del sobrenadante del cultivo con solventes orgánicos (Kay et. al. 2006; Reimmann et. al. 1997). La naturaleza química de la señal se desconoce; sin embargo, se sabe que no está relacionada con compuestos del tipo de las homoserina lactonas u otras moléculas señal conocidas. Por otra parte, en *E. coli* se demostró que compuestos carboxilados de cadena corta estimulan la actividad de CsrB indirectamente a través de activar al sistema de doble componente BarA/UvrY (Chavez et. al. 2010). Interesantemente se demostró que un aumento en las pozas de compuestos carboxilados como succinato, malato y 2-oxoglutarato correlacionan con el aumento de la expresión de RsmXYZ en *P. protegens* (Takeuchi et. al. 2009).

Una de las estrategias utilizadas para conocer las funciones reguladas por este sistema han sido los estudios transcriptómicos en mutantes *rsmA*. Se determinó que la proteína RsmA es un gen esencial bajo condiciones de crecimiento que promueven la acumulación de glucógeno en *E. coli* por lo que para el estudio de RsmA se han construido mutantes con actividad parcial por la remoción del extremo carboxilo terminal de la proteína (Timmermans & Melderer et. al. 2009). El estudio de microarreglos en mutantes *rsmA* ha revelado la profunda influencia que tiene CsrA/RsmA sobre el transcriptoma. En *Salmonella typhimurium* se ha reportado que el impacto que tiene este regulador sobre la expresión o represión de 365 transcritos de dos órdenes de magnitud, incluyendo factores de virulencia como genes de movilidad y genes involucrados en el sistema de secreción tipo III (Lawhon et. al. 2003). En la cepa *P. aeruginosa* PAO1 la eliminación de RsmA afecta la expresión del 9% de los genes presentes en el genoma (506 de 5, 570) afectando funciones asociadas con la virulencia, sistemas de adquisición de hierro, *quorum sensing*, movilidad y resistencia a antibióticos (Burrowes et. al. 2010). Experimentos similares se han realizado en especies como *Xantomonas campestris* pv. *campestris* y *Pectobacterium wasabiae* (Andrade et. al. 2014; Koiv et. al. 2013), todos ellos demostrando la afectación sobre una gran diversidad de genes; sin embargo, a través de esta metodología no es posible discernir entre blancos de regulación directa o indirecta.

## Clasificación de los sRNAs del sistema Rsm

Aunque se ha descrito más de un sRNA en el sistema Csr de *E. coli*, la reiteración de los sRNAs en las *Pseudomonas* spp. es más común por lo que se han clasificado en tres familias por medio de análisis de alineamientos en la secuencia y modelos de covarianza en RsmX, RsmY y RsmZ (Gardner et. al. 2009; Moll et. al. 2010). En *P. aeruginosa* se ha descrito solamente un alelo de RsmY y uno de RsmZ; mientras que en *P. syringae* pv. *Tomato* CD300 se han encontrado cinco alelos de la familia RsmX, de los que se ha demostrado su expresión, más no su funcionalidad. En *P. protegens* se ha caracterizado un sRNA de cada familia, un RsmZ, un RsmY y un RsmX (Kay et al 2005).

Los genes de los sRNAs del sistema Csr/Rsm son estimulados para su transcripción por la unión del activador transcripcional GacA/UvrY (Dubuis et. al. 2007; Goodman et. al. 2009; Pernestig et. al. 2001). GacA es el regulador de respuesta del sistema de transducción de señales de dos componentes GacS/A. La secuencia de unión a este regulador se encuentra

altamente conservada entre las Gamma-proteobacterias (Kulkarni et. al. 2006; Lenz et. al. 2005); sin embargo, la distancia del sitio de inicio de la transcripción puede variar considerablemente entre las familias de los sRNAs. Otro de los elementos conservados dentro de la región reguladora de los sRNAs es la secuencia -10 del promotor, con una secuencia hexamérica TAATCT conservada que reconoce el factor sigma 70 de la RNA polimerasa y finalmente todos los sRNAs del sistema, hasta ahora descritos, poseen un terminador independiente de la proteína Rho para el término de la transcripción (Humair et. al. 2010).

## La estabilidad de los sRNAs del sistema Csr/Rsm está altamente controlada

El efecto antagónico de los sRNAs sobre la proteína RsmA es dependiente de la estabilidad y del recambio que sufren estas moléculas. CsrD media el recambio de CsrB/CsrC de *E. coli* e indirectamente regula la expresión de todos los genes blanco de la proteína CsrA; aunque el mecanismo por el cual esta proteína media el recambio de los sRNAs aún no es muy claro, se sabe que CsrD facilita el corte de CsrB/C de manera dependiente de RNAsa E. CsrD es una proteína que se encuentra unida a la membrana que contiene dominios GGDEF y EAL, los cuales comúnmente están asociados a la síntesis y rompimiento del segundo mensajero di-GMP cíclico (c-di-GMP). Sin embargo, se ha descrito que los dominios de esta proteína no son funcionales (Suzuki et. al. 2006).

Mientras que en *E. coli* el recambio de CsrB/C es dependiente de la presencia de CsrD, en *P. protegens* se ha descrito que la unión de los sRNAs del sistema Rsm con la proteína homóloga a CsrA, RsmA permite la estabilidad del sRNA RsmZ y su protección contra el ataque de la enzima RNAsa E (Duss et. al. 2014). De manera similar, en *P. aeruginosa* la interacción de Hfq con RsmY lo protege contra la degradación por RNAsa E, no siendo así para RsmZ o RsmX (Sonnleitne et. al. 2006).

## Familia de proteínas reguladoras CsrA/RsmA

Las proteínas pertenecientes a la familia CsrA/RsmA son proteínas pequeñas (de tamaño menor a 7 KDa) de unión a RNA que participan en la regulación de la expresión génica en diversas eubacterias, actúan generalmente como represores post-transcripcionales ya que su unión la realizan cerca y/o en el sitio de unión al ribosoma (secuencia Shine Dalgarno) lo que impide la traducción del RNA mensajero blanco.

La proteína CsrA/RsmA en solución está presente formando dímeros (Dubey et al 2003). En *E.coli* (Gutiérrez et. al. 2005), *P. aeruginosa* (Rife et. al. 2005) y *Yersinia enterocolitica* (Heeb et. al. 2006) se demostró que cada monómero contiene cinco cadenas  $\beta$ , una  $\alpha$  hélice pequeña y un extremo carboxilo terminal flexible (Fig.4). Las cadenas  $\beta$  de los dos monómeros en el polipéptido están interconectadas para formar un centro hidrofóbico y dos extremos carboxilo terminal donde se encuentran las  $\alpha$ -hélices extendidas hacia afuera de la proteína (Fig. 4B)



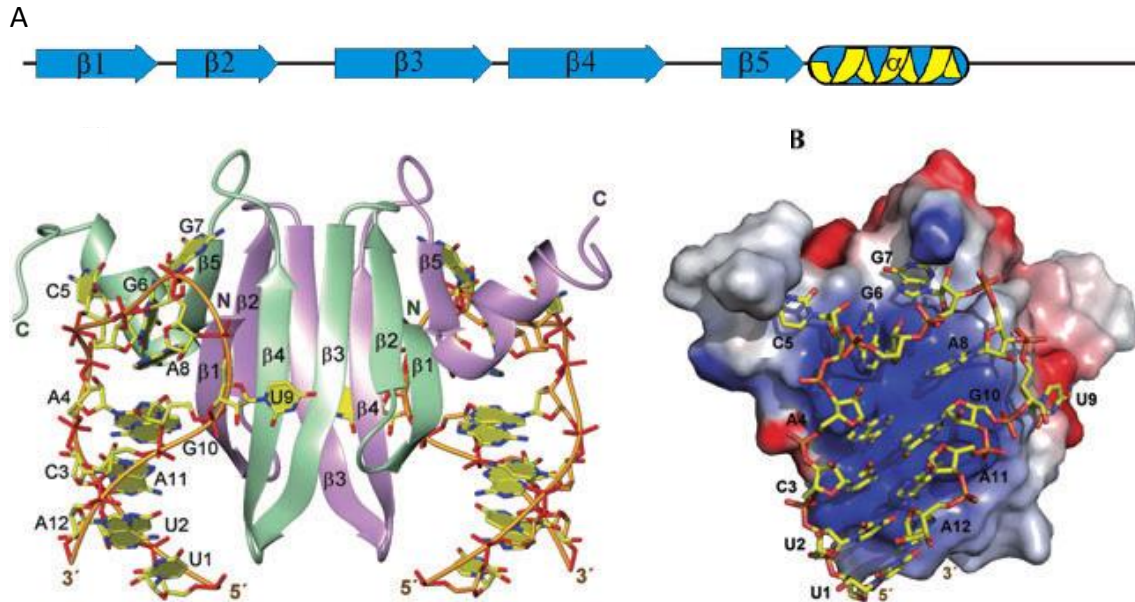


Fig.4.- Estructura secundaria de la proteína CsrA de *E. coli*. Modelo derivado de un análisis de resonancia magnética nuclear de un complejo de RsmE-hcn (B). La representación de la proteína está en violeta y verde. Los átomos de carbono están representados con amarillo, el nitrógeno en azul y rojo para oxígeno y fósforo. (C) Representación de la superficie del dímero de Rsm-hcnA. Tomado de Lapouge et. al 2007.

Aunque en *E. coli* únicamente se ha descrito una proteína RsmA, en las *Pseudomonadaceae* es común encontrar reiteraciones génicas; recientemente se encontraron genes ortólogos a *rsmA* en la secuencia de algunas cepas de género *Pseudomonas*. De los cinco alelos encontrados la proteína RsmA original es la más conservada entre las  $\gamma$ -proteobacterias. Otro alelo llamado RsmE/CsrA3 se encuentra exclusivamente en el linaje de las *P. fluorescens*; RsmI/CsrA1 se encuentra presente en las *P. fluorescens*, excepto en el subgrupo de las *P. protegens* que a su vez solo poseen alelos RsmA y RsmE. CsrA4 y CsrA5 solo están presentes en *P. syringae*; mientras que en *P. aeruginosa* posee RsmN y RsmF (Ferreiro et. al. 2018).

En *P. aeruginosa* se han descrito dos proteínas homólogas a RsmA, RsmN y RsmF. RsmA posee una estructura similar a la encontrada en CsrA con cinco cadenas beta y una alfa hélice en el extremo carboxilo terminal; mientras que, RsmF y RsmN poseen una organización estructural diferente a la encontrada en RsmA; la estructura pierde el  $\alpha$ -hélice en el extremo carboxilo terminal y poseen una inserción de 16 residuos entre la cadena  $\beta$  2 y 3 que forma una estructura  $\alpha$ -hélice (Morris et. al. 2013; Marden et. al. 2013).

La funcionalidad de los alelos homólogos a RsmA se ha demostrado a través de la compensación del fenotipo presente en mutantes *rsmA* en diferentes especies dentro de las *Pseudomonadaceae*; RsmN, compensa el fenotipo de nado tipo swarming en mutantes RsmA pero no está relacionado con otros fenotipos regulados por el sistema como la producción de pirocianina; por su parte, RsmF controla la producción de biopelícula y RsmA controla la traducción de RsmF generando una cascada regulatoria que opera a nivel post-transcripcional (Morris et. al. 2013; Marden et. al. 2013).

En *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 de los cinco alelos codificantes para proteínas homólogas a RsmA, la generación de mutantes individuales han permitido observar que la regulación ejercida a través de estas proteínas es diferencial y se demostró que la mutación en *csrA2* y *csrA3* alteran la expresión de una variedad de sistemas importantes en la movilidad, síntesis de exopolisacárido, crecimiento y virulencia (Ferreiro et. al. 2018),

Del mecanismo de unión y reconocimiento por la proteína CsrA/RsmA hacia el blanco de regulación, un análisis de sustitución/escaneo de alanina estableció que la proteína CsrA/RsmA de *E. coli* tiene dos regiones, la cadena  $\beta 1$  y  $\beta 5$  importantes para la unión a RNA *in vivo* y los residuos que pueden estar interactuando directamente con el RNA son Arg<sup>7</sup>, Arg<sup>44</sup> e Ile<sup>47</sup> (Mercante et. al. 2006 ). Para conocer el sitio de unión de la proteína RsmA con los blancos de regulación, se han realizado diversas aproximaciones; desde la búsqueda de la secuencia de unión a los sRNAs del sistema hasta la síntesis de RNAs *in vitro* para poder experimentar la unión de la proteína en un ensayo denominado SELEX; encontrándose un sitio de unión conservado para *E. coli* el cual es RUACARGGAUGU, con los motivos ACA y GGA 100% conservados (Dubey et. al. 2005). Adicionalmente utilizando resonancia magnética nuclear (NMR) en *P. protegens* se demostró que en la unión de RsmE-RsmZ el motivo GGA es determinante para la unión con la proteína (Duss et. al. 2014).

La unión de la proteína CsrA/RsmA a los RNA mensajeros blanco de regulación se ha demostrado a través de ensayos de retardo electroforético y ha sido descrita de la siguiente manera: La proteína RsmA forma un dímero que se une a RNA mensajero que se estructura en forma de tallo y asa (con el sitio GGA en el asa) siendo este, un blanco de alta afinidad, lo que permite la formación de un segundo motivo de unión de baja afinidad por la proteína que puede ser encontrado a 10- 63 nt (Mercante et. al. 2009) (Fig. 5).

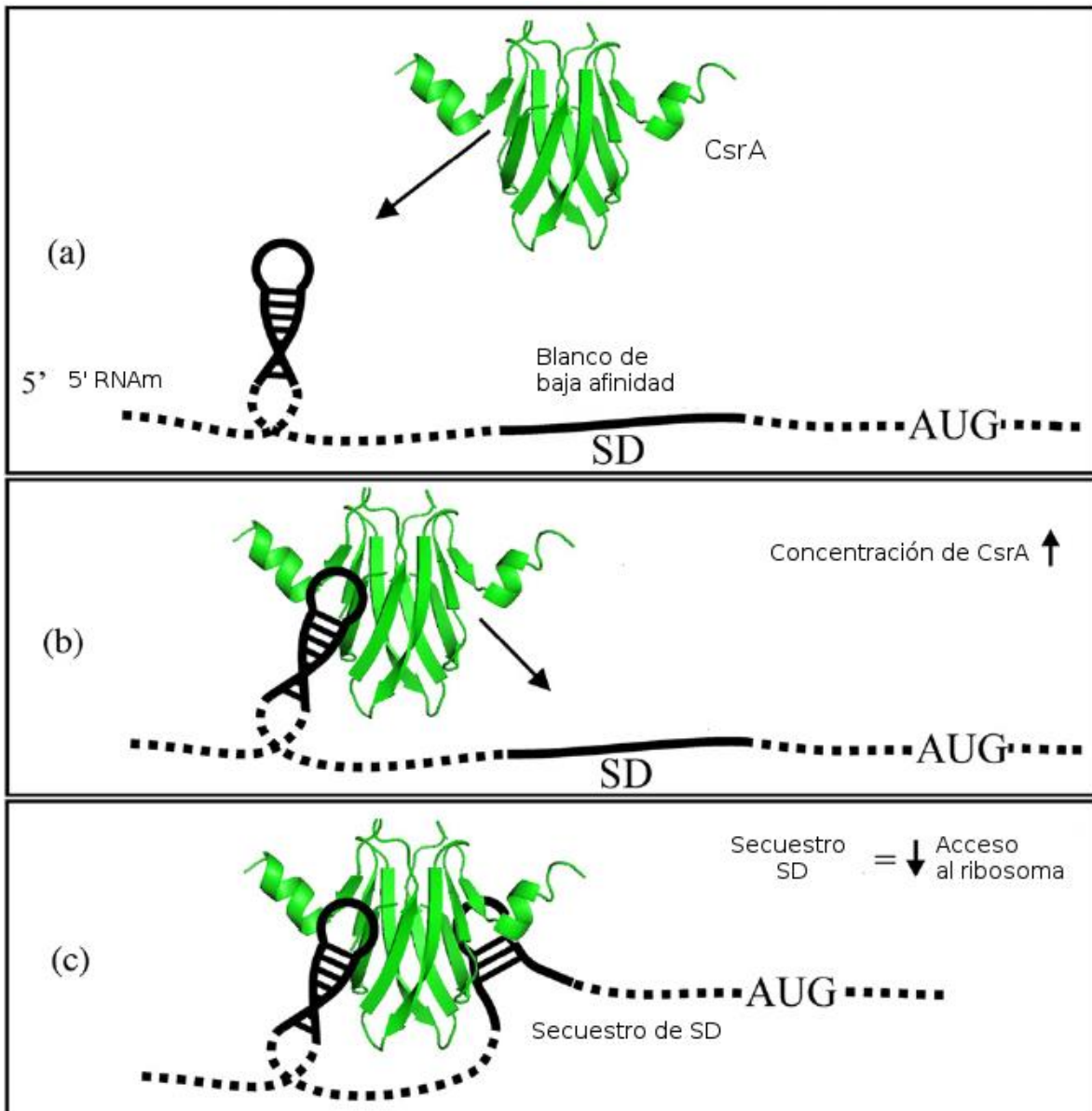


Fig. 5.- Modelo de interacción de la proteína CsrA en el extremo 5' del gene *glgC* de *E. coli*. La proteína CsrA se une a un sitio blanco de alta afinidad que comúnmente presenta una estructura característica de tallo y asa muy próxima al sitio de unión al ribosoma o secuencia Shine Dalgarno (SD). b) Después de la unión inicial, el incremento de la concentración local de CsrA permite que la porción de RNA de baja afinidad que esta sobre el SD interactúe con el sitio libre de la proteína CsrA. c) La unión del blanco de baja afinidad permite el secuestro del sitio de unión al ribosoma y como consecuencia un decremento en el inicio de la traducción. Tomado y modificado de Mercante et. al. 2009.

## El sistema Csr/Rsm es activado a través del sistema de dos componentes GacS/GacA y su homólogo BarA/UvrY

El sistema de dos componentes (TCS) GacS/GacA también referido como BarA/UvrY en *E. coli*, VarS/VarA en *Vibrio cholerae*, LetS/LetA en *Legionella pneumophila* entre otros (Lapouge et. al. 2007; Pernestig et. al. 2003; Lenz et. al. 2005; Hammer et. al. 2002), es el principal regulador de la expresión de los sRNAs del sistema Csr/Rsm. GacS es una cinasa histidínica que utiliza un mecanismo de fosforelevo para activar a su regulador de respuesta GacA. El regulador de respuesta GacA (UvrY en *E. coli*) es un miembro de la familia de proteínas FixJ, que contiene un dominio receptor (REC) en el extremo amino terminal y un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo terminal. GacA una vez activado promueve la expresión de los sRNAs del sistema Rsm, estudios *in vitro* de unión a los promotores de los genes *csrB* y *csrC* sustentan estas observaciones (Martínez et. al. 2014; Teplitzki 2003); sin embargo, los detalles del mecanismo de activación no han sido determinados.

Adicionalmente, dos cinasas histidínicas huérfanas llamadas RetS y LadS se han relacionado con la función del sistema de dos componentes GacS/A en *P. aeruginosa* PAK (Goodman et. al. 2004; Lin et. al. 2006; Ventre et. al. 2006; Bordi et. al. 2010). La interacción entre RetS y GacS da como resultado una disminución en la fosfotransferencia de GacS hacia GacA, indicando que RetS es un antagonista de GacS (Goodman et. al. 2009). Mutantes nulas de *P. aeruginosa* PAK en *retS* y *rsmA* poseen fenotipos similares: una fuerte agregación célula-célula, una sobreproducción de polisacáridos extracelulares dejando un fenotipo con colonias pequeñas y un aumento en la formación de biopelícula; además la disminución de la expresión del sistema de secreción tipo III, así como de la movilidad tipo *twitching*, debido a la baja expresión del pili tipo IV. LadS, la otra cinasa huérfana estimula la fosforilación de GacA y parece tener un posible contacto físico con GacS, sin embargo, los experimentos realizados hasta ahora no son contundentes. En las mutantes *ladS*, la formación de biopelícula está disminuida, mientras que la expresión del sistema de secreción tipo III está aumentada.

Más allá de las cinasas que son capaces de interactuar con GacS, una fosfotransferasa, llamada HptB ha sido descubierta recientemente (Bordi et. al. 2010), HptB puede ser fosforilada al menos por tres proteínas cinasas histidínicas llamadas PA1611, PA1976 y PA2824 (Hsu et. al. 2008). El resultado final de esta transducción de señales es la represión del gen de *rsmY* sin afectar la expresión de los sRNAs de la familia RsmZ, aunque este resultado aún resulta controversial (Bordi et. al. 2010; Jean-Pierre et. al. 2017).

# ANTECEDENTES GENERALES

## Características generales de *Azotobacter vinelandii*

Los miembros del género *Azotobacter* son células ampliamente distribuidas en suelo y agua; se caracterizan por su forma de vida estrictamente aerobia y su crecimiento en medios libres de nitrógeno; el género comprende al menos siete especies bien definidas *A. crocoocum*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. paspali*, *A. salinestrus* y *A. vinelandii* (Jensen et. al. 1954; Kennedy et al. 2005).

*Azotobacter vinelandii* es una  $\gamma$ -proteobacteria que pertenece a la familia Pseudomonadaceae, Gram negativas, móviles por flagelos peritricos, mucoides, que se pueden presentar en formas variables desde cocos a bacilos o en diadas con un tamaño que va de 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 6), pleomórfica, aerobia, poliploide y fijadora de nitrógeno. Se han descrito dos cepas, la E y la DJ, la cepa E fue aislada en la Universidad de Rutgers por Jacob Lipman en 1903 y una de sus características principales es la formación de colonias mucoides debido a la producción de alginatos. Contrario a la cepa E, la cepa DJ no es productora de colonias mucoides<sup>1</sup>, y en la cual se han realizado diversos estudios de genética por su flexibilidad en el trabajo experimental.

El genoma de la cepa DJ de *A. vinelandii* fue completamente secuenciado por el DOE Joint Genome Institute. El genoma descrito es de 5.3 Mpb (Setubal et. al. 2009) con un contenido de GC del 65%; ha sido de gran interés biotecnológico por su capacidad de fijar nitrógeno en condiciones aerobias y por la producción de metabolitos secundarios como los alginatos y el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) (Kennedy et. al. 1986; Galindo et. al. 2007).

En *A. vinelandii* se ha estudiado ampliamente la fijación de nitrógeno ya que tiene la capacidad de mantener activa esta función en condiciones aeróbicas gracias a su capacidad de generar un ambiente micro-aerofílico y su alta tasa de respiración. Por otra parte, posee genes que codifican para tres nitrogenasas que utilizan diversos cofactores para su función: Fe-Fe, Fe-Mo y Fe-Va, lo que le proporciona una amplia versatilidad dependiendo de la disponibilidad de cofactores en el medio ambiente (Bishop et. al. 1980; Kennedy et al. 1987).

Los alginatos forman una importante familia de biopolímeros, son polisacáridos lineales, compuestos por una cantidad variable de ácido (1,4) $\beta$ -D-manurónico y su epímero ácido  $\alpha$ -L-gulurónico. Tienen una gran variedad de aplicaciones ya que son capaces de formar estructuras gelificadas de diferentes grados de dureza siendo utilizados como emulsificantes y viscosificantes por la industria alimenticia e inmovilizantes de enzimas en la industria farmacéutica, entre otras aplicaciones (Galindo *et al.*, 2007).

El poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es un poliéster de la familia de los polihidroxialcanoatos que es almacenado intracelularmente bajo condiciones de desbalance de nutrientes por *A. vinelandii* como reserva de fuente de carbono y energía. Se ha propuesto como una alternativa en la producción de plásticos biodegradables provenientes de fuentes renovables, con características semejantes a los derivados del petróleo, ya que la composición monomérica del poliéster permite obtener plásticos biodegradables con

---

<sup>1</sup> La pérdida del fenotipo mucoso es resultado de una mutación del gen que codifica para el factor sigma AlgU implicado en la transcripción de genes necesarios para la producción de alginato (Martínez *et al.*, 1996).

características físicas que van desde materiales rígidos y quebradizos hasta productos flexibles como el hule (Anderson y Dawes, 1990; Peña et. al. 2016).

*A. vinelandii* en su interacción con plantas produce fitohormonas reguladoras del crecimiento vegetal, auxinas, giberilinas, citocininas y sideróforos, factores importantes en su interacción con plantas y otros microorganismos (Narula *et al.*, 2000).

*A. vinelandii* tiene la capacidad de diferenciarse y formar quistes resistentes a la desecación y a las radiaciones UV en condiciones desfavorables de crecimiento (Fig. 7). Al inicio del proceso de diferenciación las células pierden sus flagelos y presentan una última división celular generándose dos células esféricas formadas por dos capas, una interna llamada intina y una externa llamada exina las cuales están constituidas por alginato y lipoproteínas en un 13% y 32%, respectivamente; una vez que están formadas estas capas, se procede a la formación de quistes maduros (15  $\mu\text{m}$  de largo por 2.0  $\mu\text{m}$  de ancho) constituidos por un cuerpo central basal que en su interior contiene gránulos de PHB. En condiciones favorables el quiste inicia un proceso de germinación con el hinchamiento del cuerpo central provocando la ruptura de la exina emergiendo dos células que adquieren nuevamente movilidad (Sadoff, 1975).

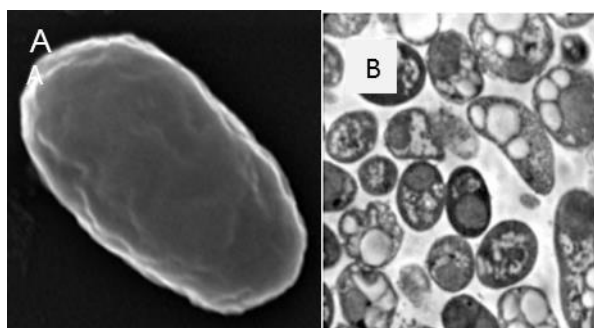


Fig. 7.- Micrografía electrónica de *A. vinelandii* en forma bacilar (A) y en forma de quiste (B). Tomado de Lara 2011 y Segura et. al. 2004.

## Regulación de la producción de metabolitos secundarios: sistema de dos componentes GacS/A- Rsm en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii*, el sistema de dos componentes GacS/A regula positivamente la producción de metabolitos secundarios como el alginato, PHB y alquilresorcinoles controlando la expresión de los genes *algD*, *arpR* y *phbR* que codifican para proteínas clave en la producción de los productos de metabolismo secundario en cuestión (Manzo et. al. 2012; Hernández et. al. 2012; Romero et. al. 2013).

La producción de alginato es mediada por la expresión de los genes contenidos en tres unidades transcripcionales, pero la enzima clave en la producción de alginato es la GDP-manosa deshidrogenasa; producto del gen *algD* que posee una región reguladora compleja presentando tres promotores de los cuales se conocen solamente dos reguladores; el promotor uno (P1) es dependiente del factor  $\sigma^S$  y el promotor dos (P2) dependiente de factor  $\sigma^E$  (Castañeda et. al. 2001). El efecto de la mutación en el gen *gacA* provoca la pérdida de los transcritos provenientes de los tres promotores, lo cual no se pudo explicar hasta

que se relacionaron a los sRNAs del sistema Rsm con el activador transcripcional GacA, se demostró la interacción de la proteína RsmA con el RNAm del gen *algD* y a través de ensayos de retardo de corrimiento electroforético (EMSA) lo que sugiere que la proteína RsmA regula de manera negativa la expresión del gen *algD* y por lo tanto la síntesis del alginato ya que su sobre expresión redujo la síntesis de este polímero (Manzo et. al 2012); sin embargo, quedan más estudios por realizar para poder dilucidar el papel que tiene la proteína RsmA en cuanto a la regulación del gen *algD in vivo*.

Durante el proceso de enquistamiento *A. vinelandii* produce alquilresorcinoles los cuales reemplazan a los fosfolípidos de la membrana en la capa que forma la exina del quiste. Los alquilresorcinoles son lípidos fenólicos con cadenas carbonadas largas, de 23 a 25 residuos, que son sintetizados durante la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo; ya que en esta etapa el 0.01% de las células son quistes, para el estudio en el laboratorio se puede inducir la formación de quistes a través de la adición de butanol o PHB como fuente de carbono (Reusch & Sadoff 1983; Segura et. al. 2009). El operón *arsBCD* codifica para las enzimas responsables de la producción de estos polímeros. ArsB y ArsC son policétidos sintetasas de tipo III que sintetizan alquilresorcinoles y alquilpironas respectivamente; mientras que ArsA es una sintasa de ácidos grasos que es la encargada de alargar la cadena carbonada. ArpR es un regulador transcripcional de tipo LysR y tiene la función de activar la transcripción del operón *arsABCD* y se ha demostrado experimentalmente que la proteína RsmA controla negativamente la traducción de este regulador impidiendo así la síntesis de estos compuestos fenólicos mientras que GacA y RsmZ1 controlan positivamente su expresión (Romero et. al. 2016).

Finalmente, la producción de PHB es mediada a través de las enzimas biosintéticas codificadas a través del operón *phbBAC* y del activador transcripcional *phbR* que permite su transcripción y de similar a los alquilresorcinoles, RsmA controla al activador transcripcional *phbR* impidiendo su traducción y por lo tanto impidiendo la expresión de los genes biosintéticos correspondientes (Henández et. al. 2012)

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

A diferencia de RsmA/CsrA, que es una proteína muy conservada entre las gamma proteobacterias, los ortólogos de *csrB* (*rsmB*) no presentan identidades significativas a nivel de secuencia. Sin embargo, las estructuras secundarias de las moléculas de RNA generadas a partir de su transcripción resultan ser muy parecidas (Romeo et al., 1998). Con las consideraciones anteriores, tomando como patrón de comparación al gen homólogo *rsmB* de *P. protegens* (*prbB* o *rsmZ*) (Aarons, et al., 2000, Heeb et al., 2002) se realizó la búsqueda de un gen homólogo en la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, encontrando una región que presentó solo 36% de identidad con *prbB*. Mediante el programa MFOLD (Zuker et al., 1991) se predijo la estructura secundaria del RNA codificado por nuestro gen putativo y se observaron estructuras de tallo y asa similares a las de *prbB* (*rsmZ1*) (Aarons et al., 2000). A través de alineamientos locales con una baja astringencia en el apareamiento del gen *rsmZ* de *P. aeruginosa*, se obtuvieron nueve sRNAs putativos, llamados *rsmZ1-Z7*, *rsmY1* y *Y2* de acuerdo con la clasificación realizada por Moll en 2010 (Manzo et. al. 2012).

Una vez obtenidas las secuencias de sRNAs se llevó a cabo la caracterización de los genes *rsmZ1* y *rsmZ2*, se determinó el nivel de expresión que alcanza su máximo en fase de crecimiento estacionaria, la expresión de ambos genes es dependiente del regulador de respuesta GacA. El efecto de la mutación de cualquiera de estos dos alelos produce la disminución de la producción de alginato de casi cinco veces respecto a la producción de la cepa silvestre, además su capacidad de interactuar con la proteína RsmA fue demostrada a través de ensayos de retardo electroforético (EMSA) (Manzo et. al. 2012).

Los demás sRNAs de la familia RsmZ poseen las siguientes características: se encuentran codificados en regiones intergénicas dentro del genoma de *A. vinelandii* (Fig. 8), su estructura secundaria se observa es en forma de tallo y asas, estas últimas poseen los motivos de unión con la proteína RsmA y poseen un terminador fuerte independiente de la proteína Rho. En cuanto a los sRNAs de la familia RsmY, inicialmente se describieron dos alelos, *rsmY1* y *rsmY2*; sin embargo, en la región reguladora del gen *rsmY2* no se encontró sitio de unión a la proteína GacA, además su localización en el genoma sugería que estos genes eran una sola unidad transcripcional ya que los genes *rsmY1* y *rsmY2* se encontraban muy cercanos con una región intergénica de 88 pb. Se comprobó a través de un estudio tipo *northern blot* y RT PCR punto final que *rsmY1*-*Y2* codifican para un solo gen que transcribe para una molécula de RNA de 336 rb (Teran 2011; Hernández et. al. 2012).



Fig. 8.- Contexto genómico de los nueve sRNAs del sistema Rsm en *A. vinelandii* cepa DJ. Los sRNAs *rsmZ1*-*Z7* y *rsmY1* y *Y2* se encuentran de color rojo, los genes y las secuencias de proteínas se encuentran indicadas de color verde y turquesa respectivamente. Imagen generada a través del programa Artemis (Carver et. al. 2012).



Por otra parte, se han realizado estudios *in silico* con la finalidad de encontrar los genes blanco de regulación de la proteína RsmA; una búsqueda bioinformática en el genoma de *A. vinelandii* DJ utilizando la secuencia consenso de pegado de RsmA descrita para enterobacterias a través de una metodología llamada Selex (RUACARGGAUGU, R = A o G) y posteriormente utilizando la secuencia encontrada para las *Pseudomonadaceas* (Dubey et. al. 2005). La búsqueda en las regiones intergénicas del genoma de *A. vinelandii* DJ arrojó pocos resultados en comparación con los elementos regulados por RsmA en otros géneros bacterianos, por lo que esta secuencia se acotó a CANGGANG y se tomó como parámetros de búsqueda el que las cajas no estuvieran a más de 300 pb del inicio putativo de la transcripción del gen, tal búsqueda dio por resultado un total de 358 regiones intergénicas. Posteriormente, se generó la estructura secundaria de las regiones obtenidas utilizando el programa M-fold, con el que se obtuvo que el 87% de las secuencias encontradas formaban la estructura característica de tallo y asa con el motivo GGA en las asas que es necesario para la unión de la proteína RsmA y su consiguiente regulación (López, 2011). Dentro de los resultados obtenidos en la búsqueda bioinformática encontramos el gen *algD*, *phbR* y la policétido sintasa III, los cuales se ha demostrado interactúan con la proteína RsmA *in vitro* y son regulados por el sistema Rsm (Manzo et. al. 2012; Hernández et. al. 2012; Romero et. al. 2013).

Finalmente, a pesar de los estudios realizados anteriormente aún no se conoce la cinética de expresión y cuáles son las señales que impactan sobre la expresión de los sRNAs *rsmZ1-7* y *rsmY* en la cepa E de *A. vinelandii* y su impacto sobre la producción de alginato; con el estudio de estas características se puede incidir sobre ellas para poder lograr un mejor entendimiento del sistema y obtener una forma de controlar la expresión de los sRNAs y al mismo tiempo la producción de metabolitos secundarios de interés biotecnológico.

## JUSTIFICACIÓN

El sistema de regulación post-transcripcional Rsm tiene papeles importantes en la regulación de la traducción de genes que pueden estar regulando funciones, que van desde virulencia en bacterias patógenas, la producción de agentes biocontrol en bacterias que se relacionan con plantas hasta la producción de metabolitos secundarios como son la producción de alginatos, PHB y alquilresorcinoles en *A. vinelandii*. El estudio del sistema Rsm nos permitirá conocer los elementos que participan en la regulación de la producción de estos metabolitos secundarios en *A. vinelandii*, por lo que el estudio de los mecanismos involucrados en la modulación de la expresión de los genes biosintéticos nos permitirá incidir sobre las estrategias para impulsar su producción.

## HIPÓTESIS

La regulación de la producción de alginato y alquilresorcinoles a través de los sRNAs del sistema Rsm está influenciada por la fuente de carbono utilizada durante el crecimiento.

Los genes *rsmY1* y *rsmY2* son transcritos en una unidad transcripcional funcional *in vivo* que regula la expresión del gen *algD* en *A. vinelandii*.

El gen *algD* es regulado a nivel transcripcional de manera indirecta a través del sistema Rsm en *A. vinelandii*.

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Estudiar al sistema Rsm de *Azotobacter vinelandii*

## Objetivos particulares:

1. Estudiar el efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm (RsmZ1-Z7 y RsmY).
2. Evaluar la expresión de RsmZ1-Z7 y RsmY en condiciones no diazotróficas
3. Determinar el efecto de la mutación individual de los sRNAs *rsmZ1-Z7* sobre la producción de alginato en presencia de fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas.
4. Caracterizar funcionalmente la unidad transcripcional del gen *rsmY* sobre los fenotipos de alginato y alquilresorcinoles.
5. Evaluar el efecto de la mutación del gen *rsmY* sobre la expresión del gen *algD*.
6. Estudiar el efecto de la mutación del gen *rsmA* sobre el blanco de regulación *algD* a nivel transcripcional y post-transcripcional en cepas de *A. vinelandii* no productoras de alginato y con actividad disminuida de la proteína GDP-manosa deshidrogenasa.

# MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas y los plásmidos usados se enlistan en la Tabla 1 de la sección de anexos. La cepa E de *A. vinelandii* fue utilizada para este estudio. Las condiciones de crecimiento fueron a 30°C en medio mínimo Burk's libre de sales de nitrógeno suplementado con 20g/L de sacarosa (BS), fructosa (BFru), glucosa (BGlu) o succinato (BSuc). La cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$  fue crecida en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C. Las concentraciones de antibióticos utilizadas (en  $\mu\text{g/ml}$ ) para *A. vinelandii* y *E. coli* fueron las siguientes, respectivamente: tetraciclina (Tc), 40 y 20; kanamicina (Km), 4 y 20; gentamicina (Gm), 1.5 y 10; estreptomycin (Sm) 2 y 20; ampicilina (Ap), 0 y 100 y ácido nalidixico (Nal), 10 y 10. Las transformaciones en *A. vinelandii* se llevaron a cabo como previamente se ha descrito (Bali et. al 1992) con algunas modificaciones reportadas (Ahumada et. al. 2017).

## Procedimientos de manejo de ácidos nucleicos

El aislamiento de DNA y los procedimientos de clonación fueron llevados como se ha descrito anteriormente (Sambrook et. al. 1989). Las secuencias del genoma de *A. vinelandii* DJ fue utilizada para diseñar los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR. Las enzimas DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y Vent DNA polimerasa (NEB) fueron utilizadas para las amplificaciones por PCR.

## Construcción de las fusiones transcripcionales *ErsmZ1-7* y *ErsmY*

Los fragmentos conteniendo las regiones promotoras de *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6*, *rsmZ7* y *rsmY* fueron obtenidos de los plásmidos pSAHFUSTs-Z1-Z7 y pSAHFUSTs-Y1 (*PrsmZ1-7* y *PrsmY1*) (Hernández-Eligio et. al. 2012) cortándose con la enzima *EcoR1*, mientras que la región promotora de *rsmZ3*, fue obtenida por escisión con la enzima *XbaI*. Los fragmentos *PrsmZ1-7* fueron individualmente clonados en el vector integrativo PUMATc $gusAT$  (Muriel et. al. 2015), generando las fusiones transcripcionales pUMA-*gusAT* (Tc') para cada gen. Este vector dirige la integración de la fusión *gusA* en el locus neutral *meIA*. Los plásmidos resultantes (llamados pUMAgusAT – *rsmZ1* a *rsmZ7* y *rsmY1*) fueron linearizados con *ScaI* y transformados en la cepa E. La selección de la doble recombinación homóloga Tc' que porta la integración de las fusiones individuales pUMAgusAT*rsmZ1-7* y *rsmY* fueron aisladas y confirmadas por PCR. Las cepas resultantes fueron llamadas EZ1T (pUMAgusAT-*rsmZ1*), EZ2T (pUMAgusAT-*rsmZ2*), EZ3T (pUMAgusAT-*rsmZ3*), EZ4T (pUMAgusAT-*rsmZ4*), EZ5T (pUMAgusAT-*rsmZ5*), EZ6T (pUMAgusAT-*rsmZ6*), EZ7T (pUMAgusAT-*rsmZ7*), EYT (pUMAgusAT-*rsmY1*) (Tabla1).

## Construcción de la fusión transcripcional *EgyrAT*

El fragmento de 130 pb conteniendo la región reguladora del gen *gyrA* de *A. vinelandii* (*PgyrA*) (Avin\_RS07245) fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos DgyrAXbaI y RgyrEcoRI, que contienen sitios de restricción para *XbaI* y *EcoRI* respectivamente. El fragmento *PgyrA* fue clonado en el vector pUMATc $gusAT$  linearizado con las enzimas *XbaI*

y *EcoRI*, generando la fusión transcripcional *PgyrA-gusA*. El plásmido fue linearizado con la endonucleasa *Scal* y fue transformado en la cepa E. La cepa E<sub>gyrAT</sub> generada por doble recombinación homóloga fue confirmada a través de PCR.

## Mutantes generadas en la cepa E de *A. vinelandii*

### Mutaciones del sRNA *rsmY*

En el estudio del sRNA *RsmY*, se obtuvieron dos mutantes: *ErsmyY1* y *ErsmyY1Y2* utilizando los plásmidos *pGemΔrsmY* y *pGemΔrsmXY* conteniendo las remociones correspondientes a los alelos *rsmY1* y *rsmY1Y2* generados por Teran (2011).

### Complementación de las mutantes *EY1* y *EY1Y2*

Para llevar a cabo el análisis genético de complementación de las mutantes generadas para *EY1* y *EY1Y2* las construcciones *pUMATcY1Y2* y *pUMATcY1* generadas por Mena en 2015 fueron utilizadas. Un fragmento 0.782 kb clonado en el vector *pGemT-Easy* conteniendo los locus *rsmY1* y *rsmY2* más una región de 0.22 kb con el promotor putativo y la caja de pegado a *GacA* fue escindido con una endonucleasa *PstI* y clonada en el vector *pUMATc* (Cocotl-Yañez et. al. 2014). El plásmido resultante fue llamado *pUMATcrsmY1Y2* y fue utilizado para la transformación de la cepa E de *A. vinelandii* y las mutantes *EY1* y *EY1Y2*. Transformantes resistentes a Tc fueron aisladas y confirmadas por PCR. Las cepas recombinantes fueron llamadas *EY1/Y1Y2* y *EY1Y2/Y1Y2*.

La generación de un segundo plásmido utilizado para el ensayo de complementación fue diseñado de la siguiente manera: un fragmento de DNA de 0.349 kb conteniendo la región estructural del gen *rsmY1* más 0.22 kb de la secuencia río arriba más su región reguladora (Mena 2015) fue clonada en el vector *pGem-T Easy*, generando un plásmido llamado *pG0.35rsmY*. Posteriormente fue escindido de este vector a través de los cortes con enzimas de restricción *SacI* y *SacII* y clonado en el vector *pUMATc*, resultando en el plásmido *pUMATcrsmY1*. De la misma manera que para la complementación del alelo *rsmY1Y2*, fueron generadas las recombinantes *EY1/Y1* y *EY1Y2/Y1*.

### Generación de mutantes *rsmA*

Se generó la mutación en gen *rsmA* a través del plásmido mutagénico construido por Sandoval 2014 llamado *pGAH1Gm* conteniendo el gen *rsmA* con una mutación por inserción de un casete de resistencia a gentamicina (Alexeyev et. al. 1995) en el codón 51 de la proteína. Células competentes de las cepas E, *AEΔD* y A2 fueron transformadas con el plásmido *pGAH1Gm*; las transformantes resistentes a gentamicina fueron seleccionadas y verificadas a través de PCR amplificando con oligonucleótidos llamados *rsmAFw* y *rsmARv* los que amplifican un fragmento de 2.1kb. Las mutantes derivadas conteniendo la mutación en *rsmACT::Gm* fueron llamadas *AErsmACT*, *AEΔDrsmACT*, *A2rsmACT* respectivamente. De la misma manera un plásmido mutagénico similar al *pGAH1Gm*, pero con un casete de resistencia a kanamicina (*pGAH1Km*) fue transformado en las cepas conteniendo las fusiones cromosomales transcripcional y postranscripcional del gen *algD*, *AED-gusA* y *AED-gusA* (García Aguilar 2013). Las transformantes resistentes a Km fueron aisladas y

confirmadas por PCR. Estas mutantes fueron llamadas AED-*gusArsmACT* y AED-*'gusArsmACT* respectivamente.

## Métodos analíticos

La producción de alginato fue determinada por espectrofotometría de ácidos urónicos con carbazol (Knutson & Janes 1968). La síntesis de ARs fue determinada como se ha descrito previamente (Tłuścik & Mejbaum-Katzenellenbogen 1981). La actividad  $\beta$ -glucuronidasa fue medida como fue reportado por Wilson et. al. (1995); 1U corresponde a 1nmol de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronido hidrolizado por min por mg de proteína. La proteína fue determinada por el método de Lowry (Lowry et. al. 1951).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y discusión de este estudio se dividieron en tres apartados:

- Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm
- Caracterización funcional del gen *rsmY*
- La mutación del gen *rsmA* afecta la expresión del gen *algD* a nivel transcripcional y post-transcripcional en cepas de *A. vinelandii* no productoras de alginato y con actividad parcial de la proteína GDP-manosa deshidrogenasa.



# Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm

Para estudiar la expresión de los ocho sRNAs del sistema Rsm en *A. vinelandii* se generaron cepas que poseen una fusión individual de los promotores correspondientes a cada una de las regiones reguladoras de los sRNAs en el genoma de *A. vinelandii* (EZ1-Z7T y EYT); estas cepas fueron cultivadas en medio mínimo Burk's Sacarosa y se determinó su cinética de expresión observándose que va aumentando conforme avanza la curva de crecimiento (Fig. 9A). Es de notar que, aunque los patrones de expresión son similares, los niveles de expresión son diferentes entre los diversos elementos del sistema. Los elementos de la familia RsmZ tienen un máximo de expresión en la fase estacionaria de crecimiento (36h) como ha sido descrito en *P. protegens* y en *P. aeruginosa*, (Kay et. al. 2005; Romeo et. al. 1998). Sin embargo, la transcripción de *rsmY* va en aumento desde las 12 horas y alcanza su máximo de expresión a las 24 horas durante la fase estacionaria temprana de crecimiento (Fig. 9B).

Los promotores de los genes *rsmZ1*, *rsmZ3* y *rsmZ5* presentan la actividad más baja respecto los promotores de las regiones de *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ6* y *rsmZ7*; es notorio que *rsmZ1* muestra la expresión más baja mientras que *rsmZ2* muestra la mayor actividad de promotor a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 9B y 9C).

Las diferencias en los niveles de expresión pueden ser reflejo de las diferencias en sus regiones reguladoras, incluyendo la localización de la caja de unión a GacA. Las regiones reguladoras de los alelos de los *rsmZ1-7* pueden ser agrupadas entre aquellos que contienen una región reguladora larga como es el caso de *rsmZ1* y *rsmZ2* y aquellos que poseen una región reguladora corta para el resto de los *rsmZs* (*rsmZ3-7*). En el caso de *rsmZ1-2*, aunque tienen una región reguladora de tamaño similar, poseen diferencias en la secuencia. La presencia de sitios de unión putativos a H-NS e IHF presentes entre la caja de unión a GacA y el inicio de la transcripción para *rsmZ1* y *rsmZ2* respectivamente, sugieren que la participación de estos reguladores podría estar influenciando la expresión de los sRNAs en *A. vinelandii*, los sitios virtuales de unión a estos reguladores fueron encontrados a través de los programas Virtual Footprint-Prodoric y Softberry-BPROM se muestran en la Fig. 10

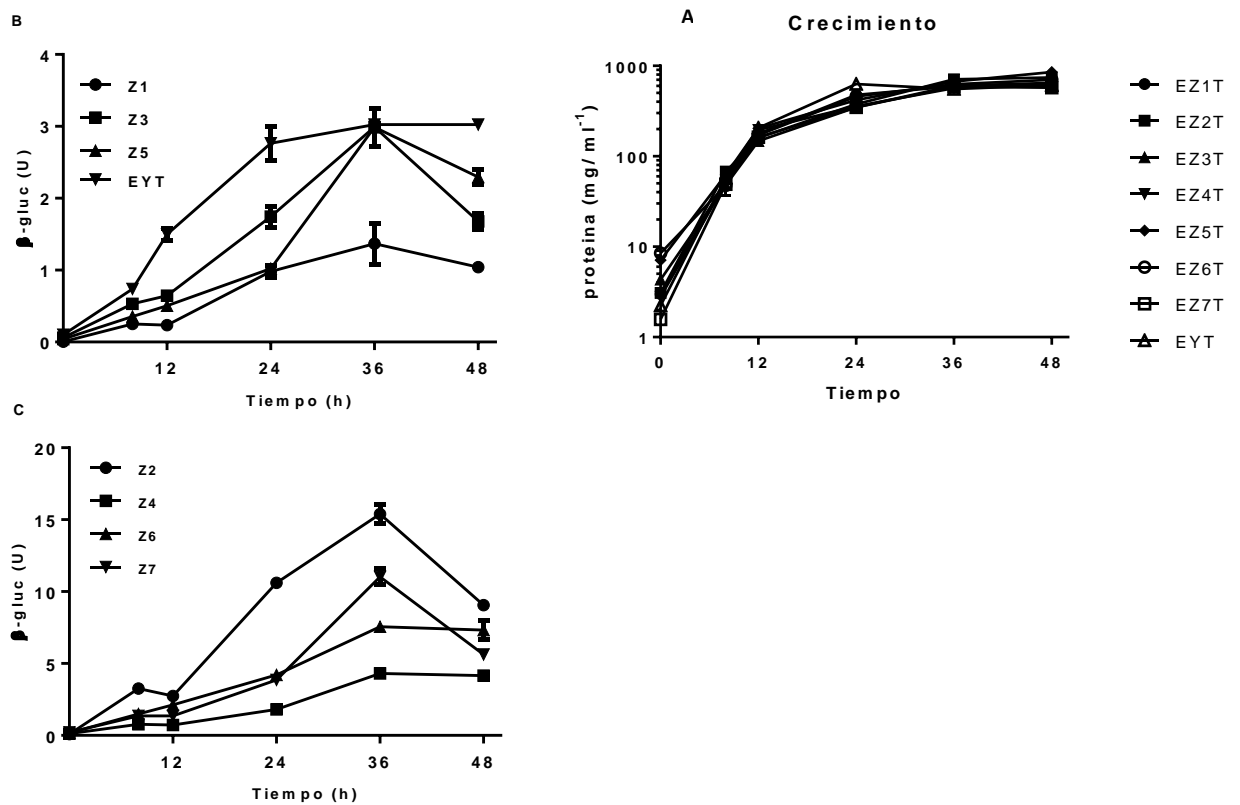


Fig.9.- Fig. 9.- Cinética de expresión de los sRNAs *rsmZ1-7* de *A. vinelandii* a lo largo de la curva de crecimiento. La curva de crecimiento de las fusiones transcripcionales crecidas en medio mínimo Burk's (A); la medición de la expresión de las fusiones transcripcionales de los sRNAs *rsmZ1*, *rsmZ3*, *rsmZ5* y *rsmY* a lo largo de la curva de crecimiento (B); las mediciones de la actividad β-glucuronidasa de las cepas conteniendo las fusiones *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ6*, y *rsmZ7* (C). Las mediciones se realizaron en medio Burk's con sacarosa al 2% como única fuente de carbono; las muestras se tomaron en los tiempos indicados por triplicado.

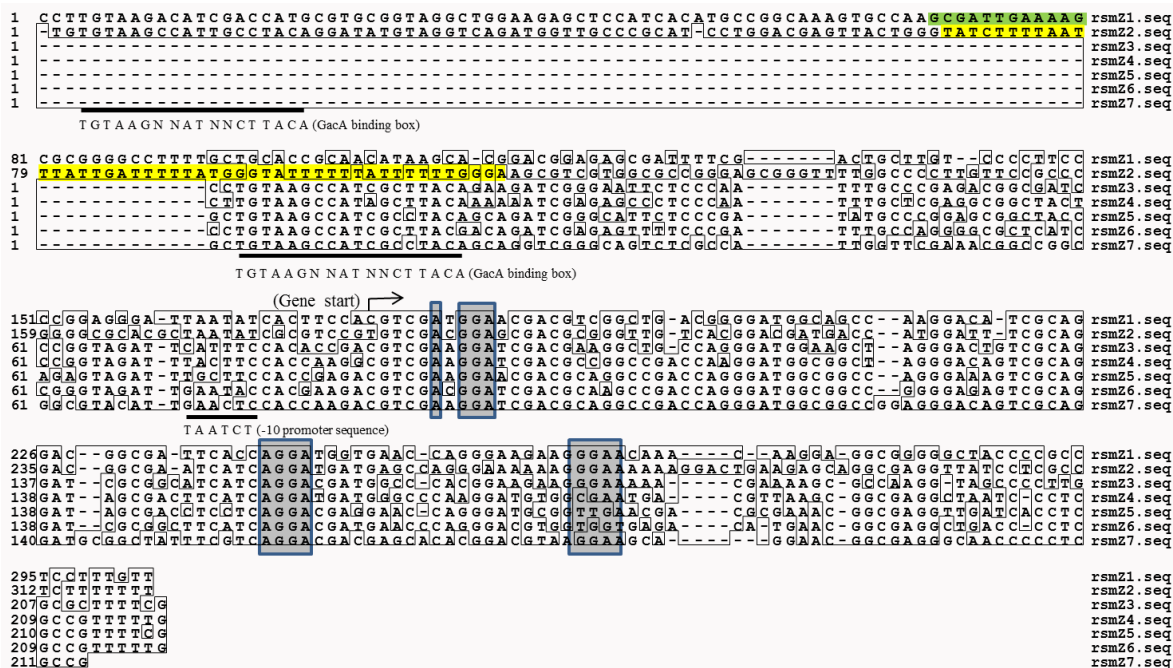


Fig.10.- Alineamiento de los sRNAs de la familia RsmZ. La caja de pegado a GacA esta subrayada en negro, los posibles sitios de unión para IHF y H-NS se encuentran señalados en verde y amarillo respectivamente.

## Evaluación de la expresión de los sRNAs *rsmZ1-7* en diferentes fuentes de carbono

En microorganismos como *E.coli* el sistema Csr controla el metabolismo carbonado y distintas fuentes de carbono modifican la expresión de los sRNA homólogos CsrB o CsrC. Así mismo, en *P. protegens*, el crecimiento bacteriano en presencia de intermediarios del ciclo de Krebs como succinato o malato promueve la expresión de los sRNAs-*rsm*. Por tanto, se exploró el efecto que tiene distintas fuentes de carbono en la expresión de los sRNAs-*rsmZ*. Para ello, las cepas de *A. vinelandii* conteniendo las fusiones de las regiones promotoras de los EZ1-7T y EYT se crecieron en medio mínimo adicionado con glucosa (BGluc) o fructosa (BFru) como fuentes de carbono glucolíticas, mientras que el succinato (BSuc) fue utilizado como fuente de carbono gluconeogénica (Fig. 11)

La expresión del promotor de los genes *rsmZ1-7* fue mayor en presencia de succinato que en las otras dos fuentes de carbono, glucosa o fructosa (fig. 11C). Independientemente de la fuente de carbono utilizada, la expresión de *rsmZ2*, *rsmZ6* y *rsmZ7* fue superior a los demás sRNAs del sistema; mientras que *rsmZ1* presentó el nivel de expresión más bajo. Interesantemente, los niveles de expresión de los sRNAs en fructosa y glucosa (Fig. 11 A y 11B) fueron diferentes, aunque estos substratos pueden producir una cantidad similar de metabolitos del ciclo de Krebs, presentándose una mayor expresión en presencia de fructosa que en glucosa. Este resultado sugiere la existencia de señales adicionales responsables del aumento de la expresión en dicha condición. Se utilizó como control

negativo la medición de la expresión del promotor de gen constitutivo *gyrA* que codifica para la DNA girasa de *A. vinelandii*; los resultados demuestran que la expresión del promotor es constante en las tres fuentes de carbono ensayadas (Fig. 11 D)

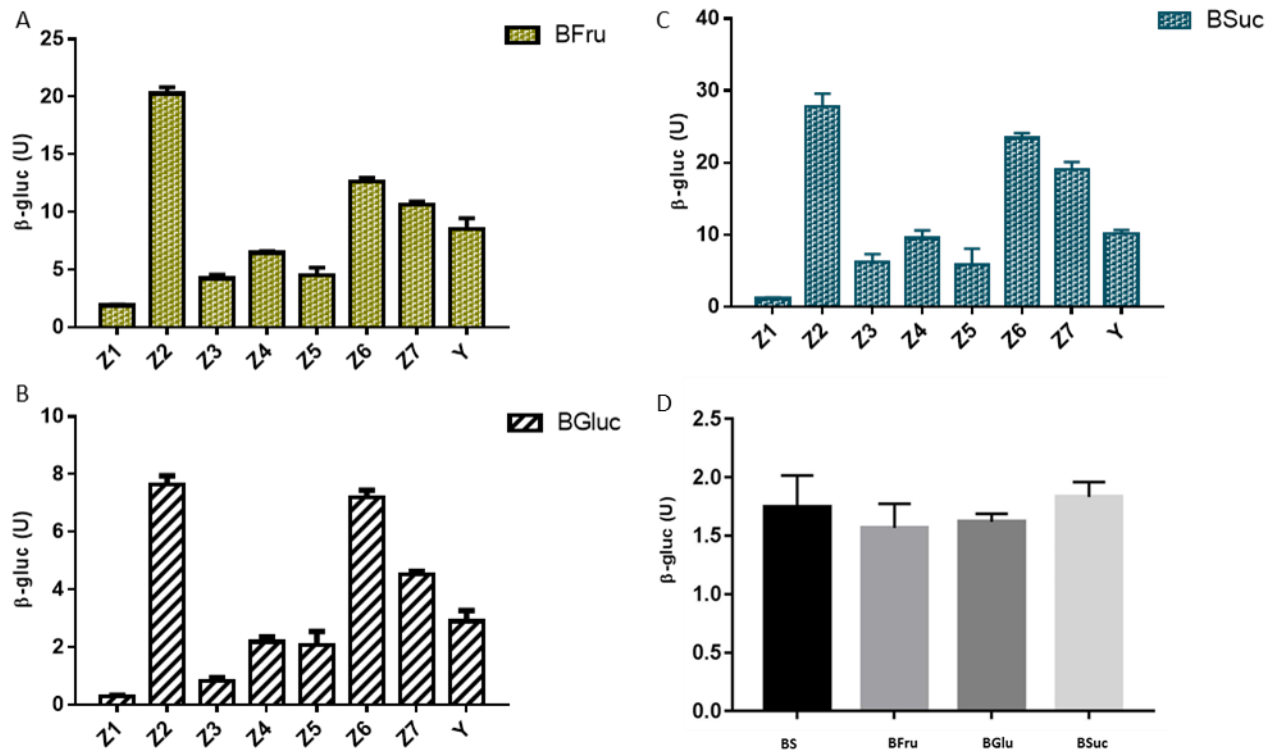


Fig. 11.-Medición de la expresión de los sRNAs *rsmZ1-7* de *A. vinelandii* en presencia de fuentes de carbono glucolíticas fructosa y glucosa (A y B respectivamente) y en una fuente de carbono gluconeogénica (C). Expresión del promotor *gyrA* en medio Burk's con fuente de carbono al 2%: sacarosa, fructosa, glucosa y succinato (D).

Otro de los efectos se analizó fue la expresión de los sRNAs en condición de adiazotofía. *A. vinelandii* es un microorganismo de vida libre y tiene la particularidad de fijar nitrógeno en condiciones aeróbicas por lo que ha sido un microorganismo modelo en el estudio de la regulación genética de la fijación de nitrógeno junto con *Klebsiella pneumoniae* desde los años 70's (Dixon et. al. 1978; Kennedy, 1978; Roberts et. al. 1978); Aunque los mecanismos por los cuales se regula la fijación de nitrógeno en estas dos bacterias poseen muchos elementos genéticos similares, la regulación por la que se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno es muy particular para cada uno de estos microorganismos (Klipp et. al. 2004). Se realizó la cuantificación de la actividad β-glucuronidasa de las fusiones transcripcionales EZ1-Z7T y EYT en medio rico PY el cual contiene peptona de caseína que le proporcionan al medio una fuente de efectiva de nitrógeno por lo que el microorganismo opta por la asimilación de esta fuente de nitrógeno y por lo tanto permite un crecimiento adiazotrófico. Interesantemente, la actividad de todos los sRNAs en esta condición se encuentra disminuida; sin embargo, debido a que el medio PY se desconoce la composición exacta de sus componentes, se realizó un experimento para comprobar que el efecto de represión observado es producido por la fuente de nitrógeno. Se midió la expresión de los sRNAs en

medio mínimo (BS) adicionado con amonio a una concentración 3mM, ya que se ha reportado que la nitrogenasa es completamente reprimida a concentraciones mayores de 30  $\mu$ M (Kleiner et. al. 1974). La expresión de los sRNAs en medio BS-NH4 es similar a la expresión en medio PY (Fig. 12), lo que sugiere que el amonio tiene un efecto de represión sobre la expresión de éstos sRNAs; de esta manera, el amonio podría estar funcionando como una molécula señal que permite la liberación de la proteína RsmA para actuar sobre los genes blancos de regulación relacionados con el crecimiento adiazotrofico. Sin embargo, El efecto observado no permite discernir si el efecto de represión por el amonio es por su participación como una molécula señal o bien, por consecuencia del cambio del estado fisiológico de la célula.

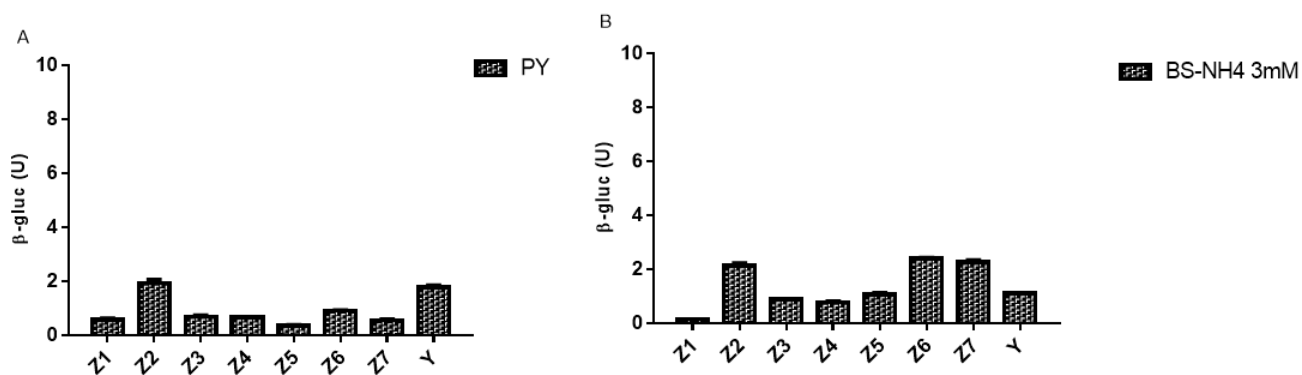


Fig. 12.- Efecto del amonio sobre la expresión de los sRNAs del sistema Rsm. Medición de la expresión glucuronidasa en medio rico PY adicionado con sacarosa al 2% y en medio mínimo adicionado con amonio 3mM, A y B respectivamente.

## Efecto de la mutación de los sRNAs *rsmZ1-7* sobre la producción de alginato

Mientras que la importancia de RsmZ1 y RsmZ2 en la producción de alginato ha sido previamente descrita, demostrando que en ausencia de RsmZ1 o RsmZ2, su síntesis disminuye un 70% (Manzo *et. al.* 2012). Se decidió medir el efecto sobre la producción de alginato de las mutaciones individuales para todos los elementos de la familia RsmZ3-7 para saber cuál es el efecto sobre la producción de alginato en presencia de las fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas anteriormente utilizadas para la medición de la expresión de dichos elementos reguladores.

Las mutantes de los genes individuales de los *rsmZ1-7* (*EZ1-7*) fueron crecidas en medio mínimo Burk en presencia de diferentes fuentes de carbono y se determinó la producción de alginato, donde la eliminación individual de los sRNAs del sistema no produce la abrogación total de la producción de alginato (Fig. 13). En glucosa, las mutantes *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4* y *rsmZ5* presentan un fenotipo parcial en la producción de alginato mientras que las mutaciones en *rsmZ3*, *rsmZ6* y *rsmZ7* no tienen efecto en la producción del polímero; mientras que en fructosa se observa un efecto positivo acentuado para estos sRNAs. Posiblemente el efecto positivo esté correlacionado con lo observado en la expresión de los sRNAs en esta fuente de carbono en el ensayo de expresión mostrado anteriormente. La pérdida de *rsmZ1* y *rsmZ4* inhibe casi por completo la producción de alginato, mientras que la ausencia de los demás sRNAs disminuye la producción de alginato de 3 a 5 veces (Fig.13).

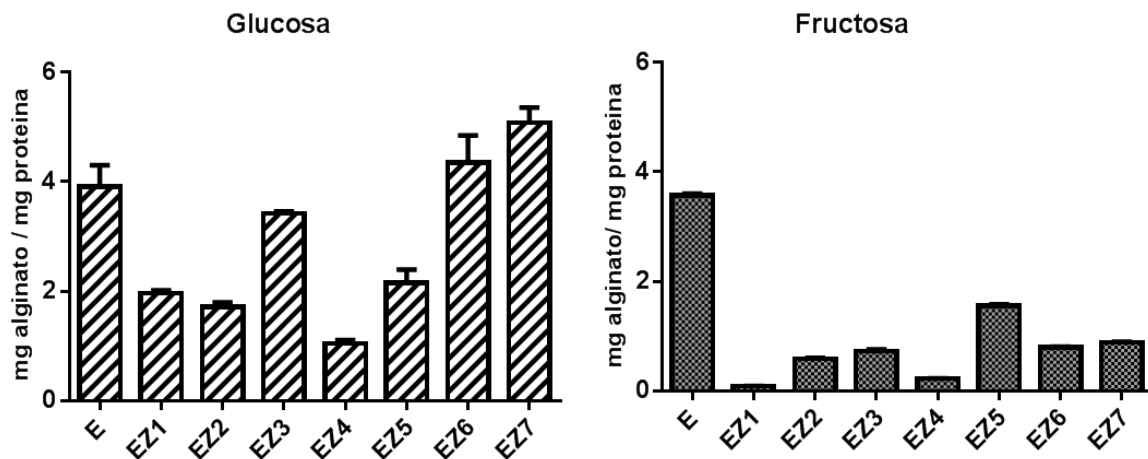


Fig. 13.- Efecto sobre la producción de alginato de las mutantes *rsmZ1-7* de *A. vinelandii* en medio Burk's adicionado con glucosa o fructosa al 2% (A y B respectivamente).

El efecto de las mutaciones individuales fue probado en succinato (Suc) como fuente de carbono; bajo esta condición, la pérdida de *rsmZ2* afecta completamente la producción de alginato, lo cual correlaciona con el grado de expresión de este RNA regulador en esta fuente de carbono. La ausencia de *rsmZ1* y *rsmZ4* disminuyó la producción del polímero 70 al 80 % respectivamente lo cual denota la importancia de estos sRNAs bajo esta condición

experimental. Finalmente, la ausencia de *rsmZ3*, *Z5*, *Z6* o *Z7* solo reduce la síntesis de alginato en un 25% sugiriendo una participación menor bajo esta condición de crecimiento (Fig. 14).

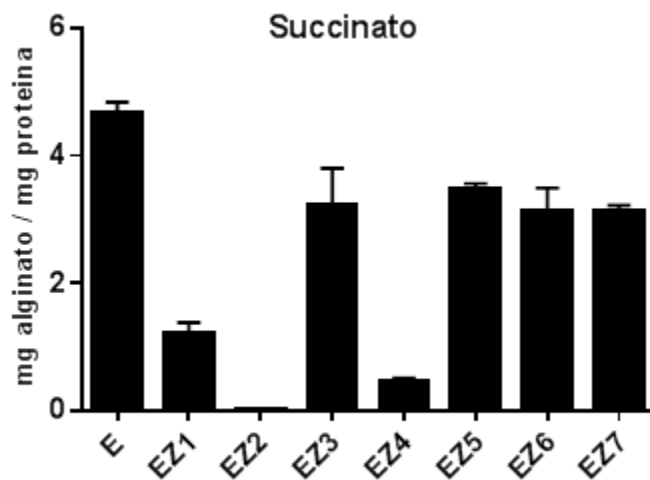


Fig. 14.- Cuantificación de la producción de alginato en presencia de succinato al 2% como fuente de carbono en las mutantes *ErsmZ1-Z7* de *A. vinelandii*.

## Efecto de los sRNAs RsmZ1-7 en la producción de alquilresorcinoles

En *A. vinelandii* la producción de alquilresorcinoles (ARs) es otro metabolito que está regulado por el sistema Gac-Rsm (Romero et al., 2016); estos compuestos aromáticos son producidos durante el proceso de diferenciación permitiendo la formación del quiste resistente a la desecación. Se ha descrito que *A. vinelandii* puede inducir la formación de quistes a través de la adición de n-butanol como única fuente de carbono por lo que decidimos explorar la expresión de los sRNAs *rsmZ1-7* bajo esta condición experimental. Tal como ocurrió en las demás fuentes de carbono, la expresión de los sRNAs es variable. Sin embargo, en esta condición *rsmZ2* presenta el máximo nivel de expresión, *rsmZ1* y *rsmZ5* presentan el menor nivel de expresión mientras que los demás sRNAs presentan una expresión similar (Fig. 15 A).

La producción de alquilresorcinoles fue determinada en las mutantes individuales de los sRNAs EZ1-7 y se pudo observar que el efecto de la mutación en el alelo *rsmZ1* produjo una reducción de la producción de alquilresorcinoles del 70%. Interesantemente, las mutantes *rsmZ2*, *rsmZ4* y *rsmZ5* resultaron en una reducción de la acumulación de ARs del 83 al 95%. Es notorio que, aunque la expresión de *rsmZ6* y *rsmZ7* bajo esta condición fue mayor que *rsmZ1*, la ausencia de *rsmZ1* produce un mayor efecto que la ausencia de *rsmZ6* y *rsmZ7* (Fig. 15 B).

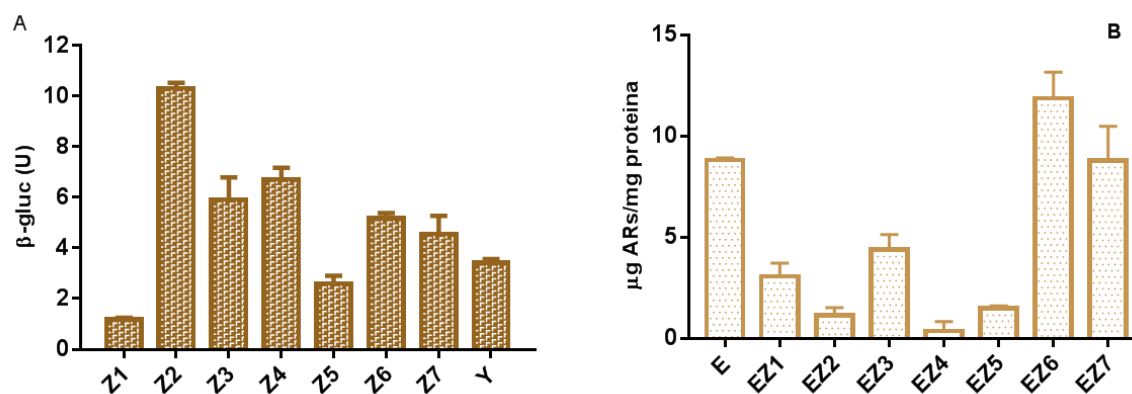


Fig. 15.- Efecto de la inducción del enquistamiento sobre la expresión de RsmZ1-7 y efecto de la mutación de los sRNAs *rsmZ1-7* (A y B respectivamente). La inducción del enquistamiento se realizó a través de la adición de butanol como única fuente de carbono en medio mínimo Burk's.



## Discusión

En el estudio realizado acerca de la regulación ejercida por los elementos sRNAs del sistema Rsm en *A. vinelandii* se observó que la expresión de los sRNAs de la familia RsmZ aumenta respecto al tiempo, teniendo un máximo en fase estacionaria (36 horas) como ha sido descrito para otras Pseudomonadaceas y a diferencia de lo que sucede con *rsmY*, la expresión alcanza su máximo de expresión a las 24 horas en fase estacionaria temprana y se mantiene a lo largo de la curva de crecimiento. En *P. protegens*, los sRNAs del sistema Rsm son expresados diferencialmente, *rsmZ* es transcrito principalmente en fase estacionaria tardía mientras que *rsmX* y *rsmY* son expresados paralelamente a través de la curva de crecimiento (Kay *et. al.* 2005).

La expresión de los sRNAs es muy variable en todas las fuentes de carbono ensayadas, tanto en las fuentes de carbono glucolíticas como en la gluconeogénica. Las diferencias en los niveles de expresión reflejan las diferencias que existen en sus regiones reguladoras, incluyendo la localización de la caja de pegado a GacA. Las regiones reguladoras de los sRNAs de la familia RsmZ pueden ser divididas en dos grupos: aquellos con una región reguladora larga (*rsmZ1* y *rsmZ2*) y los sRNAs con regiones reguladoras cortas (*rsmZ3-7*). Sin embargo, aunque las regiones reguladoras de *rsmZ1* y *rsmZ2* tienen una longitud muy parecida, las secuencias no están conservadas, lo cual podría explicar la diferencia en la expresión observada; en ambos casos las secuencias presentes entre la caja de unión a GacA y el inicio de transcripción se presenta un alto contenido en secuencias AT sugiriendo la unión de reguladores transcripcionales que presentan afinidad por estos sitios como son IHF (Avin\_15880) y H-NS (su homólogo en las Pseudomonadaceas MvaT encontrado en *A. vinelandii* DJ Avin\_38310). Utilizando las herramientas bioinformáticas Virtual Footprint-Prodoric y Softberry-BPROM se encontró un sitio putativo para IHF y H-NS en las regiones reguladoras de *rsmZ2* y *rsmZ1* respectivamente. Elementos similares se han descrito como reguladores de *rsmZ* en *Pseudomonas* spp. En *P. protegens*, IHF tiene la capacidad de unirse a la región reguladora de *rsmZ*, mientras que en *P. aeruginosa*, H-NS se une a una región rica en AT de la región reguladora de *rsmZ* reprimiendo su expresión.

Otro elemento que podría estar regulando la expresión de los elementos del sistema Rsm es la conservación de la caja de pegado a GacA (TGTAGGNNATNNCTTACA); como se muestra en la figura 10; excepto para *rsmZ1*, las regiones reguladoras de los demás genes *rsmZ* muestran una caja de pegado a GacA conservada. Puesto que *rsmZ1* muestra la caja de pegado a GacA menos conservada podría estar influyendo en su expresión ya que este elemento presenta poca actividad respecto a los otros elementos del sistema RsmZ, sugiriendo que la conservación de la caja de pegado a GacA podría ser uno de los elementos determinantes en el nivel de expresión de los sRNAs. Sin embargo, la expresión de los demás sRNAs (*rsmZ2-7*) es muy variable, lo cual implica que la caja de pegado a GacA es un elemento necesario, pero no suficiente para establecer la máxima expresión de los elementos del sistema.

Además de los elementos que pueden estar regulando a nivel transcripcional la expresión de los sRNAs, se exploró el efecto que tiene la fuente de carbono en la expresión

de los sRNAs del sistema, dos fuentes de carbono que utilizan la vía glucolítica para su metabolismo (glucosa y fructosa) y una utilizando la vía gluconeogénica (succinato). Se observó que, aunque la fructosa y glucosa siguen una vía glucolítica y pueden producir la misma cantidad de metabolitos del ciclo de Krebs, el resultado de la expresión de los sRNAs en fructosa sugiere la existencia de señales adicionales responsables del aumento de los niveles de expresión en *rsmZ1-7*. En *A. vinelandii* existen diferencias claras en el metabolismo de estas hexosas; la asimilación de glucosa es llevada a cabo por el transportador GluP y es oxidada a través de la vía Entner- Doudoroff (Quiroz et. al. 2017). En el caso de la fructosa, la presencia de los genes *fruA* (Avin\_RS05545), *fruB* (Avin\_RS005535) y *fruK* (Avin\_RS05530) en el genoma de varias cepas de *A. vinelandii* sugiere que, como en *Pseudomonas putida*, la fructosa es asimilada a través del sistema  $PTS^{Fru}$  (phosphoenolpyruvate: carbohydrate-phosphotransferase system por sus siglas en inglés) que, bajo la conversión a fructosa 1-6 bisfosfato sigue la vía glucolítica Embden-Meyerhof. Posiblemente las diferencias observadas en la expresión de los sRNAs *rsmZ1-7* y *rsmY* en presencia de glucosa o fructosa se deban principalmente a diferencias en la asimilación y metabolismo de estos azúcares. Adicionalmente, el sistema de asimilación  $PTS^{Fru}$  se ha demostrado que tiene funciones regulatorias; en *P. putida* el sistema  $PTS^{Fru}$  está relacionado al sistema  $PTS^{Ntr}$  (nitrogen non related PTS system), el cual es un sistema PTS no canónico reportado en varias Pseudomonadaceae ya que ha perdido la subunidad para el transporte de carbohidratos, por lo que este sistema no está implicado en el transporte de carbohidratos (Pflüger-Gra et. al. 2014). En *A. vinelandii* el sistema  $PTS^{Ntr}$  controla la producción de metabolitos secundarios como PHB y ARs. Además, la asimilación de fructosa por el sistema  $PTS^{Fru}$  genera fructosa-1-P, que es un efector negativo del regulador FruR/Cra. En *E. coli*, FruR/Cra controla un gran número de genes relacionados con el metabolismo de carbono; de una manera similar ocurre en *P. putida*. En *A. vinelandii* existen genes homólogos a los que codifican para el sistema FruR/Cra de *E. coli* que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de los sRNAs del sistema Rsm en respuesta al estado metabólico celular.

El efecto de las mutantes individuales de los sRNAs sobre la producción de los metabolitos alginato y alquilresorcinoles podría estar influenciada por la existencia de factores adicionales involucrados en las funciones reguladoras de estos elementos ya que no existe una correlación directa entre la expresión de los sRNAs y el fenotipo observado. Además, otra posibilidad en cuanto a los resultados obtenidos podría ser que las afinidades de los distintos sRNAs con la proteína RsmA sean variables como en *E. coli*, el homólogo funcional de RsmZ, CsrB y CsrC, tienen diferentes afinidades por la proteína CsrA. Finalmente, la estabilidad de cada uno de los sRNAs *rsmZ1-7* es otro factor que se necesita considerar para entender las diferencias funcionales. Los valores de  $\Delta G$  de los diferentes *rsmZ*-sRNAs en *A. vinelandii* tienen rangos entre -50.36 a -68.04 kcal/mol. El proceso de degradación enzimática podría estar afectando el recambio de los sRNAs. Los sitios de unión a la proteína RNasaE presentes en RsmZ de *Pseudomonas* spp. están conservados también en *A. vinelandii*, sugiriendo que su acumulación es influenciada también por este proceso. Por otra parte, en *P. protegens*, la interacción entre los sRNAs con la proteína RsmA previene su degradación enzimática; de manera similar en *P. aeruginosa*, la interacción

entre Hfq y RsmY lo protege de la degradación enzimática mediada por la RNasa E. Sin embargo, la existencia de estos mecanismos en *A. vinelandii* aún quedan por ser estudiados en investigaciones futuras.

Por otra parte, la presencia de amonio en el medio produce la represión de los sRNAs del sistema Rsm, podría ser un efecto de la fijación de nitrógeno o bien que a través de vías paralelas al sistema GacS/A se esté bloqueando la expresión de los sRNAs a través de la detección del amonio como molécula que reprime el sistema. Sin embargo, queda la posibilidad que una molécula señal intracelular sea detectada por algún mecanismo relacionado las pozas de carbono nitrógeno en la célula impidiendo la activación de los sRNAs del sistema.

# Caracterización funcional del gen *rsmY*

Cuando se predijeron bioinformáticamente los sRNAs de la familia *rsmY* en *A. vinelandii*, se describieron dos alelos *rsmY1* y *rsmY2*; posteriormente se realizó un análisis del contexto genómico donde se encontraron los dos alelos muy cercanos separados por 89 pb, mientras que *rsmY1* contenía una caja de pegado a GacA, *rsmY2* no poseía ninguna (Fig. 16). Se observó la expresión del gen *rsmY* al realizar ensayos tipo *Northern blot* en *A. vinelandii* cepa E, tomando como sonda al gen *rsmY1* originalmente reportado y se obtuvo una señal positiva de alrededor de 330 rb (ribobases); así mismo, se comprobó la dependencia de la proteína GacA para su expresión (Terán 2011). En la cepa *A. vinelandii* DJ no productora de alginato, se determinó la presencia de esta unidad transcripcional a través de un estudio de transcripción reversa (Hernández et. al. 2012).

Aunque se ha descrito la presencia de RsmY como una unidad transcripcional individual, los genes *rsmY1* y *rsmY2* poseen un terminador independiente de la proteína Rho lo que podría sugerir la existencia de la transcripción de dos productos, un producto corto de la transcripción del gen *rsmY1* y uno largo producto *rsmY1Y2*, por lo que se decidió realizar el estudio de complementación genética para caracterizar la funcionalidad de los posibles productos genéticos.

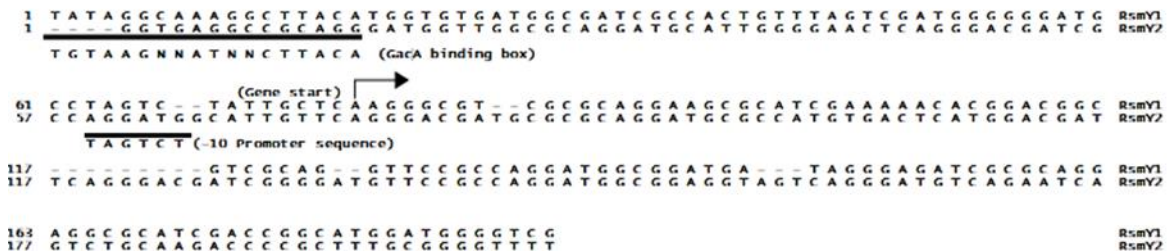


Fig. 16.- Alineamiento de los sRNAs RsmY1 y RsmY2. La caja de unión a GacA se encuentra subrayada en negro, la caja -10 del promotor se encuentra indicada junto con el inicio de la transcripción putativo señalado con una flecha negra.

Como se mostró en el apartado anterior, en cuanto a la expresión del gen *rsmY*, la actividad del promotor alcanza su máxima expresión cuando el cultivo entra en fase estacionaria temprana a diferencia de los sRNAs de la familia RsmZ. En *P. protegens* la ausencia de *rsmZ* resulta en una sobreexpresión del alelo *rsmY* produciendo un fenómeno de compensación (Kay et. al. 2015) por lo que se exploró si sucedía el mismo fenómeno en *A. vinelandii*. Para llevar a cabo este objetivo se midió la actividad del promotor de *rsmZ1* y *rsmY* en cepas mutantes *rsmY* (Z1-DY) y *rsmZ1* (Y-DZ1) respectivamente; al medir la expresión se observó un efecto similar al reportado en *P. protegens*, en ausencia de *rsmY*, el resultado es un ligero aumento de la expresión de *rsmZ1* y en el caso contrario, en ausencia de *rsmZ1* la actividad de *rsmY* aumenta a más del doble de su actividad bajo esta condición de crecimiento lo que denota la importancia de *rsmZ1* en las actividades celulares de *A. vinelandii* (Fig. 17).

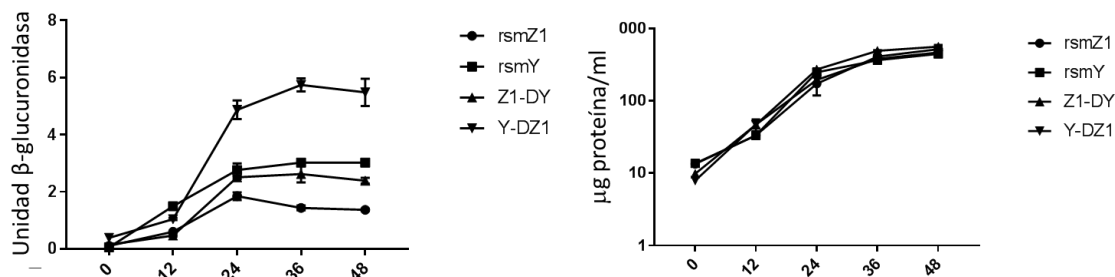


Fig. 17.-Efecto de compensación de *rsmZ1* y *rsmY* de *A. vinelandii*. En la imagen de la izquierda, la medición de la actividad del promotor de *rsmZ1* y *rsmY* en cepas con la delección *rsmY* (Z1-DY) y *rsmZ1* (Y-DZ1) respectivamente se utilizó medio Burk's-sacarosa al 2% para el crecimiento). El crecimiento celular se estimó de manera indirecta a través de la medición de proteína (derecha).

Se realizó la medición de la expresión de *rsmY* en diferentes fuentes carbono, una fuente de carbono glucolítica (glucosa y fructosa) o una fuente de carbono gluconeogénica (succinato) y en presencia de butanol como única fuente de carbono (Fig. 18).

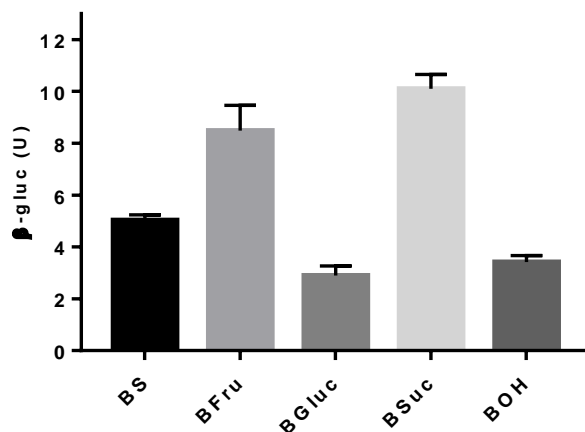


Fig. 18.- Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de *rsmY* en *A. vinelandii* cepa E. Las mediciones fueron realizadas por triplicado a las 48 horas en fase estacionaria con 2% de la fuente de carbono sacarosa, fructosa, glucosa, succinato (BS, BFru, BGluc, BSuc respectivamente), excepto para Burk's butanol (BOH) condición en la que realizó la cuantificación posterior a los cinco días de incubación.

Se ha reportado que la producción de alginato es regulada a nivel post-transcripcional por los sRNAs RsmZ1 y RsmZ2 (Manzo et. al. 2012) por lo que, para establecer el papel del gen *rsmY* en la síntesis de alginato y evidenciar si *rsmY* constituye únicamente una unidad transcripcional se obtuvieron dos mutantes en la cepa E de *A. vinelandii*: la primera con la remoción del gen *rsmY1* (EY1) y la segunda donde se realiza la remoción de los dos genes *rsmY1* y *rsmY2* (EY1Y2). El fenotipo obtenido fue una disminución en la producción de alginato en ambas mutantes comparada con la cepa silvestre, lo que era de esperarse ya que se realizó la remoción del gen *rsmY1* y su región reguladora para ambos casos. Posteriormente se realizó un ensayo de complementación genética, utilizando las construcciones previamente generadas por Mena en el 2015; una con el locus *rsmY1Y2* más su región reguladora (782 pb) y otra conteniendo solamente el locus *rsmY1* (349 pb) más su

región reguladora. Con este análisis se demuestra que sólo la complementación que lleva la región Y1Y2 restaura la producción de alginato, mientras que el locus que contiene la región Y1 fue incapaz de complementar las mutaciones en EY1 y EY1Y2 (Fig. 19). Por los que los datos obtenidos anteriormente confirman que la región Y1 y Y2 constituyen un solo gen que fue renombrado como *rsmY*.

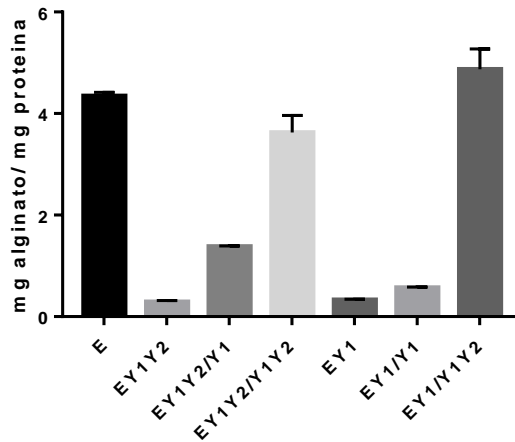


Fig. 19.- Efecto de la mutación *rsmY1Y2* (E-Y1Y2) y *rsmY1* (E-Y1) sobre la producción de alginato en medio Burk's sacarosa al 2% en fase estacionaria de crecimiento (48 horas) y las cepas complementadas EY1/ *rsmY1*, EY1/Y1Y2, EY1Y2/Y1 y EY1Y2/Y1Y2.

En *A. vineladii* se ha demostrado que la expresión del gen *algD* está regulada por la proteína GacA, sin embargo, hasta ahora los únicos blancos directos de esta proteína son los sRNAs del sistema Rsm por lo que se probó el papel de *rsmY* sobre la expresión del gen *algD*, se generó una fusión traduccional con el gen reportero *gusA* dependiente de la región promotora del gen *algD* y se midió la actividad del reportero en la mutante del gen *rsmY*. Como se esperaba, bajo la pérdida del alelo *rsmY* hay una disminución de la expresión del promotor del gen *algD* (Fig. 20).

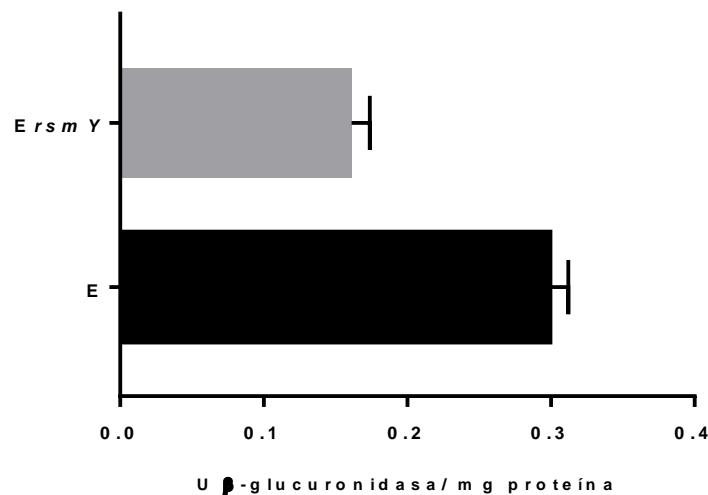


Fig. 20.- Efecto de la mutación del gen *rsmY* sobre la expresión del gen *algD*. Actividad glucuronidasa en la cepa silvestre E y una mutante en el alelo *rsmY* (*ErsmY*).

RsmZ1 controla la producción de alquilresorcinolos (ARs) en la cepa SW de *A. vinelandii* (una cepa derivada de la cepa no mucoide DJ) (Romero et al. 2016). Para saber si RsmY tiene un papel similar en la producción de ARs en la cepa E de *A. vinelandii* se midió la producción de estos lípidos fenólicos en las cepas mutantes *rsmZ1* y *rsmY* (Fig. 21). Interesantemente encontramos que la mutación en *rsmZ1* produce un menor efecto en la producción de ARs en *A. vinelandii* respecto a lo reportado en la cepa SW. Así mismo, la mutación en *rsmY* disminuye la producción de ARs drásticamente en comparación con lo reportado para la mutante *rsmZ1*. Se obtuvieron resultados similares a los vistos para alginato, en los que solo las cepas complementadas con el gen completo *rsmY1Y2* complementan la función del alelo mutado *rsmY1* y *rsmY1Y2* (Fig. 21).

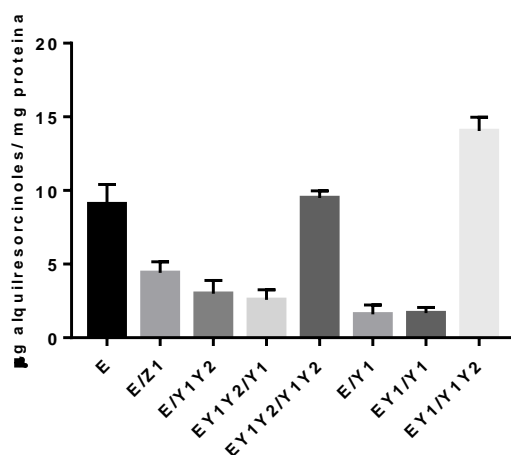


Fig. 21.- Producción de alquilresorcinolos en las cepas mutantes en *Ers*mZ1 (E/Z1), *Ers*mY1Y2 (E/Y1Y2), *Ers*mY1(E/Y1) y las cepas complementadas EY1/Y1, EY1/Y1Y2, EY1Y2/Y1 y EY1Y2/Y1Y2. Medición realizada en medio Burk's -butanol a los 5 días de incubación.

## Discusión

De acuerdo a lo encontrado en la cepa E de *A. vinelandii* junto con lo reportado por Hernández -Eligio en el 2012 en la cepa DJ, *rsmY* es un solo gen de 337 rb compuesto por los dos alelos *rsmY1* y *rsmY2* reportados previamente por la base de datos Rfam (Kalvari et. al. 2017). Aunque ambos genes poseen un terminador independiente de la proteína Rho, solo *rsmY1* tiene la caja -10 de la región promotora conservada descrita en los genes que codifican para los sRNAs en las Pseudomonadaceas (TAATCT) (Humair et. al. 2010); así mismo, únicamente *rsmY1* posee la caja de unión al activador transcripcional GacA. La existencia de los terminadores Rho independiente sugiere la existencia de la transcripción de dos productos, uno corto conteniendo el alelo *rsmY1* y uno largo conteniendo el alelo *rsmY1Y2*. Bajo las condiciones probadas, solo se detectó el alelo largo, además solamente éste alelo pudo complementar las dos mutantes generadas EY1 y EY1Y2. Sin embargo, podría existir un alelo corto bajo condiciones aún no probadas.

En *A. vinelandii* la presencia de un sRNA largo como RsmY podría tener varias consecuencias; usualmente los sRNAs en las *Pseudomonas spp*, tienen de tres a cuatro tallos y asas con motivos GGA, mientras que RsmY posee dos veces más de estas estructuras las cuales pueden interactuar con el doble de moléculas de la proteína RsmA y de esta manera tener un mayor efecto en cuanto a los genes regulados por el sistema. Otra característica interesante podría ser su estabilidad ya que en enterobacterias, CsrB y CsrC son más largos que los de la familia Rsm de *Pseudomonas spp* y tienen una mayor estabilidad termodinámica, sin embargo tienen una vida más corta mediada por CsrD en comparación con los sRNAs del sistema Rsm, puesto que en estos organismos no está presente la proteína CsrD, se puede predecir una mayor estabilidad para RsmY lo que podría aumentar su vida media y por lo tanto su capacidad de interactuar con la proteína RsmA. En *A. vinelandii* no existe un alelo homólogo a *csrD*, por lo que RsmY podría ser un RNA largo, con varios sitios de unión a RsmA con una estabilidad mayor.

Recientemente se reportó la participación de *rsmZ1* en la producción de ARs en la cepa SW de *A. vinelandii* (una cepa derivada de la DJ). El efecto de la mutación del gen *rsmY* en la cepa DJ fue parcial comparado con la mutante *rsmZ1* reportada anteriormente (Mena 2015). Interesantemente, en la cepa silvestre E, productora de alginato, el efecto de la mutación en el alelo *rsmY* es mayor que el efecto de *rsmZ1*, lo cual sugiere la existencia de procesos regulados dependientes en la cepa. Por otra parte, algunas de las diferencias entre ambas cepas han sido descritas anteriormente; en la cepa E y ATCC 9046, la proteína GacA controla directamente la expresión de *rpoS* (Castañeda et. al. 2001) y este regulador controla a su vez a nivel transcripcional a la proteína RsmA (Quiroz-Rocha et. al 2017), mientras que en las cepas no productoras de alginato no sucede de la misma manera (Romero et. al. 2016).

Otro polímero controlado por el sistema GacS/A-Rsm es el PHB; sin embargo, la mutación de *rsmY* en la cepa DJ no refleja diferencias en la acumulación de este polímero en dicha



cepa (Mena 2015). Se han descrito diferencias funcionales entre los diferentes miembros del sistema Rsm, en los que se ha propuesto que éstos pueden tener papeles aditivos, redundantes o independientes, por lo que es posible explicar el efecto diferencial de *rsmY* sobre la producción de alginato y ARs, no siendo así para la producción de PHB. En *P. aeruginosa*, la sobreexpresión de *rsmZ*, pero no de *rsmY* afecta la producción de biopelícula (Petrova *et. al.* 2010). Así mismo, es necesaria la función aditiva de los tres sRNAs, RsmX, RsmY y RsmZ para tener una producción óptima de HCN y exproteasas en *P. protegens* (Kay *et. al.* 2005).

Finalmente, en *P. aeruginosa*, se ha demostrado que existe una cascada de regulación paralela al sistema GacS/A que regula diferencialmente la expresión de *rsmY*, la proteína RetS que tiene un efecto represor sobre el sistema GacS/A controlando la cascada de señalización que activa una proteína conteniendo un dominio Hpt soluble, HptB, de esta manera tiene la capacidad de activar una cascada de señalización independiente de la proteína GacA. En *A. vinelandii* están presentes proteínas homólogas a RetS y HptB, por tanto, queda estudiar el papel que desempeñan estas proteínas respecto a la regulación de *rsmY* en este microorganismo.

# La mutación del gen *rsmA* afecta la expresión del gen *algD* a nivel transcripcional y post-transcripcional en cepas de *A. vinelandii* no productoras de alginato con actividad parcial de la proteína GDP-manosa deshidrogenasa

*A. vinelandii* tiene la capacidad de producir al menos dos polímeros de interés industrial, el alginato y PHB. La expresión del gen *algD* es un paso clave en la producción de alginato y se encuentra bajo el control positivo sistema GacS/A que activa la expresión de los sRNAs del sistema Rsm regulando la función de la proteína represora RsmA que, a su vez controla post-transcripcionalmente la estabilidad del RNA mensajero blanco de regulación. Se ha demostrado la unión de RsmA a la región líder del transcrito del gen *algD* (Manzo et. al. 2012). Sin embargo, no se ha demostrado el efecto de RsmA sobre la expresión del gen *algD* *in vivo* por lo que se decidió realizar un estudio del efecto que tiene la mutación del gen *rsmA* sobre el blanco de regulación *algD*.

En estudios previos se ha demostrado la esencialidad de la proteína RsmA, en *E. coli* durante el crecimiento en fuentes de carbono glucolíticas la ausencia de RsmA permite la acumulación de la fuente de carbono en forma de glucógeno e impide el flujo de carbono hacia las vías glucolíticas y ciclo de Krebs lo que lleva a la muerte al microorganismo en esta condición de crecimiento. Sin embargo, es posible obtener la mutación nula de este gen en fuentes de carbono gluconeogénicas como succinato (Timmermans y Melderer 2009).

En el mismo trabajo fue demostrado que la mutante *csrA* generada a través de la inserción de un transposón en el extremo carboxilo terminal en el codón 51 produce una mutación de la proteína CsrA con actividad parcial y un péptido con la región de aminoácidos CsrA 1-50 es parcialmente activo, con la capacidad de restaurar el crecimiento de mutantes nulas *csrA* en fuentes de carbono glucolíticas (Timmermans y Melderer 2009).

En estudios realizados en la cepa ATCC 9027 de *A. vinelandii* se ha reportado que la mutación en *rsmA* es deletérea (Manzo et al., 2011); ya que, dada la capacidad de este microorganismo para poseer hasta 80 copias de su cromosoma, las mutantes generadas siempre son merodiploides, es decir, poseen el alelo silvestre junto con el mutante.

Tomando como antecedentes la esencialidad de CsrA en *E. coli* en fuentes de carbono glucolíticas y la utilización de una proteína con actividad parcial para la obtención de mutantes nulas, se realizó una mutación por inserción en el gen *rsmA* en el aminoácido 51 del extremo carboxilo terminal de la proteína (*rsmACT*) y otra construcción por remoción del gen *rsmA* que generaría mutaciones nulas del gen en *A. vinelandii* (Manzo et. al. 2012). Ambas mutaciones se realizaron en un fondo genético que posee una disminución en la producción de alginato por tener una inactivación parcial del gen *algD* (EA2, Campos et al. 1996), ya que se ha propuesto que en cepas productoras de alginato no se puede obtener mutantes nulas *rsmA* (Morales Sandoval 2014) crecidas en una fuente de carbono glucolítica, dado que el exceso de fuente carbono es almacenado en PHB o bien, es canalizado hacia la producción de alginato análogamente como sucede en *E. coli* en el

almacenamiento de la fuente de carbono en glucógeno impidiendo la utilización de la fuente de carbono para la producción de cofactores reducidos para la generación de energía y el uso de vías alternas en el ciclo de Krebs para el funcionamiento celular.

En la cepa mutante *rsmACT* en el fondo genético A2 (*A2rsmACT*) no se detectaron copias silvestres del gen *rsmA* en contraste con mutantes generadas en el fondo silvestre E, donde se puede observar copias silvestres indicando que la mutación no puede ser segregada en todas las copias del genoma de este microorganismo (Fig. 22). Se midió la producción de alginato en la mutante *A2rsmACT* y se comparó con el de la cepa silvestre, obteniendo un incremento de cinco veces en la cepa *AErsmACT* respecto a la producción de la cepa silvestre (Fig. 23)

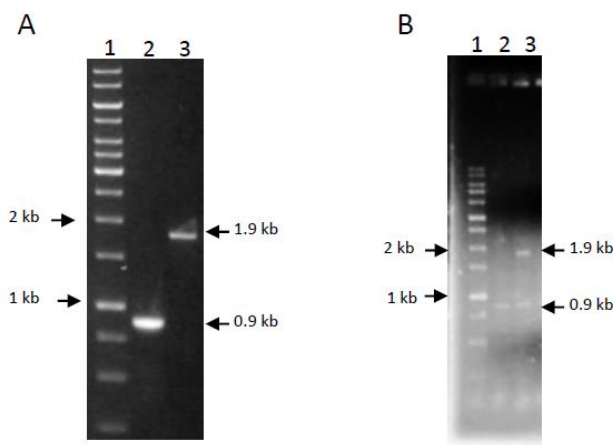


Fig. 22.- PCR de las mutantes del extremo carboxilo terminal de *rsmA* en los fondos genéticos A2 y E de *A. vinelandii*. A la izquierda la PCR de la cepa A2, cepa silvestre y mutante en *rsmACT* (carriles 2A, 3A) y a la derecha cepa E y mutante *rsmACT* (carriles 2B y 3B).

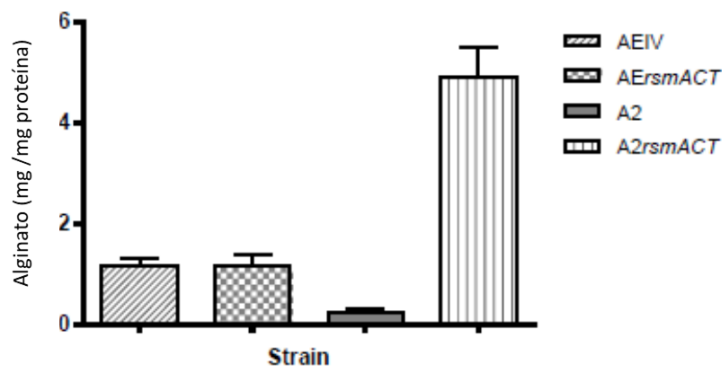


Fig. 23.- producción de alginato en cepas de *A. vinelandii* AEIV, *AErsmACT*, A2, y *A2rsmACT*. La producción de alginato se midió a las 48 horas de crecimiento en medio Burk's sacarosa.

Una vez estudiado el efecto de la mutación del gen *rsmA* sobre la producción de alginato, se determinó si la mutación tenía un efecto similar sobre la expresión del gen *algD*, puesto que la cepa A2 tiene una mutación por inserción generada por el transposón *miniTn5/lacZ* lo que genera al mismo tiempo la fusión del gen con el gen reportero *lacZ* dependiente del

promotor *algD*. La actividad de la fusión transcripcional aumenta al menos cuatro veces a lo largo de la curva de crecimiento haciéndose notar un efecto más pronunciado durante la fase de crecimiento exponencial en la mutante *rsmA* cuando se compara con la cepa parental A2 (Fig. 24).

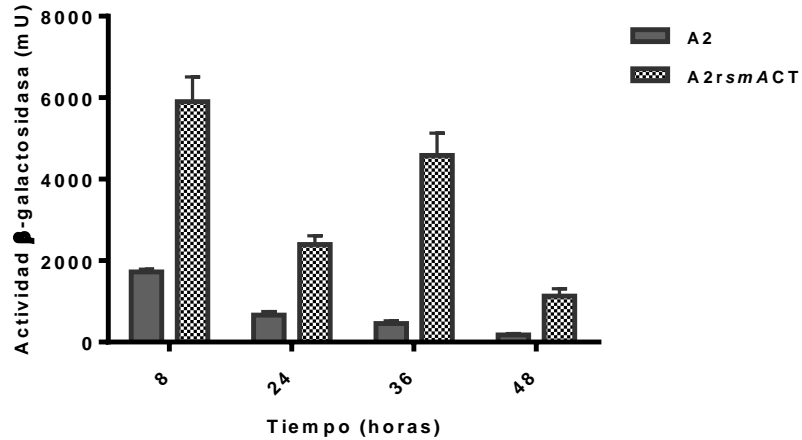


Fig. 24.- Expresión del gen *algD* en la fusión transcripcional cromosomal con el gen reportero *lacZ*.

Así mismo, se utilizó una cepa generada en estudios previos con un interposón de resistencia a gentamicina, que contiene un gen reportero *gusA* insertado en el gen *algD* con lo que se generó la fusión traduccional llamada *AED-gusA* (García 2018). Con la finalidad de determinar el efecto de la proteína RsmA sobre la expresión del gen *algD* a nivel traduccional, la mutación *rsmACT* fue transferida a la cepa *algD-gusA* generando la cepa *AED-gusArsmACT*. La segregación del gen *rsmA* en todos los cromosomas fue confirmada por PCR. De la cuantificación  $\beta$ -glucuronidasa se obtuvo un máximo de expresión en la fase exponencial de crecimiento en la cepa silvestre *AED-gusA*, mientras que fue decreciendo en la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 25).

En contraste, con la cepa *AED-gusArsmACT*, donde la traducción del gen *algD* es observada a lo largo de toda la curva de crecimiento, siendo más pronunciada en la fase estacionaria de crecimiento; por lo que con estos resultados se confirman el efecto negativo de RsmA sobre la traducción del gen *algD*.

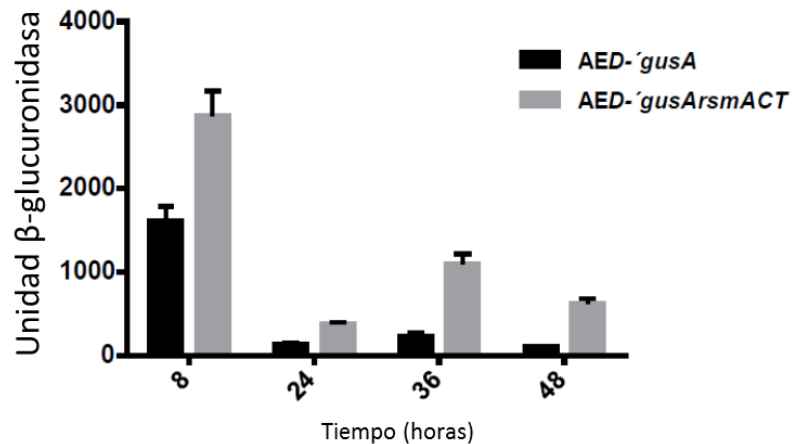


Fig. 25.- Efecto de la mutación del gen *rsmACT* sobre la expresión del gen *algD* en una fusión traduccional AED-*gusA*.

Finalmente, se ha reportado que las mutaciones que generan la pérdida de la producción de alginato producen un efecto positivo en la acumulación de PHB (Martínez et. al. 1997; Segura et. al. 2003). Así mismo es conocido que la proteína RsmA controla negativamente la expresión del activador transcripcional *phbR*, activador del operón biosintético *phbBAC* encargado de sintetizar las enzimas para la producción de PHB (Hernández-Eligio et. al. 2012). Se exploró si la mutante de *rsmA* generada en el fondo genético no mucóide podría favorecer la producción de PHB. Ya que en *A. vinelandii* la acumulación de PHB es fácilmente visualizada a través del crecimiento en medio sólido PY adicionado con 2% de sacarosa, correlacionando con el fenotipo de opacidad del crecimiento. La opacidad de las colonias que tienen la mutación en el gen *algD* es mayor a la de la cepa parental E, mientras que la opacidad en generada por la mutante *rsmACT* en el fondo *algD* es más pronunciada, sugiriendo el aumento de la acumulación del PHB en esta cepa (Fig. 26).



Fig. 26.- Efecto de la mutación *rsmACT* sobre la producción de alginato. La producción de PHB puede ser visualizada por la opacidad producida en la placa.

## Discusión

En un reporte previo se estableció el papel sobre la regulación de la producción de alginato de los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* en *A. vinelandii*. La inactivación de estos dos alelos produce la reducción de la producción de alginato, mientras que la sobreexpresión de RsmA disminuye la síntesis del polímero. (Manzo et. al. 2012). Así mismo, la obtención de mutantes merodiploides recuperadas constantemente en los experimentos de mutagénesis en cepas de *A. vinelandii* productoras de alginato sugieren un papel esencial de RsmA en el crecimiento bacteriano.

En el presente trabajo se generaron mutantes en el extremo carboxilo terminal de la proteína RsmA en fondos genéticos con disminución o incapacidad en la producción de alginato. Estos resultados implican que la producción de alginato es uno de los factores que

impiden la obtención de mutantes nulas de RsmA. Sin embargo, defectos de crecimiento son observados en las mutantes *rsmACT* generadas cuando se comparan con las cepas parentales correspondientes, sugiriendo funciones adicionales de esta proteína sobre el metabolismo de *A. vinelandii*. Las mutantes generadas en este trabajo pueden ser útiles para establecer el regulón RsmA en *A. vinelandii* con el objetivo de identificar vías metabólicas o procesos celulares bajo el control de esta proteína.

Existen evidencias que indican que la proteína RsmA es capaz de unirse *in vitro* a la región 5' no-traducible (UTR por sus siglas en inglés) del RNA mensajero del gen *algD*. Sin embargo, era necesario demostrar el efecto regulador que tiene esta proteína *in vivo* sobre la expresión del gen de interés. Nuestros resultados indican que RsmA inhibe la actividad de la fusión transcripcional *algD-lacZ* presente en la cepa A2; este resultado puede ser explicado como un efecto indirecto ejercido por RsmA sobre el transcrito del gen *algD*. Sin embargo, en estudios anteriores, la sobreexpresión de *rsmA* produce la represión de la transcripción del gen *algD* de regulación en un ensayo realizado con una fusión cromosomal transcripcional (García 2016). Se ha reportado que cuando RsmA se une a la región UTR del RNAm blanco bloquea el sitio de unión al ribosoma previniendo su traducción y promoviendo la degradación (Timmermans y Van Melderen 2010; Dus et. al. 2014). En ensayos de estabilidad del mensajero del gen *algD*, se ha podido observar un aumento de solo el doble en la estabilidad en la mutante A2 (datos no publicados) mientras que en otros blancos de regulación como *phbR* y *phbB* se ha descrito un aumento en la estabilidad de estos mensajeros que va de dos a tres veces con respecto a la cepa silvestre en mutantes *rsmA* (Hernández et. al. 2012).

Lo descrito anteriormente nos hace hipotetizar que la regulación ejercida por la proteína RsmA no solamente es a nivel post-transcripcional, sino también a nivel transcripcional de manera indirecta a través de la desestabilización de un regulador transcripcional del gen *algD* aún no descrito. Para poder discernir ante el efecto de la mutación del regulador RsmA a nivel transcripcional y/o post-transcripcional sería necesario una fusión transcripcional que no tuviera la secuencia Shine-Dalgarno (SD) ya que, por el diseño experimental en este estudio, la fusión cromosomal transcripcional posee la secuencia SD del gen *algD* y del gen reportero *gusA*.

En *A. vinelandii* DJ se ha demostrado que la mutación sobre el gen *algU* que codifica para el factor alternativo  $\sigma^E$  es necesario para la activación de los promotores *algCp1* y *algDp2* lo que da como resultado la pérdida de la producción de alginato que al mismo tiempo tiene un efecto positivo sobre la producción de PHB (Segura et. al 2003). Se encontró el mismo efecto en las mutantes *algD* donde la mutación en *rsmA* produce un aumento en la producción de PHB.

Es posible que el sistema de regulación post-transcripcional Rsm favorezca la síntesis de alginato sobre la producción de PHB permitiendo la expresión de los genes biosintéticos que controlan la síntesis de alginato y dirigiendo el flujo de carbono hacia la producción del polisacárido a través de mecanismos que aún necesitan ser explorados.

En concordancia con lo anterior, la mutante AEIV *gacA*, que pierde la capacidad de transcribir a los sRNAs del sistema Rsm y como consecuencia presenta una actividad aumentada del represor RsmA y el abatimiento de la producción de PHB (Manzo et. al.

2011), mientras que la sobreexpresión del gen *rsmZ1* en este fondo genético presenta la recuperación de la producción de alginato, pero no la de PHB (datos no publicados) evidenciando la participación de otros reguladores del sistema hasta ahora no encontrados.

# Anexos

## Anexo I. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepas o plásmidos	Descripción	Referencia o fuente
<b>Cepas de <i>A. vinelandii</i></b>		
E	Cepa silvestre mucoide, también llamada AIEV	Larsen & Haug 1971
AEΔD	Derivada de la cepa E con una mutación por inserción/remoción $\Delta algD::Km$	Sandoval 2014
A2	AEIV con una mutación por inserción en $algD::miniTn5lacZ$ en el extremo 3'	Campos et. al. 1996
AED- <i>gusA</i>	Cepa E con una fusión traduccional $algD-gusA$	García 2016
AED- <i>gusA</i>	Cepa E con una fusión transcripcional $algD-gusA$	García 2016
EZ1	E con una mutación por remoción de <i>rsmZ1</i>	Velázquez 2008
EZ2	E con una mutación por remoción de Z2	Tzontecomani 2010
EZ3	E con una mutación por remoción de <i>rsmZ3</i>	Domínguez 2011
EZ4	E con una mutación por remoción de <i>rsmZ4</i>	Cruz 2013
EZ5	E con una mutación por remoción de <i>rsmZ5</i>	López 2012
EZ6	E con una mutación por remoción de <i>rsmZ6</i>	García 2011
EZ7	E con una mutación por remoción de <i>rsmZ7</i>	García 2011
EZ1T	E con una fusión transcripcional $rsmZ1-gusA$	Este estudio
EZ2T	E con una fusión transcripcional $rsmZ2-gusA$	Este estudio



EZ3T	E con una fusión transcripcional <i>rsmZ3-gusA</i>	Este estudio
EZ4T	E con una fusión transcripcional <i>rsmZ4-gusA</i>	Este estudio
EZ5T	E con una fusión transcripcional <i>rsmZ5-gusA</i>	Este estudio
EZ6T	E con una fusión transcripcional <i>rsmZ6-gusA</i>	Este estudio
EZ7T	E con una fusión transcripcional <i>rsmZ7-gusA</i>	Este estudio
EYT	E con una fusión transcripcional <i>rsmY-gusA</i>	Este estudio
EgyrAT	E con una fusión transcripcional <i>PgyrA-gusA</i>	Este estudio
EΔ <i>rsmY1</i>	Cepa mutante en el alelo <i>rsmY1</i> derivada de la cepa E	Este estudio
EΔ <i>rsmY1Y2</i>	Cepa mutante en el alelo <i>rsmY1Y2</i> derivada de la cepa E	Este estudio
EΔ <i>rsmY1/melA::rsmY1</i>	Cepa con una remoción del gen <i>rsmY1</i> complementada con pUMAT <i>crsmY1</i>	Este estudio
EΔ <i>rsmY1Y2/melA::rsmY1</i>	Cepa con una remoción del gen <i>rsmY1Y2</i> complementada con pUMAT <i>crsmY1</i>	Este estudio
EΔ <i>rsmY1/melA::rsmY1Y2</i>	Cepa con una remoción del gen <i>rsmY1</i> complementada con pUMAT <i>crsmY1Y2</i>	Este estudio
EΔ <i>rsmY1Y2/melA::rsmY1Y2</i>	Cepa con una remoción del gen <i>rsmY1Y2</i> complementada con pUMAT <i>crsmY1Y2</i>	Este estudio
AE <i>rsmACT</i>	Cepa derivada de la E mutante en <i>rsmACT</i>	Este estudio
AEΔ <i>rsmACT</i>	Cepa derivada de la AEΔD mutante en <i>rsmACT</i>	Este estudio
A2 <i>rsmACT</i>	Cepa derivada de la A2 mutante en <i>rsmACT</i>	Este estudio

AED- <i>gusArsmACT</i>	Cepa con la fusión transcripcional AED- <i>gusA</i> con la mutación en el gen <i>rsmACT</i>	Este estudio
AED-' <i>gusArsmACT</i>	Cepa con la fusión traduccional AED- <i>gusA</i> con la mutación en el gen <i>rsmACT</i>	Este estudio
<b>Cepas de <i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	supE44 DlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Invitrogen
<b>Plásmidos</b>		
pSAHFUSTs-Z1	Fuente del promotor <i>rsmZ1</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Z2	Fuente del promotor <i>rsmZ2</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Z3	Fuente del promotor <i>rsmZ3</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Z4	Fuente del promotor <i>rsmZ4</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Z5	Fuente del promotor <i>rsmZ5</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Z6	Fuente del promotor <i>rsmZ6</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Z7	Fuente del promotor <i>rsmZ7</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pSAHFUSTs-Y1	Fuente del promotor <i>rsmY</i>	Hernández-Eligio et. al. 2012
pBSL99	Fuente del casete de Km	Alexeyev 1995
pGEM-T Easy	Vector de clonación	Promega
pUMATcgusAT	Plásmido para generar fusiones transcripcionales <i>gusA</i>	Muriel-Millan et. al. 2015
pUMATcgusAT- <i>rsmZ1</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ1</i>	Este estudio

pUMATcgusAT- <i>rsmZ2</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ2</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>rsmZ3</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ3</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>rsmZ4</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ4</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>rsmZ5</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ5</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>rsmZ6</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ6</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>rsmZ7</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmZ7</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>rsmY</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>rsmY</i>	Este estudio
pUMATcgusAT- <i>gyrA</i>	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>gyrA</i>	Este estudio
pUMATcrsmYIY2	pUMATc con el fragmento <i>rsmYIY2</i> más la región reguladora	Mena 2015
pUMATcrsmYI	pUMATc con el fragmento <i>rsmYI</i> más la región reguladora	Mena 2015
pGem- $\Delta$ <i>rsmYI</i> -Gm	pGemT-Easy con la remoción del gen <i>rsmYI</i> e inserción del casete de gentamicina	Teran 2013
pGem- $\Delta$ <i>rsmYIY2</i> -Gm	pGemT-Easy con la remoción del gen <i>rsmYIY2</i> e inserción del casete de gentamicina	Teran 2013
pGAH1Gm	pGem con la inserción de un casete de gentamicina en el codón 51 de RsmA	Sandoval 2014
pUC25CLB::Gm	Plásmido derivado del pUC18 que porta una mutación por remoción/inserción del gen <i>rsmZ2</i>	Tzontecomani 2010
p5_2097rsmD::Gm	Plásmido derivado del pGemT-Easy que porta una	Domínguez 2011

	mutación por remoción/inserción del gen <i>rsmZ3</i>	
pGEM <i>rsmZ4</i> ::Km	Plásmido derivado del pGemT-Easy que porta una mutación por remoción/inserción del gen <i>rsmZ4</i>	Cruz 2013
pGEM <i>rsmG</i> ::Gm	Plásmido derivado del pGemT-Easy que porta una mutación por remoción/inserción del gen <i>rsmZ6</i>	García 2011
pGEM <i>rsmH</i> ::Gm	Plásmido derivado del pGemT-Easy que porta una mutación por remoción/inserción del gen <i>rsmZ7</i>	García 2011
pGEM <i>rsmF</i> ::Sm	Plásmido derivado del pGemT-Easy que porta una mutación por remoción/inserción del gen <i>rsmZ5</i>	López 2012
pUMAT <i>crsmY1</i>	Plásmido que contiene el gen <i>rsmY1</i> más la región promotora	Mena 2015
pUMAT <i>crsmY1Y2</i>	Plásmido que contiene los genes <i>rsmY1Y2</i> más la región promotora.	Mena 2015

## Anexo II. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Referencia
Oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 2Kb		
2kbrsmZ3Fw	GGCGATCCCGGTAGATTCAT	Domínguez 2011
2kbrsmZ3Rv	GGTAGGGGCCACTTTCTTCT	Domínguez 2011
2kbrsmZ4Fw	CGTCTTCAGTGCGGCTCGGGTTCC	Cruz 2013
2kbrsmZ4Rv	GCGGCGGCGGCGGAAATGCTAC	Cruz 2013
2kbrsmZ5Fw	CCGGCATAGCGCATAGATAAGAGG	López 2012

2kbrsmZ5Rv	GCAGCCCGCGTCCCGAGAAGT	López 2012
2kbrsmZ6Fw	TTGCGCGATGCCTCACCTTACTTA	García 2011
2kbrsmZ6Rv	GCAAAGCCCGCCCCACAACC	García 2011
2kbrsmZ7Fw	TTGCGCGATGCCTCACCTTACTTA	García 2011
2kbrsmZ7Rv	GGCACTCCGCGACTCCT	García 2011
Oligonucleótidos para la generación de las fusiones transcripcionales		
Z1Fw	ATCGAATTCATCATCGAGACCGAC	Hernández et. al. 2012
Z1Rev	ATCGAATTCTCGACGTGGAAGTG	Hernández et. al. 2012
Z2Fw	ATCGAATTCTGCATGTCGATAGAC	Hernández et. al. 2012
Z2Rev	ATCGAATTCGACACGGACGCGATA	Hernández et. al. 2012
Z3Fw	ATCTCTAGAACGGGAGGCGAAAC	Hernández et. al. 2012
Z3Rev	ATCTCTAGATCGGTGTGGAAATGAATC	Hernández et. al. 2012
Z4Fw	ATCGAATTCAAACCCGGATTTCCAAT	Hernández et. al. 2012
Z4Rev	ATCGAATTCGTCGATCCTTCGACGCCT	Hernández et. al. 2012
Z5Fw	CGAGTCATGATGGTCTGAAGAC	Este estudio
Z5Rev	TTCTGCAGTCCTGAGGTCGCTATCC	Este estudio
Z6Fw	ATCGAATTCAGCGTCGGTGCT	Hernández et. al. 2012
Z6Rev	ATCGAATTCGTGGTATTCAATCTACCC	Hernández et. al. 2012
Z7Fw	ATCGAATTCAGCCTGCTCCGG	Hernández et. al. 2012
Z7Rev	ATCGAATTCTTGGTGGAGTTCAATG	Hernández et. al. 2012
Y1Fw	ATCGAATTCGCGCTTGTCGTCC	Hernández et. al. 2012
Y1Rv	ATCGAATTCTTGAGCAATAGACTAGGC	Hernández et. al. 2012
DgyrAXhol	GCCTCGAGAGGGGGCGGGCCGGCGCGGC	Este estudio
RgyrEcoRI	CTCGAATTCGGTCAGTGTCTCT	Este estudio
YeD	GGGCGTCGCGCAGGAAGC	Mena 2015
XeR	GTCCGCGGCTGAGTCCAA	Mena 2015
Y2Fw	ATCTCTAGAGAGGCGAAGCATCCT	Mena 2015
TcRv	GCTAGCAGCACGCCATAGTGA	Mena 2015

# BIBLIOGRAFÍA

1. Ahumada-Manuel, C. L., Guzmán, J., Peña, C., Quiroz-Rocha, E., Espín, G., & Núñez, C. 2017. The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1521–1534.
2. Andrade, M.O., Farah, C. S., Wang, N. 2014. The Post-transcriptional regulator *rsmA/csrA* activates T3SS by stabilizing the 5' UTR of *hrpG*, the master regulator of *hrp/hrc* genes, in *Xanthomonas*. *PLoS Pathog.* 10: e1003945.
3. 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.
4. Bishop, P. E., Jarlenski, D. M. 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii* carrying a deletion of the structural gene for nitrogenase (*nifHDK*). *Biochem. J.* 238. 437-442.
5. Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., Haas, D. 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14073–14078.
6. Bordi, C. Lamy, M. C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., et. al. 2010. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signaling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 76, 1427–1443.
7. Bouvier, M., Sharma, M. C., Mika, F. et al. 2008. Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Molecular Cell* 32:6: 827-837.
8. Brantl S. 2002. Antisense-RNA regulation and RNA Interference. *Biochim Biophys Acta* 1575 (1-3): 15-25.
9. Brennan, R.G., Link, T.M. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10:125–133.
10. Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., O'Gara, F. 2006. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152: 405–418.
11. Campos, M-E., 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*. Characterization of the Gene Coding for GDP-Mannose Dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178(7): 1793-1799.
12. Castañeda, M., Sánchez, J. Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. 2001. The global regulators GacA and *rpoS* form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol*; 183: 6787–6793.
13. Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., Bentzmann, S., Bordi, C. 2016. The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS genetics.* 12(5)1-30.

14. Chao, Y., Vogel, J. 2010. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 13:24–33.
15. Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T., Georgellis, D. 2010. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* 192:2009–2012.
16. Clementi, F. 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17: 327-361.
17. Cocotl-Yáñez. Moreno, S. Encarnación, S. Lopez-Pliego, L. Castaneda, M. Espin, G. 2014. A small heat shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii* *Microbiology*, 160, 479-487.
18. Cruz- Gómez, E. A. 2013. Estudio del sRNA RsmZ4 de *Azotobacter vinelandii*. Tesis. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
19. Domínguez Ojeda, P. 2011. Estudio de la expresión del sRNA: RsmD en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
20. 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.
21. Dubey, A.K., Baker, C.S., Suzuki, K., Jones, A.D., Pandit, P., Romeo, T., and Babitzke, P. 2003. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J. Bacteriol.* 185: 4450–4460
22. Dubuis, C., Keel, C., and Haas, D. 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:311–328.
23. Duss, O., Michel, E., Yulikov, M., Schubert, M., Jeschke, G., & Allain, F. H. 2014. Structural basis of the non-coding RNA RsmZ acting as a protein sponge. *Nature*, 509(7502), 588–592
24. Eriksson, A. R. B., Andersson, R. A., Pirhonen, M. and Palva, E. T. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 743-752.
25. Funai, N., Ozawa, H., Hirata, A., Horinouchi S. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:6356–6361.
26. Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D. & Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* 6,7.
27. García, A. M. E. V.; 2016. Estudio del efecto de RsmA sobre la expresión del gen *algD* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Centro de investigaciones en ciencias microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
28. García, L. 2011. Estudio de los sRNAs rsmG y rsmH de *Azotobacter vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
29. Gardner, P.P., Daub, J., Tate, J.G., Nawrocki, E.P., Kolbe, D.L., Lindgreen, S., et al. Rfam: updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:136- 40.
30. Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, I., Ventre, A., Filloux, and S. Lory. 2009. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* 23:249–259.

31. Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., y Lory, S. 2004. Signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell* 7, 745–754.
32. Goodman, A.L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., Lory, S. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* 2009; 23: 249–259
33. Hammer, B. K., Tateda, E. S., Swason, M. S., 2002. Two component regulator induces the transmission phenotype of stationary -phase *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol.* 44(1): 107-118.
34. Heeb, S., Blumer, C., Haas, D. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* 184:1046–1056.
35. Hernandez-Eligio, Alberto et al. 2012. RsmA Post-Transcriptionally Controls PhbR Expression and Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology.* 158(8)1953-1963.
36. Hsu, J., L; Chen, H. C., Peng, H. L; Chang, H. L. 2008; Characterization of the Histidine-containing Phosphotransfer Protein B-mediated Multistep Phosphorelay System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol. Chem* 283: 15: 9933-9944.
37. Humair, B., Wackwitz, B., & Haas, D. 2010. GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1497–1506.
38. Jean-Pierre, F., Tremblay, J., Déziel, E. 2017. Broth versus Surface-Grown Cells: Differential Regulation of RsmY/Z Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB System. *Frontiers in Microbiology* 7:2168
39. Jensen, H. L. 1954. *The Azotobacteriaceae*. Department of bacteriology, state laboratory of plant culture, Lyngby, Denmark. 18: 195-214.
40. Jorgensen, M.G., Thomason, M.K., Havelund, J., Valentin-Hansen, P., Storz, G. 2013. Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. *Genes Dev* 27:1132–1145.
41. Kalvari, I., Argasinska, J., Finn, R., Petrov, A. 2017. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. *Nucleic Acids Research.* 46 (1): D335-D342.
42. Kay, E., Dubuis, C., & Haas, D. 2005 Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102(46), 17136–17141
43. Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., et. al. 2006. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 6026–6033
44. Kennedy, C. & Toukdarian, A. 1987. Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 227-258.



45. 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.
46. Kennedy, C., Rudnick, P., et. al. 2005. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567 AL. in Gergey's of Systematic Bacteriology- The Proteobacteria, 2<sup>nd</sup> edn, vol 2, partB, pp 384-402. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley & G. M Garrity. New York. Springer.
47. Kleiner, D. 1974. Quantitative relations for the repression of nitrogenase synthesis in *Azotobacter vinelandii* in ammonia. *Arch Microbiol.* 101, 153-159.
48. Knutson, C. A., & Jeanes, A. A. (1968). New modification of the carbazole analysis, application to heteropolysaccharides. *Analytical*
49. Koiv, V., Andresen, L., Broberg, M., Frolova, J., Somervuo, P., Auvinen, P., Pirhonen, M, Tenson T, Mae A. 2013. Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. *PLoS One* 8: e54248.
50. Kulkarni, P. R., X. Cui, J. W. Williams, A. M. Stevens, and R. V. Kulkarni. 2006. Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res.* 34:3361–3369.
51. Lapouge K, Schubert M; Allain FH-T; Haas D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol* 67:241-253.
52. Lara, N., 2011. Estudio del papel de cascadas de regulación de GaS/A-RpoS y GacS/-Rsm en la movilidad de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría Centro de Investigaciones en ciencias microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
53. Larsen, B., & Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginate, composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 17, 287–296.
54. Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. 2003. Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 48:1633–1645.
55. Lenz, D. H., M. B. Miller, J. Zhu, R. V. Kulkarni and B. L. Bassier. 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microb.* 58, 1186-1202.
56. Lin, C.T., Huang, Y. J., Chu, P. H., Hsu, J. L., Huang, C. H., & Peng, H. L. 2006. Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res. Microbiol.* 157, 169–175.
57. Liu, M. & Romeo T. 1995. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bac.* 177(10): 2663-2672.
58. Liu, M. Y., & T. Romeo. 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J. Bacteriol.* 179:4639–4642.

59. López, P. A. (2012). Diseño de una herramienta molecular para el estudio del pequeño RNA regulador RsmF de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
60. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
61. Majdalani, N. Carin K. et. al. 2005. Bacterial Small RNA Regulators *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 40:2, 93-113.
62. Manzo, J. et al. 2012. "Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene algD by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii* ." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 21(3–4): 147–59.
63. Martínez, L.C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides, J., Bustamante, V. H. 2014. In silico identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella* csrB and csrC genes. *J Bacteriol* 196:325–336.
64. Mena, M. G., 2015. Estudio del pequeño RNA RsmY de *Azotobacter vinelandii* . Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
65. Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., Romeo, T. 2006. Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem* 281: 31832–31842.
66. Moll, S., Schneider, D. J., Stodghill, P., Myers, C. R., Cartinhour, S. W., & Filiatrault, M. J. 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), 508–516.
67. Morfeldt, E., Taylor, D., Von Gabain, A., Arvidson, S. 1995. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 14:4569–4577.
68. Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. K., & Chatterjee, A. K. 1996. Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora* rsmA, a homologue of *Escherichia coli* csrA, repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction. *Microbiology*, 142(2), 427–434.
69. Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya-Pérez, L. P., Castañeda, M., Segura, D., et al. (2015). The unphosphorylated EIIANtr protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS ONE*, 10(2), 1–14.
70. Pernestig, A. K., D. Georgellis, T. Romeo, K. Suzuki, H. Tomenius, S. Normark, and O. Melefors. 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two component systems is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J. Bacteriol.* 185: 843-853.
71. Pernestig, A. K., O. Melefors, and D. Georgellis. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276:225–231.

72. Pflüger-Grau, K. De Lorenzo, V. 2014. From the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system to selfish metabolism: A story retraced in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiology Letters. 356(2), 144-153.
73. Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Phaneuf, E., Massé, E. The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. Mol. Microbiol. 2007;64:1260–1273.
74. Quiroz-Rocha, E. Moreno, R. Hernández-Ortiz, A. Fragoso-Jimenez, J. C. Muriel-Millan, L. F. Guzman, J. Espin, G. Rojo, F. Nuñez, C. 2017. Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems Scientific Reports, 7, 858.
75. Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas D. 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl- homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. Mol Microbiol 24:309–319.
76. Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., Haas D. 2005. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. J Bacteriol 187:276–285.
77. Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol. Microbiol. 29, 1321–1330
78. Romero, Y., Moreno, S., Guzman, J., Espín, G., & Segura, D. 2013. Sigma Factor RpoS Controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-Type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology, 195(8), 1834–1844.
79. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual (2nd edn.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
80. Schubert M, Lapouge K, Duss O, Oberstrass FC, Jelesarov I, Haas D, Allain FH. 2007. Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. Nat Struct Mol Biol 14: 807–813.
81. Schubert, M. Lapouge, K. Duss, O. Oberstrass, F.C. Jelesarov, I. Haas, D. Allain, F.H.T. Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. Nat Struct Molec Biol. 2007; 14:807–813.
82. Segura, D., Espin, G. 2004. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. Applied Microbiology and Biotechnology. 65 (4): 414-418.
83. Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesva g, H., Espín, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D. et. al. 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. J Bacteriol 191, 4534–4545.

84. Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-domenigg, T., et al. 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 59, 1542–1558.
85. Storz, G., Vogel, J., Wassarman, K. M., 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 43(6): 880-891.
86. Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R., Romeo, T. 2006. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* 20:2605–2617.
87. Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Parnestig, A.K., Melefors, O., Georgellis, D., et al. (2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 5130–5140
88. Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J. A., Haas D. 2009. Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* 284:34976–34985.
89. Teplitski, M., Goodier, R. I., Ahmer, B. M. 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 185:7257– 7265.
90. Terán, M. J. L. (2011). Estudio de los RNAs reguladores RsmX y RsmY en *Azotobacter vinelandii*. Tesis. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
91. Timmermans, J., van Melderen L (2010) Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* (2010) 67: 2897.
92. Tłuścik, F., Kazubek, A., y Mejbaum-Katzenellenbogen, W. 1981. Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, fast blue B. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 50, 645–651.
93. Tomizawa, J., Ithoh, T., Selzer, G., Som, T. 1981. Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 78:1421-1425.
94. Tzontecomani, P. T. (2010). Fenotipificación y caracterización de una mutante no polar en el gen rsmC en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
95. Velázquez, S. C. 2008. Papel del gen rsmB de *Azotobacter vinelandii* en el crecimiento y producción de alginato de diferentes fuentes de carbono. Tesis. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
96. Vogel, J. y Papenfort, K. 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr. Op. In Microbiol.* 9:605-611.
97. Wassarman, K. M., Storz G. 2000. 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* 101:613-623.
98. Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48:657–670.

99. Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D. L., & Jefferson, R. A. (1995). -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology*, 141(7), 1691–1705.
100. Yahr, T. L., Wolfgang, M. C. 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 62:631– 640.