



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL GEN *AVIN 08930* Y SU
PARTICIPACIÓN EN LA SÍNTESIS DE
POLIHIDROXIBUTIRATO Y ALQUILRESORCINOLES EN
AZOTOBACTER VINELANDII

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

KAREN AMEYALLY RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO



CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos

Nombre del Alumno (a): Karen Ameyally Rodríguez Martínez

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Carrera: Biología

Número de cuenta: 310211158

Correo electrónico: karen_ameyally09@hotmail.com

Presidente: Dra. Gloria Soberón Chávez

Correo electrónico: gloria@biomedicas.unam.mx

Vocal: Dr. Luis Servín González

Correo electrónico: servin@biomedicas.unam.mx

Secretaria (Tutora): Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Correo electrónico: espin@ibt.unam.mx

Suplente 1: Dr. Renato León Rodríguez

Correo electrónico: renato@biomedicas.unam.mx

Suplente: M. en C. César Ramiro Martínez González

Correo electrónico: ramiro_mg.unam@ciencias.unam.mx

Agradecimientos

A la Dra. Guadalupe Espín, por haberme aceptado en su grupo de investigación. Gracias por permitirme crecer profesionalmente y personalmente bajo su tutoría, por enseñarme a descubrir lo hermoso de la ciencia, por brindarme su confianza y apoyo.

A la técnica académica Soledad Moreno, gracias por ser mi guía durante todo este proyecto. Por su infinita paciencia, por compartir su sabiduría y experiencia conmigo. No solo fue una maestra para mí, sino también se convirtió en una gran amiga, la quiero muchísimo.

A Leydi Bedoya, por ser precursora de este proyecto. Gracias por tomar parte de tu tiempo en las observaciones del presente trabajo, por tu excelente tutoría, pero sobre todo gracias por tu invaluable amistad y sinceridad. Te quiero.

A las técnicas académicas Josefina Guzmán y María Tabche, a los Drs. Daniel Segura y Cinthia Núñez, por sus comentarios y sugerencias durante los seminarios de grupo, los cuales llevaron a una mejora del presente proyecto.

A los miembros del Jurado Revisor, los Drs. Gloria Soberón, Luis Servín y Renato Rodríguez, quienes me brindaron sugerencias y comentarios que contribuyeron a la realización del presente proyecto. Gracias a cada uno por tomar parte de su tiempo para la revisión de este trabajo.

Al M. en C. César Ramiro, por formar parte del Jurado Revisor y tomar parte de su tiempo en la revisión del presente trabajo, pero sobre todo por tu invaluable amistad, gracias por ser una de las personas que me inspiro a seguir adelante y buscar siempre lo mejor, eres un gran ejemplo para mí.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, "Los Espín": Gaby, Alma, Jessica, Andrea, Libertad, Elva, Leonel, Chantal, Marce y Christian. Muchas gracias a cada uno de ustedes por hacer mi estancia en el laboratorio la experiencia más divertida y enriquecedora, gracias por sus consejos, su apoyo y confianza, pero sobre todo gracias por su amistad. Los quiero mucho.

A mis "Roomies" Stephanie Ortiz y Gabriela Álvarez, gracias por confiar en mí y dejarme conocerlas mejor, compartir con ustedes un año de mi vida fue la experiencia más hermosa que pude tener durante nuestra estancia en el IBT. Gracias por las noches familiares, las noches de cuentas, las noches de cocina, las noches de karaoke, las noches de historias y anécdotas, pero sobre todo gracias por su maravillosa amistad. Las quiero muchísimo.

Al M.V.Z Oscar Aguayo, por su amistad brindada durante mi estancia en el IBT, gracias por todos los regresos a la ciudad que compartimos, por las anécdotas y tus consejos, eres un gran amigo para mí.

A Paulina Corona Tejeda, por ser la mejor compañía y el mejor equipo que pude tener durante la universidad, por tus consejos, apoyo y confianza durante todo este tiempo. Jamás olvidaré todas nuestras aventuras en la ciudad y en campo, las historias compartidas y las miles de risas a tu lado. Te quiero muchísimo, eres una persona increíble. Gracias por inspirarme a ser una mejor persona y amiga.

A mis amigos, Ana Varela, Betsy Alberdín, Vanessa Salvador, Lupita Briones, Brenda Hernández, Mariana Castillo, Karen Noriega, Mario Oropeza, Miguel Ortiz y Uriel Pineda. Muchas gracias por los buenos y malos momentos que compartimos juntos. Me siento afortunada de ser su amiga, su amistad es un tesoro que espero tener siempre.

A mis tíos Eber Añorve y Margarita Martínez, por su apoyo incondicional. Gracias a ustedes pude cumplir muchos objetivos que me permitieron llegar más lejos. Gracias por enseñarme a elevar mis metas y por confiar en mí, sin ustedes esto no sería posible.

A la UNAM, por la educación recibida, por formarme como bióloga y por todo el apoyo brindado.

Este proyecto fue realizado en el Instituto de Biotecnología en el Departamento de Microbiología Molecular, bajo la tutoría de la Dra. Eida Guadalupe Espín Ocampo y con el apoyo financiero del proyecto PAPIIT-207027.

Dedicatorias

A mi madre, Guadalupe Martínez, por ser el pilar que me sostuvo durante esta travesía, por confiar en mí y alentarme en todo momento. Porque a pesar de las adversidades tú siempre me inspiraste a seguir y no rendirme. Por recordarme que puedo lograr todo lo que me proponga. Te amo por todo el cariño, amor y seguridad que me das, por la hermosa y valiosa mujer que eres. Siempre serás mi mayor inspiración para ser una gran persona.

A mi padre, Oscar Rodríguez, por enseñarme a luchar por mis metas y sueños. A pesar de todo lo sucedido, lo bueno y lo malo, tú siempre llenas mi vida de amor. Gracias por darme seguridad para avanzar aún en los momentos difíciles, por educarme de la manera en que lo hiciste, por cada consejo y cada regaño, por siempre confiar en mí. Te amo papá, gracias por guiarme y por amarme. Aún me faltan muchas metas por cumplir y si tú estás conmigo sé que lo puedo lograr.

A mis hermanos, Giovanni y Mario, ustedes mi inspiración para ser la mejor hermana mayor que puedan tener. Gracias por todo su apoyo, soy tan afortunada de tenerlos como hermanos, los amo.

A René Hernández Estrada, por ser el mejor equipo de vida que tengo. Gracias por compartir tanto conmigo y por estar ahí cuando más te necesito. No tengo palabras para agradecerte todo lo que he aprendido contigo y de ti, son incontables las historias que hemos vivido juntos. Eres la luz de mi camino, tú me has enseñado a ser la mejor versión de mí y por eso te amo muchísimo. Gracias por todo el amor que me das.

A mi familia, gracias a cada uno de ustedes por el apoyo, confianza y seguridad que me dieron.

Este también es su logro, gracias por inspirar mi vida y llenarla de felicidad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	
1.1. Características generales de <i>Azotobacter vinelandii</i>	2
1.2. Características generales e importancia del Polihidroxibutirato (PHB).....	3
1.2.1. Biosíntesis de PHB y su regulación genética.....	4
1.3. Características generales de alquilresorcinoles (ARs).....	5
1.3.1. Regulación genética y biosíntesis de alquilresorcinoles.....	6
1.4. Sistemas de dos componentes.....	8
1.4.1. Sistema de dos componentes GacS/GacA.....	9
1.5. El sistema Csr.....	9
1.5.1. El sistema RsmA/RsmZ.....	10
1.6. Rescate de ribosomas.....	11
1.6.1. Rescate de ribosomas por trans-traducción.....	12
1.6.2. Rescate de ribosomas por ArfA y ArfB.....	13
2. ANTECEDENTES	
2.1. La vía GacA-Rsm y su efecto en la producción de PHB y alquilresorcinoles.....	16
2.2. Identificación de otros genes regulados por GacA.....	18
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22

5. MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	23
5.2 Medios y Condiciones de Cultivo.....	26
5.3 Procedimiento con ácidos nucleicos.....	27
5.4 Purificación de DNA cromosomal.....	27
5.5 Purificación de RNA total.....	28
5.6 Extracción de DNA de plásmido (Técnica del Perclorato).....	28
5.7 Transformación de <i>E. coli</i>	29
5.8 Ensayo de extensión del iniciador (Primer extension).....	29
5.9 Determinación de operón liderado por <i>rsmZ7</i>	30
5.10 Determinación de proteína.....	30
5.11 Determinación de actividad β -Glucuronidasa.....	31
5.12 Construcción del plásmido <i>pJETrsmZ7-ArfA1</i>	32

6. RESULTADOS

6.1. Análisis bioinformático del gen <i>Avin08930</i>	33
6.1.1. Predicción funcional del gen <i>Avin08930</i>	33
6.1.2. Estructura del RNAm de <i>arfA1</i>	34
6.2. El fenotipo de la mutante <i>arfA1</i> no se debe a una mutación en el gen <i>rsmZ7</i>	35
6.3. Identificación del inicio de la transcripción de <i>arfA1</i>	36
6.4. <i>arfA1</i> se transcribe de manera independiente de <i>rsmZ7</i>	38
6.5. Inactivación del gen <i>arfA1</i> y su efecto en la transcripción y traducción de los genes involucrados en la síntesis ARs y PHB.....	41
6.5.1. Expresión de los genes <i>arpR</i> y <i>arsA</i> en la mutante <i>arfA1</i>	41
6.5.2. Expresión de los genes <i>phbR</i> y <i>phbB</i> en la mutante <i>arfA1</i>	41
6.6. Genes involucrados en el rescate de ribosomas presentes en <i>A. vinelandii</i>	43

7. DISCUSIÓN.....46

8. CONCLUSIONES.....50

9. PERSPECTIVAS.....51

10. BIBLIOGRAFÍA.....52

Resumen

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa de vida libre perteneciente a la familia Pseudomonadaceae. Bajo condiciones desfavorables sufre una serie de cambios morfo-fisiológicos que dan lugar a la formación de quistes resistentes a la desecación. Los tres compuestos con mayor importancia debido a su abundancia y papel estructural en el quiste son: alginato, polihidroxitirato (PHB) y alquilresorcinoles (ARs), siendo los dos primeros productos de interés a nivel industrial. La biosíntesis de PHB y ARs se da a partir de los operones *phbBAC* y *arsABCD*, respectivamente. Además participan los activadores de estos operones, PhbR y ArpR, así como los sistemas de regulación global GacS/GacA y RsmA/RsmZ. En este estudio se caracterizó el gen *Avin08930* ya que una mutación en este gen redujo de manera significativa la síntesis de PHB y ARs. Nuestros resultados *in silico* indican que *Avin08930* codifica para una proteína de 52 aminoácidos que presenta homología con la proteína ArfA (*alternative ribosome-rescue factor A*) de *E. coli*, participa en el sistema alternativo de rescate de ribosomas que se encuentran estancados en complejos *non-stop* a través del reclutamiento de RF2 (factor de liberación-2). Por esta razón fue renombrado como *arfA1*. Por análisis bioinformático se observó que *A. vinelandii* cuenta con los tres sistemas de rescate de ribosomas: el sistema de trans-traducción, el factor de rescate alternativo A y el factor de rescate alternativo B. El sitio de inicio de la transcripción de *arfA1* se identificó por *primer extension*, y se localiza a 142 bases río arriba del inicio del gen, adicionalmente, se comprobó que no forma operón con *rsmZ7*. A través de ensayos de expresión del gen reportero β -glucuronidasa se estudió la transcripción y traducción de los genes reguladores y biosintéticos de la síntesis de PHB y ARs y se comprobó que la disminución de su síntesis se debía a una menor expresión de los genes estructurales *phbB* y *arsA*.

1 Introducción

1.1 Características generales de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa de vida libre, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae. Se calcula que alcanza a tener hasta 80 copias del cromosoma, característica que se conoce como poliploidía. Además *A. vinelandii* es aerobia estricta, quimioorganotrófica y fijadora de nitrógeno. Las células son peritricas con forma ovalada y un diámetro de $2 \times 5 \mu\text{m}$ (Sadoff, 1975; Segura *et al.*, 2014).

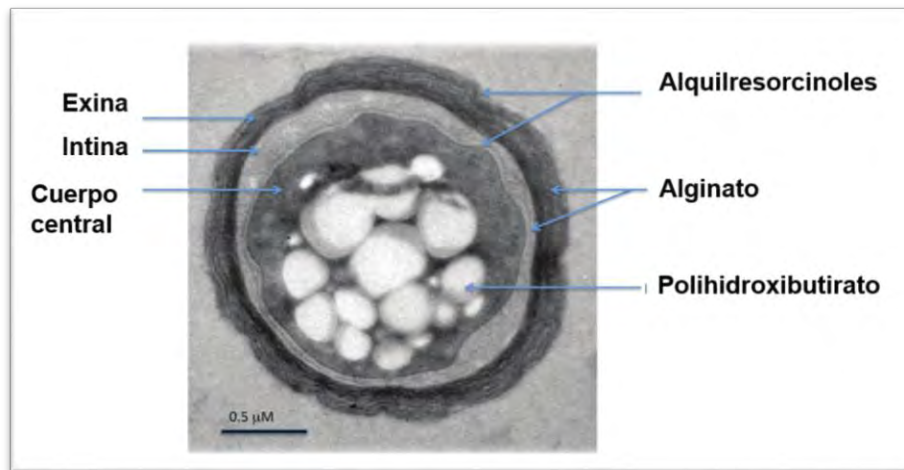


Fig. 1. Quiste maduro de *Azotobacter vinelandii*. Se muestra la organización de los componentes del quiste: polihidroxibutirato, alquilresorcinoles y alginato. Así como las estructuras que lo componen: cuerpo central, capa interna (intina) y capa externa (exina) (Modificado de Espín, 2016).

En su ciclo de vida, bajo condiciones desfavorables de nutrientes, sufre un proceso de diferenciación a través de cambios morfo-fisiológicos que resultan en la formación de quistes resistentes a la desecación, a la desintegración mecánica y a la radiación ultravioleta (Sadoff, 1975).

La morfología del quiste consiste en una célula ovalada llamada cuerpo central, la cual está rodeada por una capsula compuesta por una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina (Fig. 1). Los tres compuestos con mayor

importancia debido a su abundancia y papel estructural en el quiste son: alginato, polihidroxitirato (PHB) y alquilresorcinoles (ARs), siendo los dos primeros productos de interés a nivel industrial (Segura *et al.*, 2014).

1.2 Características generales e importancia del Polihidroxitirato (PHB)

El poli- β -hidroxitirato (PHB) se clasifica dentro de la familia de los polihidroxitiratos, un grupo de biopolímeros sintetizados por una amplia gama de géneros bacterianos, tales como, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Caulobacter*, *Rhodobacter*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, entre otros. Su estructura se compone de monómeros repetidos de β -hidroxitirato (CH-(CH₃)-CH₂-CO-O); y su composición monomérica define las propiedades físicas del polímero, por ejemplo, temperatura de fusión, fuerza tensil, elongación, peso molecular, entre otros (Espín, 2001; González *et al.*, 2013).

En bacterias productoras de PHB, su acumulación se presenta en respuesta a una limitación del crecimiento, principalmente por la falta de algún nutriente, como nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, y en presencia de un exceso de la fuente de carbono y energía (Espín 2001; Jendrossek *et al.*, 2002).

El metabolismo del PHB está relacionado con el proceso de diferenciación celular que resulta en la formación de quistes. En *A. vinelandii* el PHB se deposita intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión (gránulos) y es el componente principal del cuerpo central de los quistes. Sin embargo, mutaciones en los genes de síntesis del PHB no dañan la capacidad de resistencia a la desecación de los quistes, por lo que este polímero no es esencial para su formación y sobrevivencia (Segura *et al.*, 2003).

El PHB tiene características similares a plásticos convencionales como el polipropileno y el polietileno, pero además, el PHB es un termoplástico

biodegradable, biocompatible y no tóxico. Gracias a estas propiedades es utilizado a nivel industrial en la elaboración de envases, plásticos para la envoltura de alimentos, utensilios domésticos, etc. (Segura *et al.*, 2008).

1.2.1 Biosíntesis de PHB y su regulación genética

La biosíntesis de PHB (Fig. 2) se lleva a cabo durante la fase estacionaria como una desviación del metabolismo central, unido a la acetil-CoA, que en lugar de metabolizarse en el ciclo de Krebs se utiliza en la síntesis de PHB en tres etapas enzimáticas. La primera reacción se da por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotilasa (*phbA*) para generar acetoacetil-CoA. El acetoacetil-CoA se reduce por una acetoacetil-CoA reductasa (*phbB*) utilizando NADPH y produciendo D(-)-B-hidroxiacetil-CoA que finalmente se polimeriza por la actividad de la PHB sintasa (*phbC*) (Espín, 2001).

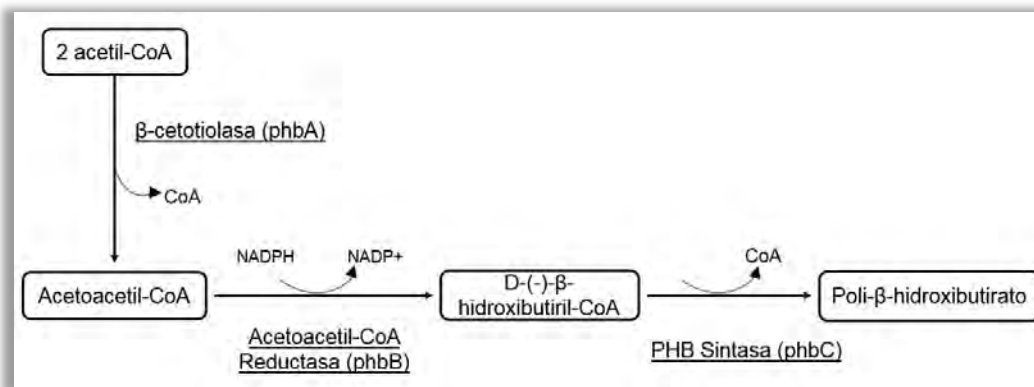


Fig. 2. Biosíntesis de polihidroxibutirato.

En *A. vinelandii* los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* codifican para β -cetotilasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHB sintasa respectivamente, y se encuentran agrupados formando el operón *phbBAC* (Fig 3). Corriente arriba de este operón y de manera divergente se encuentra el gen *phbR* que codifica para la proteína PhbR,

la cual pertenece a la familia de los activadores transcripcionales AraC/XylS (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

El operón *phbBAC* se transcribe a partir de dos promotores sobrelapados, pB1 y pB2. La proteína PhbR activa de manera directa la transcripción del operón biosintético a partir del promotor pB1, mientras que el factor σ^S de fase estacionaria (RpoS) activa la transcripción del promotor pB2 (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2003; Hernández-Eligio *et al.*, 2011).

La transcripción del gen *phbR* está controlada a partir de dos promotores: pR1 y pR2. La proteína PhbR activa la expresión de su propio gen a partir del promotor pR1, por otra parte, el promotor pR2 es inducido por RpoS. (Peralta-Gil, *et al.*, 2002; Hernández-Eligio *et al.*, 2011).

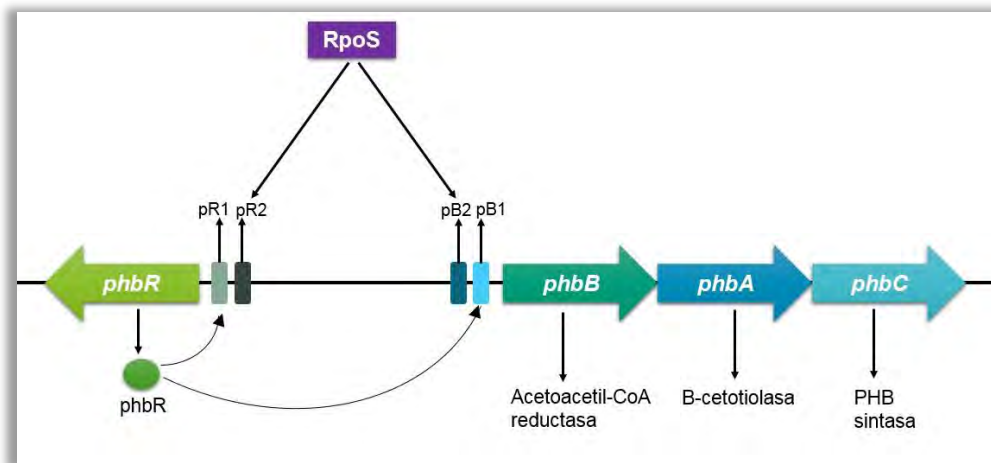


Fig. 3. Modelo de regulación genética del operón *phbBAC*.

1.3 Características generales de alquilresorcinoles (ARs)

Los alquilresorcinoles (ARs) o lípidos resorcinólicos, son un grupo de metabolitos secundarios no isoprenoides ubicados dentro de la familia de lípidos fenólicos. Los principales ARs sintetizados son: 5-heneicosylresorcinol y 5-n-tricosylresorcinol (Reusch *et al.*, 1979; Funa *et al.*, 2006).

Su estructura química está definida por una molécula anfipática, la cual se compone de una cadena alquilo hidrofóbica, derivada de la biosíntesis de los ácidos grasos y un anillo resorcinol hidrofílico proveniente de la vía biosintética de los policétidos; tal estructura le proporciona la capacidad de arreglarse en forma de membrana.

Se les confieren propiedades biológicamente importantes tales como: antifúngica, antibacterial, citotóxica, antitumoral y antioxidante (Suaza- García *et al.*, 2014).

En *A. vinelandii* los ARs sustituyen casi en su totalidad a los fosfolípidos de la membrana durante el proceso de diferenciación a quiste. Además, constituyen el 32% de los lípidos presentes en la exina, el 9% en la intina y el 59% en el cuerpo central del quiste (Reusch *et al.*, 1981).

Estudios previos en *A. vinelandii*, demostraron que mutantes en la producción de ARs son incapaces de formar una cápsula bien estructurada en el quiste, observándose una alteración en la capa de exina y aglutinamiento de células que forman agregados por uniones entre las capsulas (Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, estas mutantes aún tienen la capacidad de enquistar, demostrando que si bien los ARs son necesarios para la estructura del quiste, no lo son para la resistencia a la desecación (Segura *et al.*, 2009).

1.3.1 Regulación genética y biosíntesis de alquilresorcinoles

Los genes involucrados en la síntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii* se expresan específicamente durante el proceso de enquistamiento y están organizados en el operón *arsABCD* (Fig. 4).

Este operón es activado por la proteína ArpR, codificada en el gen *arpR*. Actúa como un regulador transcripcional de tipo LysR y se une directamente a la región promotora de *arsABCD*. Esta activación es dependiente de una señal metabólica en la que el acetil-CoA actúa como un coinductor (Romero *et al.*, 2013).

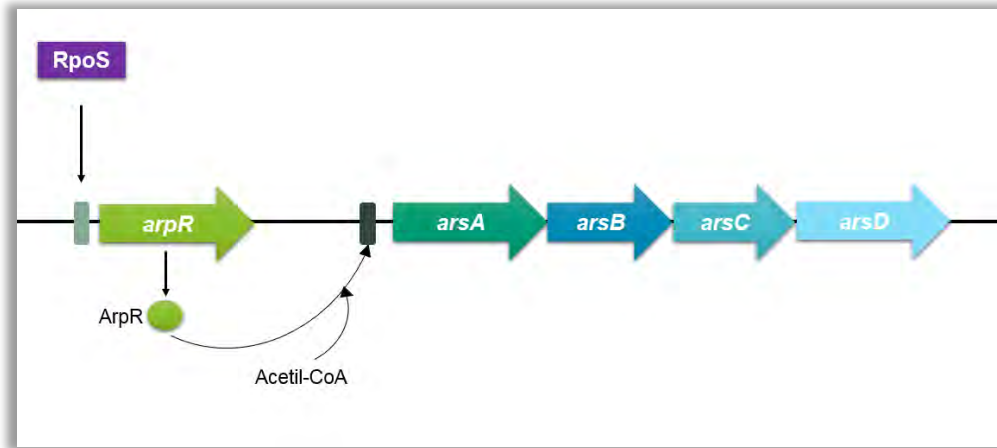


Fig. 4. Modelo de regulación genética del operon *arsABCD*.

El factor sigma RpoS también está implicado en el control de la síntesis de ARs, ya que una mutante sin RpoS es incapaz de sintetizar estos lípidos debido a una afectación en la transcripción del gen *arpR* (Cocotl-Yáñez *et al.*, 2011).

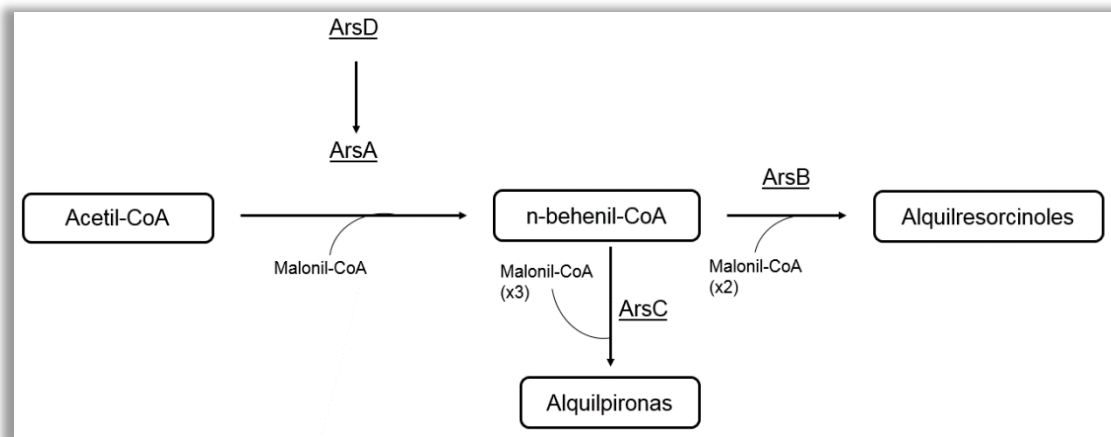


Fig. 5. Biosíntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas.

Las proteínas codificadas por los genes *arsA*, *arsB*, *arsC* y *arsD* intervienen en la síntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas. La cual inicia (Fig. 5) cuando ArsD une de manera covalente un brazo de 4-fosfopanteteína proveniente de coenzima A al dominio ACP (proteína acarreadora de acilos) de ArsA. Posteriormente, ArsA cataliza la síntesis de una molécula de 22 carbonos a partir de una unidad de acetil-

CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA, formando n-behenil-CoA. ArsB utiliza el n-behenil-CoA y 3 moléculas de malonil-CoA para la síntesis de alquilresorcinoles, por otro lado, ArsC usa el n-behenil-CoA y 2 moléculas de malonil-CoA para la producción de alquilpironas. (Funa *et al.*, 2006; Miyanaga *et al.*, 2008).

1.4 Sistemas de dos componentes

La mayoría de los procesos celulares requieren la modulación de la expresión de genes en respuesta a señales ambientales. Esta modulación requiere sensores que detecten las señales químicas o físicas, y un regulador que promueva o inhiba la expresión de un producto genético determinado para responder a la señal; este mecanismo se conoce como, transducción de señales.

En bacterias, los sistemas de dos componentes son los mecanismos predominantes de transducción de señales extracelulares. Están presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y son críticos para una variedad de funciones fisiológicas donde se incluyen: la esporulación, la competencia, la resistencia a antibióticos y la transición a fase estacionaria (Mitrophanov *et al.*, 2008). La mayoría de los sistemas de dos componentes están formados por dos elementos:

- 1) Una proteína detectora, que pertenece a la familia de histidín-cinasas. En el extremo amino terminal presenta dos dominios transmembranales que flanquean una porción de la proteína que se sitúa en el periplasma; esta región se conoce como dominio de entrada y se le atribuye la detección de señales ambientales. Por otra parte, la región citoplasmática se conoce como módulo transmisor, la cual se autofosforila a partir de ATP en un residuo de histidina conservado y luego transfiere el grupo fosforilo a un aspartato conservado en el regulador de respuesta (Mitrophanov *et al.*, 2008).

2) Un regulador de respuesta citoplasmático, que por lo general es un regulador transcripcional, el cual se constituye por dos dominios: el de fosforilación que se encuentra en el extremo amino terminal y se conoce como módulo receptor (que sufre una fosforilación en el residuo Asp), y el de salida que generalmente es un motivo de unión a DNA (Parkinson *et al.*, 1992; Mitrophanov *et al.*, 2008).

1.4.1 Sistema de dos componentes GacS/GacA

El sistema de dos componentes GacS/GacA es un mecanismo de transducción de señales extracelulares presente en *A. vinelandii* y otras γ -proteobacterias. Está conformado por la proteína detectora transmembranal GacS y la proteína reguladora de respuesta GacA. Este sistema controla sus blancos a través de sistemas de regulación postranscripcional como Rsm, con el fin de poder contender con las condiciones del ambiente. El sistema de dos componentes GacS/GacA actúa como regulador global del metabolismo secundario y está involucrado en la síntesis de alginato, PHB y ARs.

1.5 El sistema Csr

El sistema de regulación Csr (Carbon Storage Regulatory) controla la expresión de genes bacterianos post-transcripcionalmente. Está formado por la proteína de unión a RNA conocida como CsrA, cuya actividad es unirse a RNAm blanco por reconocimiento de secuencias GGA cercanas y/o dentro del Shine Delgarno (SD), de manera que impide el reconocimiento por parte del ribosoma, provocando así la degradación del RNAm.

En *E. coli* la actividad de CsrA es antagonizada por dos RNAs pequeños no traducidos conocidos como *CsrB* y *CsrC*, cuya estructura secundaria presenta varias estructuras de tallo que contienen en las asas secuencias repetidas GGA que

son reconocidas por CsrA. De esta forma, CsrB y CsrC secuestran a CsrA dejando libre el RNAm para ser traducido (Romeo, 1998).

Se ha reportado la existencia de sistemas homólogos de Csr en otras bacterias como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Salmonella* (Susuki *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que la expresión de los RNA no traducidos del sistema Csr dependen del regulador de respuesta GacA (Lapouge *et al.*, 2008).

1.5.1 Sistema RsmA/RsmZ

Otro sistema de regulación global presente en *A. vinelandii*, es el sistema Rsm, homólogo del sistema Csr. Consiste en la proteína RsmA y 9 genes que codifican para RNAs pequeños no codificantes, 8 del tipo *RsmZ* y uno del tipo *RsmY* (Castañeda *et al.*, 2016).

RsmA es una proteína pequeña que actúa como represor de la traducción al unirse a los RNAm de sus genes blancos, en *A. vinelandii* son los RNAm *phbR*, *phbB* y *arpR*. Sin embargo, este efecto negativo es bloqueado por la participación de los *RsmZ* que se unen a la proteína RsmA, provocando la liberación y correcta traducción de los RNAs secuestrados (Hernández-Eligio *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2016).

El sistema GacS/GacA activa la transcripción de los RNAs pequeños regulatorios ya que estos presentan en su región reguladora un sitio de unión a GacA, conocido como caja GacA (TGTAAG N6 CCTACA) (Castañeda *et al.*, 2000; Manzo *et al.*, 2011; Hernandez-Eligio, 2012).

1.6 Rescate de Ribosomas

La traducción es el proceso por el cual se da la síntesis de proteínas a partir de un RNAm. Se divide en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclado de ribosomas.

Muchos ribosomas realizan exitosamente el proceso de traducción y producen una proteína completa y funcional. Sin embargo, durante este proceso el RNAm puede sufrir algún deterioro, dando lugar a la formación de un complejo conocido como *non-stop*, el cual surge cuando el ribosoma está estancado en el extremo 3' del RNAm debido a la ausencia de un codón en el sitio-A del ribosoma, el cual es crucial para que la elongación o terminación continúen (Keiler, 2015).

Algunas de las causas que conducen a la formación de un complejo *non-stop* son: la terminación prematura de la transcripción, daño al RNAm, un corrimiento en el marco de lectura, falta de reconocimiento del codón de paro y/o la actividad de enzimas que degradan RNA (RNAsas) (Keiler, 2015).

En la mayoría de los casos, los ribosomas no pueden disociarse fácilmente cuando forman parte de un complejo de traducción *non-stop*, ya que las interacciones entre el peptidil-tRNA, el ribosoma y el RNAm mantienen el complejo firmemente unido.

La acumulación de complejos *non-stop* es tóxica para la célula y puede llevarla a la muerte debido a una reducción en la síntesis de proteínas. En las bacterias se desarrolló un mecanismo que es capaz de disociar a los complejos *non-stop*, conocido como el sistema de trans-traducción (Keiler, 2015).

Además de este sistema existen dos mecanismos alternativos que rescatan ribosomas conocidos como ArfA (*alternative ribosome-rescue factor A*) y ArfB (*alternative ribosome-rescue factor B*) (Chadani *et al.*, 2010; Chadani *et al.*, 2011).

1.6.1 Rescate de ribosomas por trans-traducción

El sistema de trans-traducción está formado por el RNA especializado tmRNA y SmpB (Small Protein Binding), los cuales son codificados por los genes *ssrA* y *smpB* respectivamente, ambos genes han sido identificados en el 99% de los genomas bacterianos secuenciados.

La molécula de tmRNA está constituida por un dominio similar a un tRNA, el cual se asemeja al tallo aceptor de un alanil-tRNA y por lo tanto, es cargado con una alanina por la alanina tRNA-sintetasa (Ala-RS), y por un dominio similar a un RNAm que codifica para un péptido corto de 8-35 aminoácidos (aa) de longitud. Ambos dominios están unidos por una serie de 2-4 pseudoknots, estructura secundaria de RNA formada por dos horquillas (stem-loop), en la que el asa de una horquilla forma la mitad del asa de la otra horquilla (Keiler, 2015).

Por otra parte, la proteína SmpB estabiliza la estructura del tmRNA, aumenta su interacción con Ala-RS y es requerida para la interacción entre tmRNA y el complejo *non-stop*.

El proceso de trans-traducción (Fig. 6) inicia con la formación del complejo tmRNA-SmpB-Ef-Tu (Elongation factor-Tu)+GTP, este reconoce al complejo ribosoma-*non-stop* cuando el extremo carboxilo terminal de SmpB se une en el sitio-A vacante. El complejo tmRNA-SmpB-Ef-Tu+GTP, se acomoda de manera que el dominio similar a tRNA se coloque en el centro peptidil transferasa y se libere EF-Tu. La reacción de transferencia de peptidil da lugar a la transferencia de la alanina unida al tmRNA al polipéptido naciente, y el peptidil-tmRNA-SmpB se trasloca al sitio de unión peptidil- tRNA (sitio P), que se cataliza por el factor de elongación G (Ef-G). Este movimiento posiciona el marco de lectura marcado del tmRNA en el canal de mRNA. El mRNA original se elimina del ribosoma y se degrada. La traducción se reanuda utilizando el marco de lectura marcado y debido a que contiene un codón de parada, puede continuar la terminación, por lo que se liberan el ribosoma y la proteína

marcada. La proteína marcada se degrada rápidamente por proteasas, tales como ClpXP, ClpAP, Lon, HflB y Tsp (Keiler, 2015).

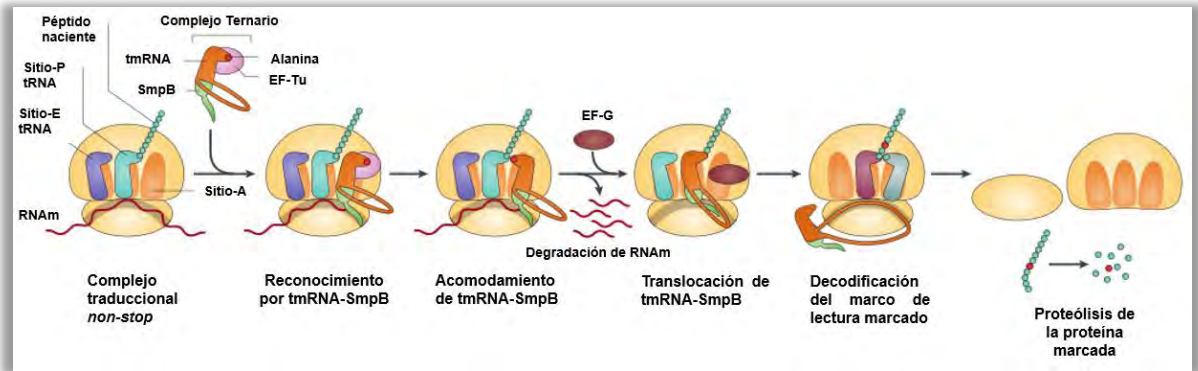


Fig. 6. Rescate de ribosomas por trans-traducción (Modificado de Keiler, 2015).

1.6.2 Rescate de ribosomas por ArfA y ArfB

Existen dos sistemas alternativos de rescate de ribosomas conocidos como ArfA y ArfB. Son considerados como sistemas de respaldo debido a que se activan cuando existe una falla en el sistema de trans-traducción. El sistema ArfA se ha localizado en un subconjunto de β y γ -proteobacterias. Por otro lado, el sistema ArfB se encuentra presente en el 34% de los genomas bacterianos (Keiler, 2015; Huter *et al.*, 2017).

El rescate de ribosomas a través de ArfA fue identificado y descrito en *Escherichia coli* (Chadani *et al.*, 2010, Keiler, 2015; Huter *et al.*, 2017). Recientemente fueron reportadas 5 estructuras de microscopía crioelectrónica (cryo-EM) de ArfA interactuando con RF2 (factor de liberación 2) y un complejo ribosómico *non-stop* (Huter *et al.*, 2017).

Estos estudios permitieron dar una descripción más detallada del proceso de rescate de ribosomas por ArfA. Los resultados demostraron (Fig. 7-A) que ArfA censa el ribosoma estancado por unión de su extremo carboxilo en el sitio-A vacante del ribosoma reclutando a RF2 en su estado inactivo.

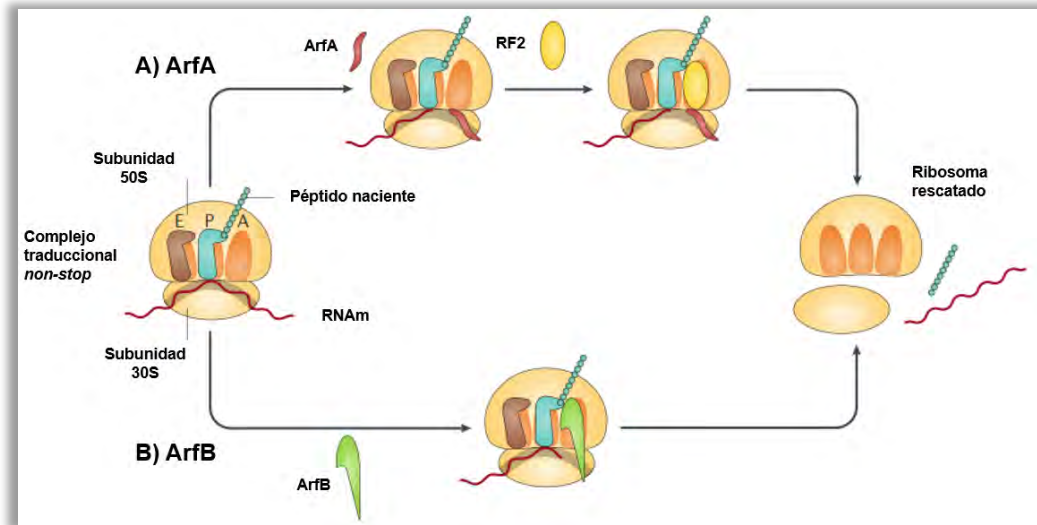


Fig. 7. Rescate alternativo de ribosomas estancados en complejos *non-stop* por A) ArfA y B) ArfB (Modificado de Keiler, 2015).

El centro de decodificación ribosomal del sitio-A estabiliza a ArfA, de manera que su extremo amino interactúa con RF2 induciendo su estado activo, es decir, una conformación abierta que permite la interacción entre el motivo GGQ de RF2 y el centro peptidil-transferasa, y por lo tanto la hidrólisis del peptidil-tRNA que provoca la liberación del ribosoma (Demo *et al.*, 2017; Huter *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en *E. coli*, el RNAm de *arfA* adopta una estructura de horquilla en su extremo 3', que es reconocida y escindida por la RNAsa III, la cual remueve los últimos 18 codones del marco de lectura. Cabe resaltar que, experimentos anteriores demostraron que esta proteína es funcional con tan solo 53 aminoácidos y es capaz de sostener la viabilidad celular en las mutantes *ssrA* (Garza-Sánchez *et al.*, 2011).

El RNAm de *arfA* puede formar un complejo *non-stop* por la terminación prematura de su transcripción o por la ausencia de un codón stop (debido a la actividad de la RNAsa III), lo cual resulta en el etiquetado de la proteína codificada por el sistema de trans-traducción y su rápida proteólisis. Sin embargo, si la actividad del sistema de trans-traducción es limitada, ya sea por una falla en tmRNA o SmpB, las cadenas

peptídicas de ArfA que no han sido marcadas son liberadas y aumentan la capacidad de rescate de ribosomas (Chadani *et al.*, 2011; Garza-Sánchez *et al.*, 2011). Esta vía de regulación probablemente sirve para mantener bajos los niveles de ArfA cuando hay suficiente actividad de tmRNA, lo que impide la competencia entre los sistemas de rescate de ribosomas.

ArfB se identificó en una cepa de *E. coli* que carecía de *ssrA* y *arfA*, y se demostró que su sobreexpresión restaura la viabilidad de la cepa doble mutante *ssrA-arfA* (Chadani *et al.*, 2011).

El dominio amino terminal de ArfB tiene homología con el dominio catalítico de RF2, el cual contiene a los aminoácidos GGQ, esenciales para la actividad hidrolítica sobre el peptidil-tRNA y un extremo carboxilo que adopta la conformación de una α -hélice extendida, ambos dominios están conectados por aproximadamente 12 aminoácidos que adopta una forma extendida en el ribosoma (Keiler, 2015; Huter *et al.*, 2017).

El rescate de ribosomas por ArfB (Fig. 7-B) se lleva a cabo cuando el dominio carboxilo censa y se une al complejo *non-stop*, de manera que, el dominio amino que contiene el motivo GGQ se establece cerca del sitio de hidrólisis peptidil-tRNA, de esta manera, se realiza la hidrólisis del polipéptido naciente y se libera el ribosoma atrapado (Keiler, 2015; Huter *et al.*, 2017).

De manera similar al sistema de trans-traduccion, ArfA y ArfB liberan a los ribosomas que se encuentran atrapados en complejos *non-stop*, pero no producen un péptido o un RNAm marcado para su degradación.

2 Antecedentes

2.1 La vía GacA-Rsm y su efecto en la producción de PHB y alquilresorcinoles

Una mutación en el gen *gacA* afecta drásticamente la producción de PHB debido a la regulación negativa que ejerce RsmA sobre sus genes blancos, los RNAm *phbR* y *phbB*. Esto se debe a que no está presente GacA, el activador transcripcional de los genes *rsmZ1-8* y *rsmY*, y por lo tanto, la actividad de RsmA no puede ser antagonizada. En contraste, existe una sobreproducción de PHB en la cepa mutante *rsmA*⁻ y una reducción en una mutante *rsmZ1*⁻ (Fig. 8-B)

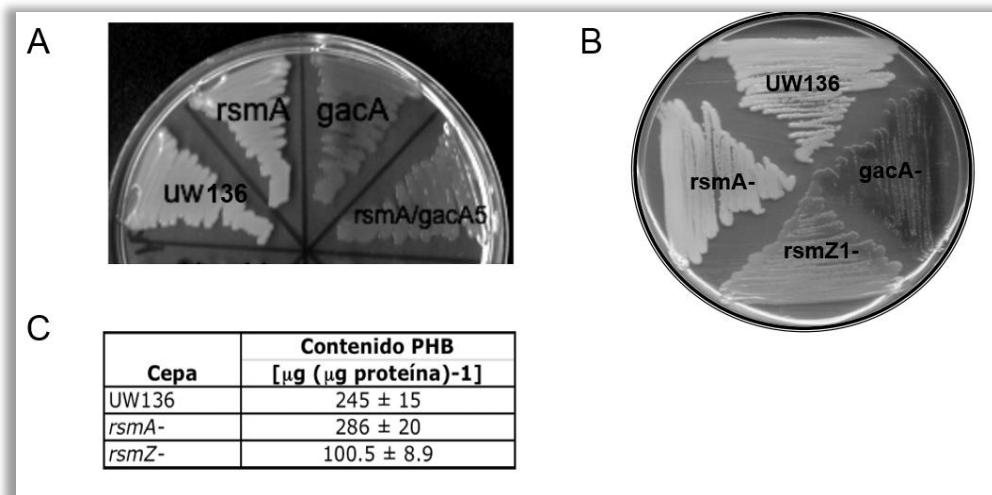


Fig. 8. Prueba de opacidad para cuantificación cualitativa de distintas cepas de *Azotobacter vinelandii*. A) Se presentan las cepas UW136, *rsmA*⁻, *gacA*⁻, *rsmA*⁻ *gacA*⁻. B-C) Fenotipo de opacidad y cuantificación de PHB de las cepas UW136, *rsmA*⁻, *gacA*⁻, y *rsmZ1*⁻. (Hernández-Eligio, 2012).

Se generó la cepa doble mutante *rsmA*⁻ *gacA*⁻, demostrando que la mutación *gacA*⁻ es epistática sobre la mutación *rsmA*⁻ (Fig. 8), ya que el fenotipo es similar al de la mutante sencilla *gacA*⁻, sugiriendo la existencia de una vía alterna dependiente de GacA e independiente del sistema Rsm que controla la síntesis de ese polímero (Hernández-Eligio, 2012). Por otra parte, Romero *et al.*, 2016, demostraron que la vía GacA-Rsm también se encuentra involucrada en la síntesis de ARs (Fig. 9). Los

fenotipos obtenidos para las cepas *gacA*⁻ y *rsmA*⁻ fueron los esperados de acuerdo al modelo de regulación GacA-RsmA/RsmZ, es decir, una disminución y un aumento en la producción de ARs, respectivamente.

Sin embargo, al igual que la síntesis de PHB, la síntesis de ARs no se recuperó en la cepa *rsmA*⁻ *gacA*⁻, incluso con la adición de acetoacetyl-CoA (co-inductor de activación transcripcional). Tras la cuantificación de transcrito de *arpR* y *arsA* en esta cepa, se llegó a la conclusión de que GacA ejerce una regulación adicional sobre la expresión del operón *arsABCD* a través de una ruta independiente de ArpR.

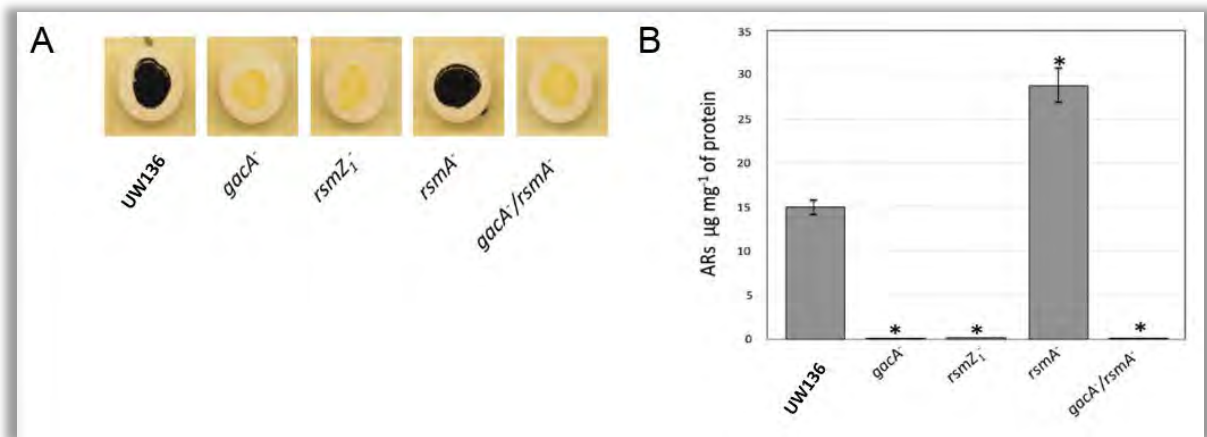


Fig. 9. Fenotipo de ARs en distintas cepas de *Azotobacter vinelandii*. A) Prueba cualitativa de ARs con tinción Fast Blue. B) Cuantificación de ARs. Se muestran las cepas UW136, *rsmA*⁻, *gacA*⁻, *rsmA*⁻ *gacA*⁻ y *rsmZ1*⁻ (Romero *et al.*, 2016).

Cabe mencionar que las vías mencionadas anteriormente, son independientes del factor σ^s , puesto que en la mutante *gacA*, se detectó solo una reducción del 20% de la proteína RpoS (Trejo *et al.*, 2017; Romero *et al.*, 2016).

2.2 Identificación de otros genes regulados por GacA

Con la finalidad de buscar una vía alterna a Rsm que regule la biosíntesis de PHB a través de GacA, Hernández-Eligio, 2012, diseñó un algoritmo en lenguaje Perl para la búsqueda de posibles blancos de GacA en las regiones intergénicas del genoma de *A. vinelandii* considerando el sitio de unión del regulador de respuesta de GacA conocido como caja GacA que presenta la secuencia TGTAAG N6 CCTACA (Hernández-Eligio, 2012).

Los posibles blancos correspondieron a los genes *rsmZ* y al gen *Avin08930*. Cabe mencionar que corriente arriba de *Avin08930* está presente *Avin08960* un parálogo de *Avin08930*. *Avin08930* solo se encuentra en cepas de *Azotobacter vinelandii*, mientras que *Avin08960* se encuentra presente en *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter beijerinckii* y distintas especies del genero *Pseudomonas* (Fig. 10).

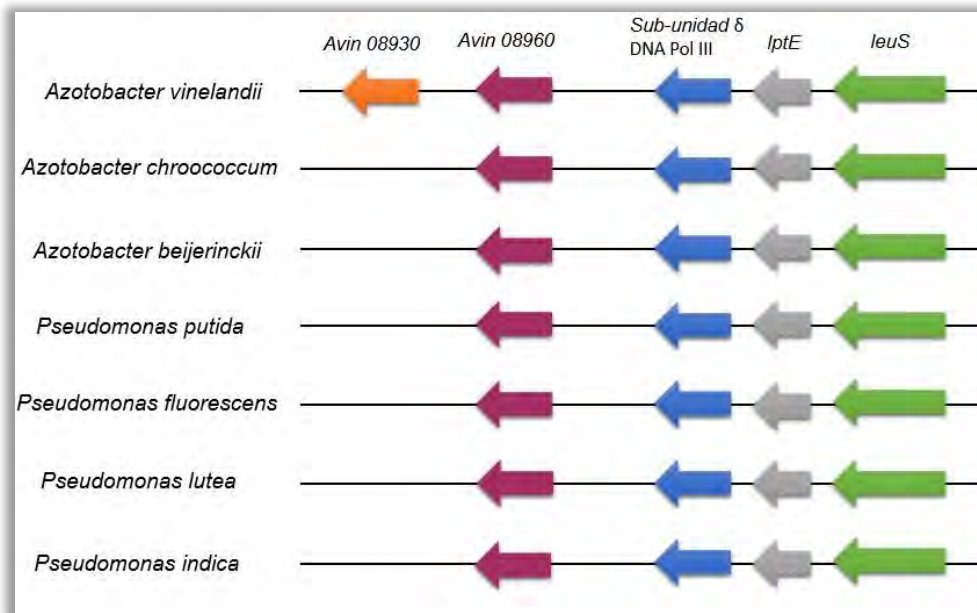


Fig. 10. Organización génica de *Avin08930* y *Avin08960* y su presencia en otras especies bacterianas.

Para conocer si el gen *Avin08930* al igual que *GacA*, participa en la regulación de la síntesis de PHB y ARs, Hernández-Eligio, 2012, generó cepas con mutación en los genes *Avin08930* y *Avin08960* por delección parcial de los genes e inserción de cassetes de resistencia a Tetraciclina y Gentamicina, respectivamente (Fig. 11B-C) La doble mutante *Avin08930/Avin08960* se generó por transformación con DNA cromosomal de la mutante *Avin08960* sobre la mutante *Avin08930*.

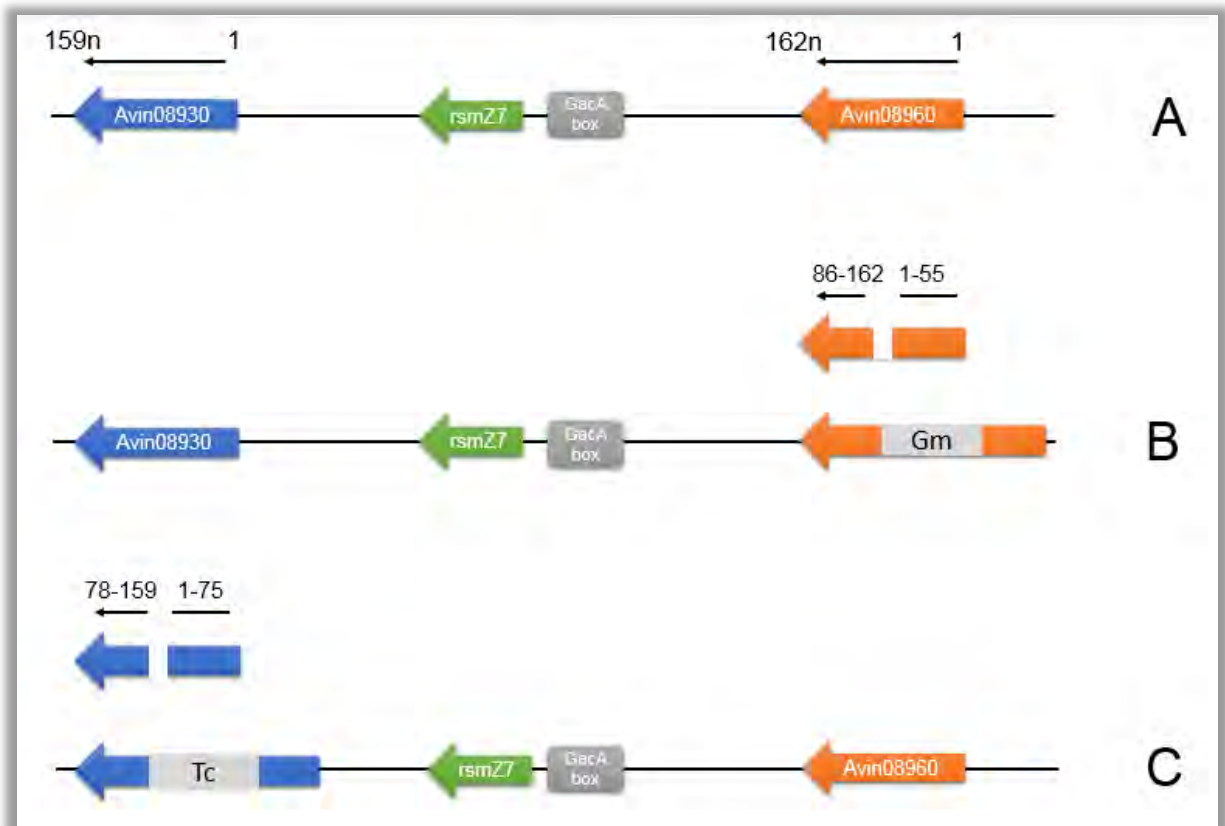


Fig. 11. Mapa físico de la región cromosomal *Avin 08960-rsmZ7-Avin08930* de *Azotobacter vinelandii*. A) UW136. B) Mutación por delección parcial del gen *Avin08960*. C) Mutación por delección parcial del gen *Avin08930*.

Posteriormente, Bedoya, 2016 (Datos no publicados), realizó la cuantificación de PHB y ARs en las cepas *Avin08930* y *Avin08960*. Como se muestra en la figura 12, la cepa mutante *Avin08930* presenta una disminución en la producción de PHB al observar el fenotipo de opacidad, lo cual se corrobora con la cuantificación del polímero cuya producción se ve reducida un 68%. Por otro lado, la cepa mutante

Avin08960 tiene una disminución del 67.5%. La cepa doble mutante también muestra un efecto negativo del 68% en la síntesis de PHB (Fig. 12-B) (Bedoya, 2015. Datos no publicados).

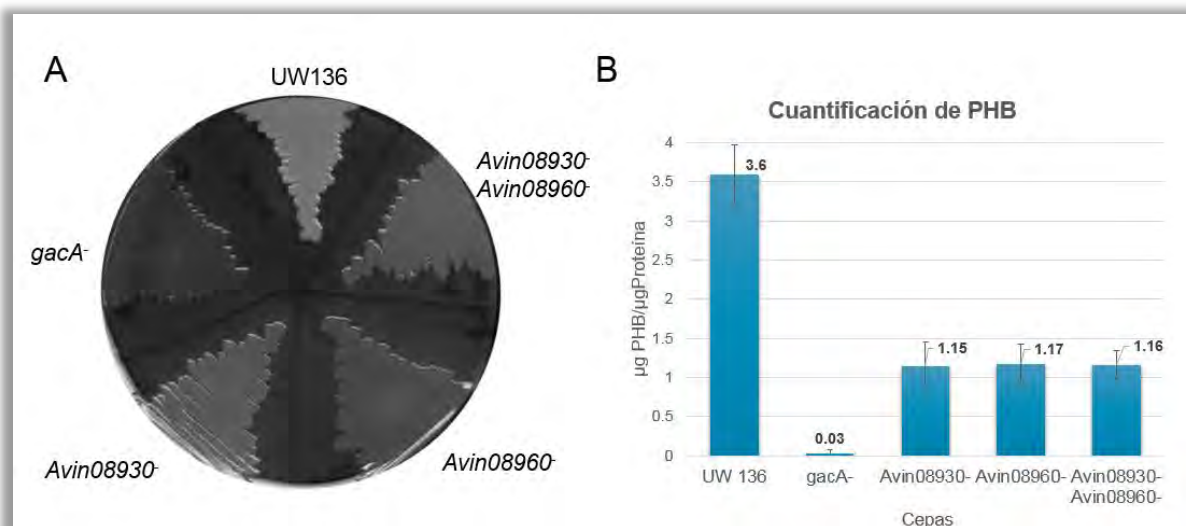


Fig. 12. A) Fenotipo de opacidad en cultivo en placa PY sacarosa 2%. B) Cuantificación de PHB por el método espectrofotométrico Law y Splecky. Se presentan las cepas UW136, *gacA*-, *Avin08930*-, *Avin08960*-, *Avin08930* *Avin08960*- (Hernández-Eligio, 2012; Bedoya, 2015 Datos no publicados).

En cuanto a la producción de alquilresorcinoles (Fig. 13) podemos notar que no se observa un efecto de reducción en la cepa *Avin08960* ya que presenta un fenotipo de producción de ARs similar a la cepa silvestre. Por otro lado, la cepa mutante *Avin08930* presenta una disminución de 61% en la producción de ARs. La cepa doble mutante tuvo un fenotipo similar al de la cepa *Avin08930*- con una disminución de 56%, por lo que podemos atribuir el resultado obtenido a la ausencia del gen *Avin08930* (Bedoya, 2016. Datos no publicados).

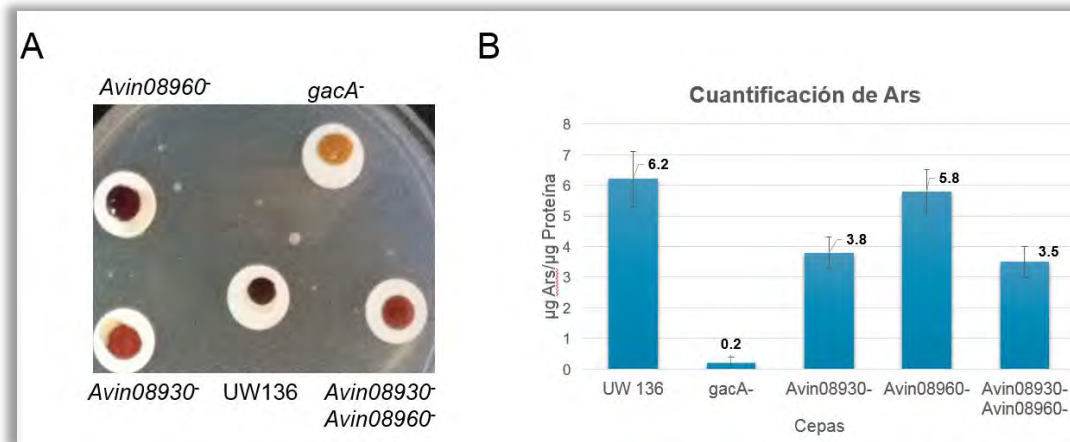


Fig. 13. A) Análisis de Fast-Blue para la determinación cualitativa de ARs. B) Cuantificación de ARs. Se presentan las cepas UW136, *gacA*⁻, *Avin08930*⁻, *Avin08960*⁻, *Avin08930*⁻ *Avin08960*⁻ (Bedoya, 2016, Datos no publicados).

3 Hipótesis

Con base en lo anterior, se propone que el gen *Avin08930* participa en una vía de regulación a nivel transcripcional y/o traduccional que controla la síntesis de polihidroxi butirato y alquilresocinoles en *Azotobacter vinelandii*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Investigar la función del gen *Avin08930* en la regulación y síntesis de polihidroxi butirato y alquilresocinoles.

4.2 Objetivos particulares

- I. Análisis bioinformático del gen *Avin08930*.
- II. Identificar los promotores del gen *Avin08930* así como el inicio de la transcripción.
- III. Determinar si el gen *Avin08930* forma parte de un transcrito liderado por *rsmZ7*.
- IV. Determinar el efecto de la inactivación del gen *Avin08930* en la transcripción y traducción de los genes biosintéticos *arpR*, *phbR*, *arsA* y *phbB*.

5 Métodos

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*, así como los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1, 2 y 3, respectivamente.

Cepa	Descripción	Referencia
UW 136	Mutación en <i>AlgU</i> derivada de WT, Rif ^r	Colección del laboratorio
<i>ssrA</i>	UW136 con mutación en <i>ssrA</i> -Km ^r	Muriel-2012.
<i>arfA1</i>	UW136 con mutación en <i>Avin08930</i> -Tc ^r	Hernández-Eligio; 2012.
<i>arfA2</i>	UW136 con mutación en <i>Avin08960</i> -Gm ^r	Hernández-Eligio; 2012.
<i>arfB</i>	UW 136 con mutación en <i>arfB</i> -Km ^r	Rodríguez-Martínez, 2017.
UW136: <i>phbR</i> :gusA Tp	UW136 con fusión transcripcional <i>phbR</i> -gusA Tc	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>phbR</i> :gusA Td	UW136 con fusión traduccional <i>phbR</i> -gusA Tc	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>phbB</i> :gusA Tp	UW136 con fusión transcripcional <i>phbB</i> -gusA Tc	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>phbB</i> :gusA Td	UW136 con fusión traduccional <i>phbB</i> -gusA Tc	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- <i>phbR</i> :gusA Tp	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> y fusión transcripcional <i>phbR</i> -gusA Tc/Km	Bedoya; Datos no publicados.

UW136: <i>arfA1</i> :- <i>phbR</i> :gusA Td	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión traduccional <i>phbR</i> -gusA Tc/Sp	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- <i>phbB</i> :gusA Tp	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión transcripcional <i>phbB</i> -gusA Tc/Sp	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- <i>phbB</i> :gus Td	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión traduccional <i>phbB</i> -gusA Tc/Km	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- pumA <i>arpR</i> Tp	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión transcripcional <i>arpR</i> -gusA Tc/Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- pumA <i>arpR</i> Td	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión traduccional <i>arpR</i> -gusATc/Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- pumA arsA Tp	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión transcripcional <i>arsA</i> -gusATc/Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arfA1</i> :- pumA arsA Td	UW136 con mutación en <i>arfA1</i> - y fusión traduccional <i>arsA</i> -gusA Tc/Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arpR</i> :gusA Tp	UW136 con fusión transcripcional <i>arpR</i> -gusA Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arpR</i> :gusA Td	UW136 con fusión traduccional <i>arpR</i> -gusA Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arsA</i> :gusA Tp	UW136 con fusión transcripcional <i>arsA</i> -gusA Gm	Bedoya; Datos no publicados.
UW136: <i>arsA</i> :gusA Td	UW136 con fusión traduccional <i>arsA</i> -gusA Gm	Bedoya; Datos no publicados.

<i>E. coli</i> DH5 α	endA1 hsdR17 supE44 thi-1 λ - recA1 gyrA96 relA Δ lacU169 ϕ 80 (Δ lacZ Δ M15)	Hannahan, 1983.
-----------------------------	--	-----------------

Tabla 1. Cepas de *A. vinelandii* y *E. coli* utilizadas en el presente trabajo.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pJET 1.2	Vector de clonación	Fermentas
pJET 1.2-8930	pJET con un fragmento que incluye el gen <i>Avin08930</i> y su región reguladora	Hernández-Eligio 2012.
pJET 1.2-rsmZ7-ArfA1	pJET con un fragmento que incluye el gen <i>rsmz7</i> y <i>arfA1</i>	Este trabajo.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Referencia
8930-708 Fw	TCA GGC ACC GCA GGA G	Hernández-Eligio; 2012.
8930-1300 Rv	TCG ATT CCC TGC TGC TGT AT	Hernández-Eligio; 2012.
08960-Fw	GTC GAT GCC GTT GTC GAT G	Este trabajo.
08960-Rv	TGC CTA CCT GTG GAT GAC	Este trabajo.
P-extension1	GGG ATC TGG CCT TGT TGG	Este trabajo.
rsmZ7-Fw	ACC AAG ACG TCG AAG G	Este trabajo.
rsmZ7-Rv	GTT GCC CTC GCC GTT C	Este trabajo.
arfA1-Fw	GTC GCT TCC GGC CCA AC	Este trabajo.
arfA1-Rv	TCA GGC GGC CAG AAA GAC	Este trabajo.
Tc-Rv	CTC ATC GTC ATC CTC GGC AC	Este trabajo.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

5.2 Medios y Condiciones de Cultivo

Las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en los siguientes medios:

Medio mínimo Burk-Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/L): $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 160; $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$, 0.2; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 5; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 7.3; $Na_2SO_4 \cdot 18.3$; K_2HPO_4 , 8; KH_2PO_4 , 2; Sacarosa, 200. El pH se ajustó a un valor de 7.2. Se agregó agar bacteriológico 15 (g/L) para solidificar el medio. En medio líquido *A. vinelandii* fue crecido a 30°C con una velocidad de agitación de 200 rpm en matraces de 125 ml con un volumen de medio correspondiente a la quinta parte del volumen total del matraz (25ml).

Las cepas con fusiones génicas en *phbR* y *phbB* se crecieron en medio BS líquido a 30°C con una velocidad de agitación de 200 rpm con un preinóculo de 24 h, posteriormente, se inocularon 250 µl del cultivo problema durante 48 h en 25 ml de medio PY líquido. En cuanto a las cepas con fusiones génicas en *arpR* y *arsA*, se crecieron en medio BS líquido a 30°C con una velocidad de agitación de 200 rpm con un preinóculo de 24 h, y se inocularon 250 µl del cultivo problema durante 48 h en 25 ml de medio BS líquido. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4, 500 r.p.m. y se lavó con 25 ml de $MgSO_4$ 10mM, este proceso se realizó 4 veces para eliminar el exceso de sacarosa. A continuación, se resuspendió la pastilla obtenida de la última centrifugación con 25 ml de medio Burk-butanol y se creció durante 72 h.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron 24 h a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) cuya composición es la siguiente (g/L): peptona de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5. En medio líquido se creció a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm.

Los antibióticos usados fueron: tetraciclina 30 y 150 µg/ml (Tc); gentamicina 0.5 y 10 µg/ml (Gm); kanamicina 1 y 10 µg/ml (Km); espectomicina 100 µg/ml (Sp); ampicilina 100 µg/ml (Amp); rifampicina 100 µg/ml (Rif).

5.3 Procedimiento con ácidos nucleicos

La extracción de DNA de plásmido se realizó con el kit de purificación GeneJET Plasmid Miniprep, mientras que la purificación de productos de PCR se llevó a cabo con el kit GeneJET Gel Extraction Kit, ambos de fermentas.

Para las amplificaciones de los genes de interés por PCR, se utilizó cDNA y DNA cromosomal de *A. vinelandii*, y DNA de plásmido de *E. coli*. Las enzimas utilizadas fueron Taq DNA Polimerasa y DNA Polimerasa Phusion High-Fidelity de Fermentas.

5.4 Purificación de DNA cromosomal

Se creció a *A. vinelandii* en 100ml de medio Burk-sacarosa durante 48 hr a 200 rpm y 30°C. Se separaron las células por centrifugación y se lavaron con buffer TE 20/50 (50 mM de Tris-Cl, 20mMd de EDTA pH 8). La pastilla celular se resuspendió en 450 µl de buffer TE 50/20. Posteriormente, se agregó 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Se agregó 50 µl de proteasa (10 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Después se añadió 50 µl de SDS 10% y se incubó 15 min a 37°C. Se agregó 100 µl de NaCl 5M, se mezcló y se incubó durante 10 min a 65°C. Se adicionó 80 µl de solución CTAB 10% NaCl 0.7 M y se incubó durante 15 min a 65°C. Se realizó una extracción con 500 µl de solución de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó durante 5 min a 13, 000 r.p.m., recuperando el sobrenadante. Se extrajo con 1 volumen de una solución de Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1. Se extrajo con 1 volumen de una solución de Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se recuperaron las hebras de DNA por centrifugación. Se añadió 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó y se decantó, esto punto se llevó a cabo dos veces más. Se secó y se resuspendió la pastilla en 30 µl de RNAasa (20µg/ml). Se incubó 1 hr a 37°C para que actuara la RNAasa.

5.5 Purificación de RNA total

Se creció a *A. vinelandii* en 25 ml de medio Burk-sacarosa durante 24 h (precultivo). Posteriormente se inoculó 25 ml de medio BS con precultivo al 1% y se creció durante 48 h. Se recuperaron las células por centrifugación, se resuspendió la pastilla en 60 µl de H₂O con DEPC al 0.1% y se añadieron 5 µl de DEPC al 0.5%. Se adicionó 200 µl de acetona helada, se mezcló y se centrifugó a 10, 000 r.p.m. durante 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 µl de DEPC al 0.1%, se añadieron 10 µl de lisozima (10mg/ml) preparada con DEPC al 5% y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Se agregó 1 µl de proteinasa K (100µl/ml) y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se añadieron 3.5 µl de DEPC al 5%, 200 µl de Fenol (precalentado a 70°C) y 150 µl de cloroformo, se mezcló manualmente y se adicionaron 120 µl de DEPC al 0.1% y se centrifugó a 12, 000 r.p.m. durante 5 minutos. Se removió la fase acuosa y se adicionó 1 ml de etanol absoluto. Se dejó precipitando durante una noche y se centrifugó a 12, 000 r.p.m. durante 5. Por último, se resuspendió la pastilla en 50 µl de DEPC al 0.1%.

5.6 Extracción de DNA de plásmido (Técnica del Perclorato)

Se creció a *E. coli* en 10 ml de medio LB durante 24 hrs. Se centrifugó 1.5 ml de cultivo y se recuperaron las células. Se resuspendió la pastilla en 175 µl de TES (15% Sacarosa, 50mM TROS pH 8.5, 50mM EDTA pH 8.0), se añadieron 25 µl de lisozima (10mg/ml) y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se añadieron 400 µl de agua helada y se incubó durante 15 minutos a 73°C. Se centrifugó y se descartó el pellet con un palillo. Se añadieron 60 µl de NaClO₄ 5M y 600 µl de isopropanol, se mezcló y se centrifugó durante 15 minutos. Se lavó el pellet con 1ml de etanol al 70% y se centrifugó a 12, 000 r.p.m. Se secó en savant durante 15 minutos a 60°C. La pastilla se resuspendió en 50 µl de RNAsa (20 µg/ml).

5.7 Transformación de *E. coli*

Se utilizaron 200 μ l de células competentes de *E. coli DH5 α* y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se dio un shock de calor durante 2 minutos a 42°C. Se agregó 1 ml de medio LB líquido sin antibiótico y se incubó durante una hora a 37°C con agitación. Se platearon 100 μ l y 200 μ l en medio LB con Amp.

5.8 Ensayo de extensión del iniciador (Primer extension)

El ensayo de extensión del iniciador se realizó usando 50 μ g de RNA total purificado a partir de células de las cepas UW136 y *arfA1* cultivadas durante 48 hr en medio BS. La reacción de extensión se realizó marcando el oligonucleótido con gamma ATP³² (30 μ Ci) utilizando 2 μ l de la enzima polinucleótido cinasa de Roche y 20 pmol del oligonucleótido P-extension1, para posteriormente incubar durante 1 hr a 37°C. Para obtener el cDNA se utilizó 2 μ l de la enzima AMV (Roche) a una temperatura de extensión de 42°C, este se precipitó usando acetato de amonio 10M más 100 μ L de etanol absoluto, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, se lavó con etanol al 70% al menos en tres ocasiones y finalmente el pellet resultante fue resuspendido en 8 μ L de agua, y al que además se le agregaron 4 μ L de colorante.

Para realizar la reacción de secuencia se utilizó el kit Termo SequenaseTM Cycle Sequencing Kit de USB. El DNA templado (pJET 1.2-8930) se obtuvo por purificación de columna a una concentración de 200 ng/ μ l, se añadieron 2 μ l de Buffer 10x, 2 μ l de la enzima Thermostable, 1.5 μ l del oligo kinado y 18 μ l de H₂O. Se añadieron 4 μ l de la mezcla más 4 μ l de cada base (G,A,T,C). La reacción se llevó a cabo con las siguientes indicaciones: 95°C durante 2 minutos por 1 ciclo; 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante dos minutos por 50 ciclos; 72°C durante 10 minutos por 1 ciclo. La reacción se detuvo con 4 μ l de stop mix.

Para el gel de secuencia se utilizó urea 8 M (240 g), acrilamida 40% (Acrilamida 38 g + Bis-acrilamida 2 g + H₂O 100 ml) 87.5 ml, TBE 10x 50 ml y 120 ml de H₂O.

5.9 Determinación de operón liderado por *rsmZ7*

Para determinar la presencia de un operón formado por *rsmz7* y *arfA1* se sintetizó cDNA a partir de RNA de *A. vinelandii* utilizando el Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis de Fermentas y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los oligonucleótidos reversos *rsmz7*-Rv y *arfA1*-Rv. Posteriormente, se llevaron a cabo una serie de RT-PCR para verificar la síntesis correcta de cDNA y la presencia del operón. La combinación de oligos fue la siguiente: *rsmZ7*-Fw + *rsmZ7*-Rv; *arfA1*-Fw + *arfA1*-Rv; *rsmZ7*-Fw + *arfA1*-Rv. Los controles positivos se obtuvieron a partir de una PCR utilizando DNA cromosomal de *A. vinelandii* UW136. Los controles negativos se hicieron a partir de una PCR utilizando únicamente los oligonucleótidos sin DNA para amplificar.

5.10 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína de las cepas utilizadas para la determinación de la actividad de β -glucuronidasa se realizó por el método de Lowry *et al.*, (1951). Los ensayos se realizaron por triplicado. El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1ml de medio de cultivo y se centrifugo a 13, 000 r.p.m. durante 5 min para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en 1 ml de $MgSO_4$ 10mM. Se tomaron 20 μ l de células resuspendidas y se llevó a 200 μ l con H_2O . Se añadió 1 ml de solución reactiva, se agitó y se dejó reposar 10 min. Se añadió 0.1 ml de reactivo de Folin diluido con 1 vol. de H_2O y se dejó reposar 30 min. Por último, se leyó absorbancia a 625 nm en el espectrofotómetro. Simultáneamente se corrió una curva patrón con las siguientes concentraciones en μ g/ml de albumina: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 600.

Solución reactiva:

Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: Tartrato de Na y K 2%

Solución C: $CuSO_4$ 1%

Se mezcló 0.5 ml de solución C + 0.5 ml de solución B + 49 ml de solución C.

5.11 Determinación de actividad β -Glucuronidasa

La determinación de actividad de β -Glucuronidasa se realizó por el método de Wilson *et al.*, (1996). Los ensayos se realizaron por triplicado. El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1ml de cultivo y se centrifugo a 13, 000 r.p.m. durante 5 min para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en 500 μ l y 200 μ l de $MgSO_4$ 10mM para las cepas con fusiones transcripcionales y traduccionales respectivamente. Se tomaron 20 μ l (fusiones transcripcionales) y 50 μ l (fusiones traduccionales) de muestra (Vol Rx) y se agregaron 710 μ l de Buffer Z. Al mismo tiempo se preparó un blanco con 730 μ l de Buffer Z y se procesó junto con las muestras. Se agregó 10 μ l de solución de lisozima 10mg/ml y se incubaron a 37°C durante 5 min. Se agregó 10 μ l de solución Tritón al 10% y se agitó. Se agregó 100 μ l de solución PNPG 12.5 mM, se incubaron a 37°C los muestras con fusiones traduccionales y a temperatura ambiente las muestras con fusiones transcripcionales, se cronometró el tiempo de inicio de la reacción (t Rx). Se añadió 150 μ l de solución Na_2CO_3 1.2 M para detener la reacción. Se centrifugaron las muestras durante 5 min a 13, 000 r.p.m. Por último, se leyó absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro.

Buffer Z: 3 ml K_2HPO_4 0.5M + 2 ml KH_2PO_4 0.5M + 0.2 ml EDTA 0.25M + 0.1 ml DTT 0.25M.

Para calcular la actividad de β -Glucuronidasa usamos la siguiente formula:

$$U \beta\text{-Gluc} = \frac{D.O. (405 \text{ nm}) \times 1000}{(0.018)(t \text{ Rx en minutos})(Vol \text{ Rxn } \mu\text{L})(\mu\text{g Proteina/mL})}$$

$$1 \text{ U} = \text{nmoles de PNPG producidos/minuto}/\mu\text{g proteina}$$

Cabe mencionar que las fusiones génicas traduccionales y transcripcionales utilizadas para los genes *phbB* y *phbR* fueron diseñadas por Hernandez-Eligio *et al.*, 2012 y por Gallegos, 2013. Todas las fusiones génicas se encuentran flanqueadas por regiones de aproximadamente 460 pb que corresponden a la región reguladora y parte de la codificante del gen *Avin12230*, que codifica para una proteína hipotética que presenta homología con transposasas y fue elegido como sitio neutro de cointegración para las fusiones génicas. Por otra parte, las fusiones génicas traduccionales y transcripcionales utilizadas para los genes *arsA* y *arpR* fueron diseñadas por Muriel-Millán, 2015, el sitio neutro utilizado para introducir las fusiones fue el gen *meIA*. Las fusiones génicas se integran al cromosoma en un evento de doble recombinación.

5. 12 Construcción del plásmido *pJETrsmZ7-ArfA1*

Se utilizaron los oligos 8930-1300 Rv y Tc-Rv para levantar un fragmento que incluyera el gen *rsmZ7* usando como templado DNA cromosomal de la mutante *arfA1*. Posteriormente, el fragmento se ligó en el vector pJET 1.2 siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido construido se nombró *pJETrsmZ7-ArfA1*. Se transformó a *E. coli DH5α* con el plásmido, se seleccionaron colonias por resistencia a Amp y las candidatas fueron cultivadas en medio LB para extracción de plásmido por técnica de perclorato. Se llevó a cabo una digestión con Bgl II, se obtuvo una banda de 2.9 kb correspondiente al vector pJET 1.2 y una banda de 1.300 kb aproximadamente correspondiente al fragmento clonado. Posteriormente se purificó el plásmido por GeneJET Plasmid Miniprep y fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6 Resultados

6.1 Análisis bioinformático del gen *Avin08930*

6.1.1 Predicción funcional del gen *Avin08930*

Como se mencionó anteriormente, el gen *Avin08930* se identificó como resultado de una búsqueda de genes blancos de GacA, a través de un algoritmo en lenguaje Perl, en el cual se consideró el sitio de unión del regulador de respuesta GacA conocido como caja GacA.

Sin embargo, el análisis reciente llevado a cabo en este estudio, reveló que la caja-GacA identificada como parte del contexto genético de *Avin08930* en realidad forma parte de la región reguladora del gen *rsmZ7* (Fig.14), el cual codifica para uno de los RNA pequeños activados por GacA que hace parte del sistema de regulación Rsm. Este error de localización de la caja GacA se debió a una falta de actualización en las bases de datos, ya que cuando se realizó la búsqueda de cajas GacA, el gen *rsmZ7* no se encontraba anotado. Sin embargo, debido a que la inactivación de *Avin08930* causó un fenotipo de disminución de PHB y ARs (Fig. 12; Fig. 13), se decidió trabajar en su caracterización en este estudio.

El gen *Avin08930* codifica para una proteína de 52 aminoácidos y su parólogo *Avin08960* localizado río arriba, codifica para una proteína de 53 aminoácidos, que presentan una identidad entre sí del 83%, ambos genes se encuentran flanqueando al gen *rsmZ7* (Fig. 14).

La secuencia consenso de los genes *Avin08930* y *Avin08960* se comparó con las depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), empleando la herramienta BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000). Se determinó que *Avin08930* y *Avin08960* posiblemente son homólogos del factor alternativo de rescate de ribosoma A (ArfA) ya que tienen un porcentaje de identidad de secuencia de 44% y 50% respectivamente con la proteína ArfA de *Escherichia coli*.

A partir de esta información y para fines prácticos, se decidió renombrar al gen *Avin08930* como *arfA1* y al gen *Avin08960* como *arfA2*. Cabe resaltar que el fenotipo presente en las cepas mutantes *arfA1* y *arfA2* para ARs y PHB (Fig. 12; Fig. 13), es interesante, ya que se no han sido reportados fenotipos para mutaciones individuales en los genes *arfA* y *arfB* (Keiler, 2015). Las mutaciones en ambos genes fueron confirmadas por PCR (Datos no mostrados).



Fig. 14. Contexto genético de *Avin08930* (*arfA1*).

6.1.2 Estructura del RNAm de *arfA1*

Como se describió anteriormente, en *E. coli*, el RNAm de *arfA* adopta una estructura de horquilla en su extremo 3', que es reconocida y escindida por la RNAsa III, para regular los niveles de ArfA cuando hay suficiente actividad de tmRNA, y de esta manera, evitar la competencia entre los sistemas de rescate de ribosomas.

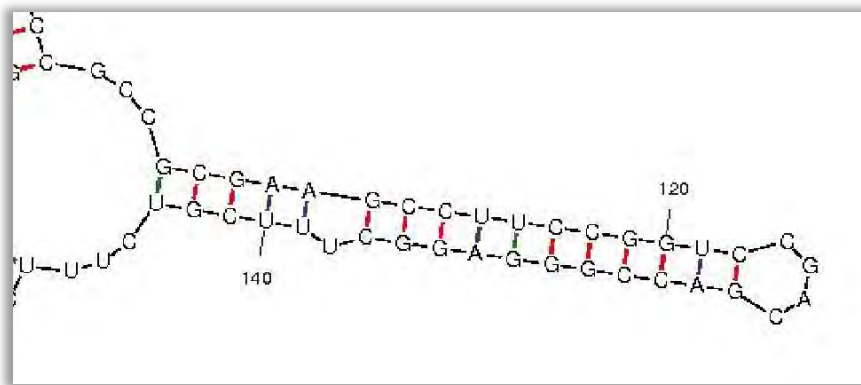


Fig. 15. Estructura secundaria del RNAm de *arfA1* formada en el extremo 3' obtenida con el software MFOLD (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>), se presenta la estructura con una mayor estabilidad.

En *A. vinelandii* la secuencia del RNAm de *arfA1* forma una estructura de horquilla en su extremo 3' por los nucleótidos 107-144, con un tallo formado por 16 pb y un bucle de 4 nucleótidos (Fig. 15).

6.2 El fenotipo en la mutante *arfA1* no se debe a una mutación en el gen *rsmZ7*

Estudios anteriores demostraron que una mutación en el gen *rsmZ1* disminuye la producción de PHB y ARs (Fig. 12; Fig. 13) (Hernández-Eligio, 2012; Romero *et al.*, 2016). Este resultado sugiere que en ausencia del gen *rsmZ1* (RNA regulatorio del sistema Rsm), la concentración de la proteína RsmA es mayor que en la cepa silvestre y ejerce un efecto negativo sobre los RNAm *phbR*, *phbB* y *arpR*, involucrados en la síntesis de PHB y ARs. Considerando lo anterior, surgió la hipótesis de que la ausencia de *rsmZ7* pudiera tener el mismo efecto que la ausencia del *rsmZ1*. Por lo tanto, existía la posibilidad de que el fenotipo mostrado por la mutante *arfA1* fuese resultado de una mutación en el gen *rsmZ7*.

Para descartar la hipótesis anterior, se construyó un plásmido con un fragmento amplificado del gen *rsmZ7* usando como templado DNA cromosomal de la mutante *arfA1*. El plásmido construido se nombró *pJETrsmZ7-ArfA1* y fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

La figura 16 muestra una comparación entre la secuencia obtenida a partir del plásmido *pJET rsmZ7-ArfA1* y la secuencia del gen cromosomal *rsmZ7* de *A. vinelandii*, demostrando que no existe una mutación en el gen *rsmZ7*, y por lo tanto, el fenotipo observado en la cepa mutante *arfA1* no es causado por una mutación en *rsmZ7*.



Fig. 16. Alineamiento de secuencia del plasmido *pJET rsmZ7-ArfA1* y la secuencia genética de *rsmZ7* de *Azotobacter vinelandii* obtenida con el programa ClustalW de BioEdit. Un asterisco (*) indica los nucleótidos que coinciden en ambas secuencias.

6.3 Identificación del inicio de la transcripción de *arfA1*

Uno de los objetivos de este proyecto fue identificar el inicio de la transcripción del gen *arfA1*. El cual se determinó por el ensayo de extensión del iniciador utilizando RNA de la cepa silvestre UW136 y de la mutante *arfA1* obtenido a partir de un cultivo de 48 h en medio líquido Burk-Sacarosa. Como se observa en la Fig. 17 se detectó un probable inicio de transcripción a 142 nt río arriba del codón de inicio ATG en ambas cepas.

Cabe mencionar que el oligonucleótido que se utilizó para realizar este experimento se ubica antes de los nucleótidos eliminados para la construcción de la mutante (Fig. 17-B), de manera que, es posible observar el sitio de inicio de transcripción en la mutante *arfA1*.

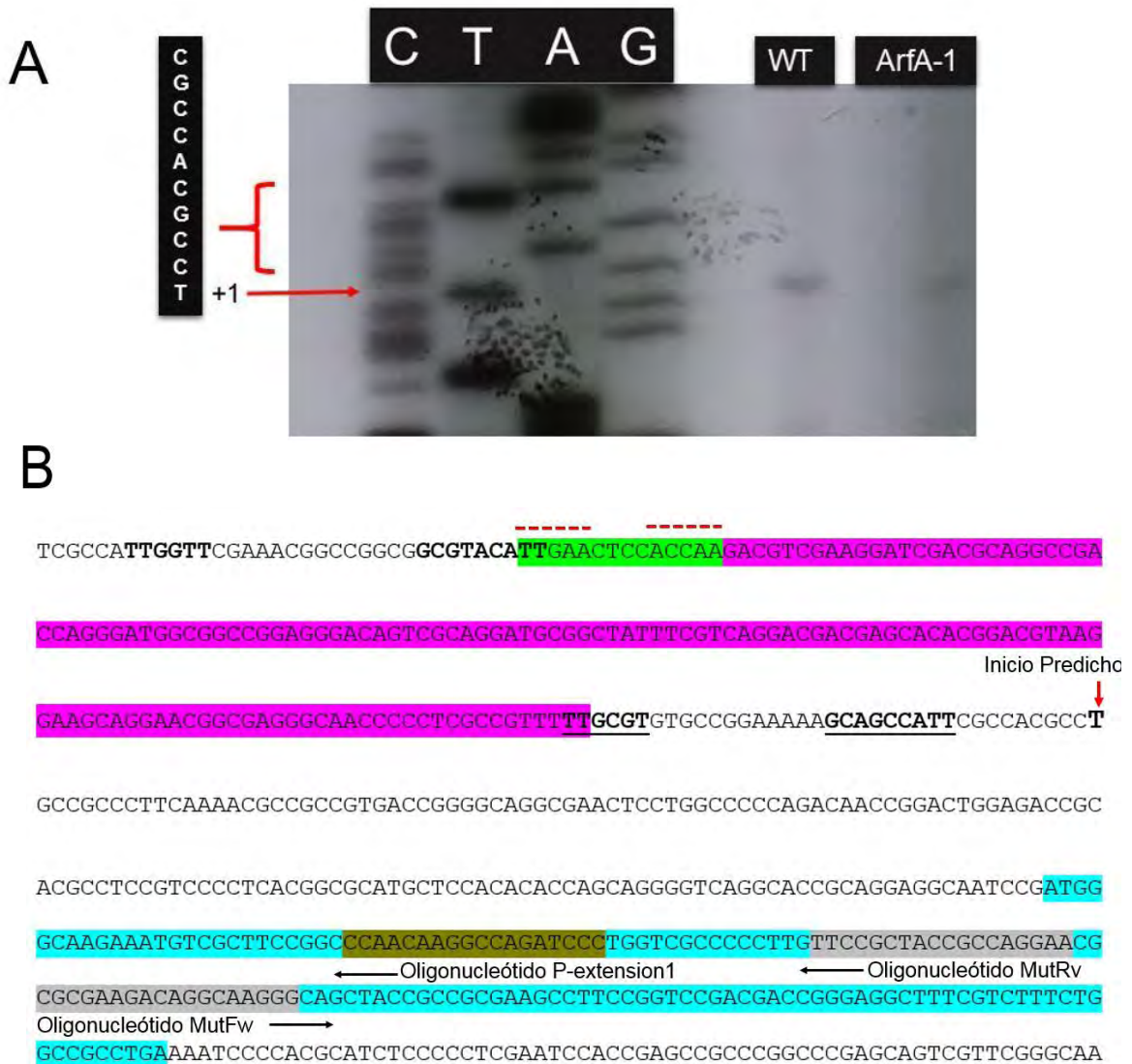


Fig. 17. A) Autorradiografía del ensayo de extensión del iniciador para identificar el sitio de inicio de la transcripción del gen *arfA1* en las cepas UW136 y *arfA1*. B) Secuencia genética de la región reguladora del gen *arfA1*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. *arfA1* se muestra en color turquesa y *rsmZ7* en color rosa. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de la mutante *arfA1* se muestran en color gris. La secuencia consenso para el promotor σ^D (en negritas y subrayado para *arfA1*; en negritas para *rsmZ7*) y la secuencia consenso para FNR (verde) se encuentran indicados. La secuencia complementaria del oligonucleótido utilizado se muestra en color café.

Con la finalidad de identificar posibles promotores (secuencias reconocidas por σ^D , σ^S , etc.) del gen *arfA1*, se realizó un análisis *in silico* mediante los programas Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) y VirtualFootprint

http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php) de la región reguladora de *arfA1* a 85b río arriba del inicio del gen *rsmZ7*.

Se identificó un posible promotor σ^D para *rsmZ7* y un posible sitio de unión para la proteína Fnr (CydR) sensible a cambios en los niveles de oxígeno (Fig. 17-B). No se identificaron promotores σ^D o de otro tipo que correspondan con el sitio de inicio de transcripción detectado para *arfA1*. Sin embargo, de manera visual, se identificó la zona en donde se podría encontrar un posible promotor para σ^D cerca del sitio de inicio de la transcripción y una posible secuencia fue indicada (Fig.17-B).

6.4 *arfA1* se transcribe de manera independiente de *rsmZ7*

En *Pseudomonas putida*, las proteínas Hfq y Crc regulan la expresión de muchos genes en respuesta a señales nutricionales o ambientales, al unirse a RNAm que tienen motivos específicos e inhiben su traducción.

El efecto de estas dos proteínas se antagoniza por los RNA pequeños no codificantes CrcZ y CrcY, los cuales se transcriben a partir de los promotores PcrcZ y PcrcY, respectivamente. La expresión de ambos genes es dependiente del activador transcripcional CbrB y el factor σ^N .

Se reportó que *crcZ* también se puede transcribir desde el promotor del gen inmediato corriente arriba, *cbrB*, un promotor constitutivo débil (Hernández-Arranz *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta el antecedente anterior y dado que no se identificaron posibles promotores para el sitio de inicio de la transcripción de *arfA1* a través del análisis *in silico* realizado, se consideró la posibilidad de que *rsmZ7* y *arfA1* podrían estar organizados en un operón.

Para comprobar esta hipótesis se determinó si existía la presencia de un transcrito *rsmZ7-arfA1*. Para lograr este objetivo se sintetizó cDNA a partir de RNA de la cepa silvestre de *A. vinelandii* obtenido de un cultivo de 48 h en medio BS-líquido tal como

se describe en la sección de métodos. Se realizaron una serie de RT-PCRs para verificar la presencia de transcritos correspondientes a los genes *rsmZ7*, *arfA1* y *rsmZ7-arfA1*. La organización de los oligonucleótidos utilizados se muestra en la figura 18.

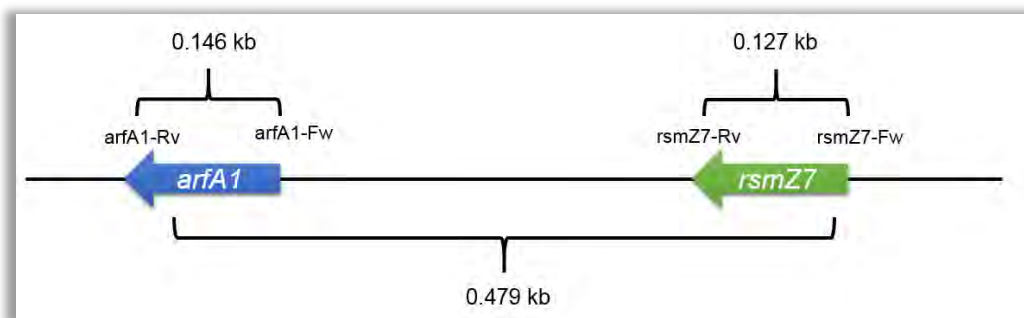


Fig. 18. Representación gráfica que muestra la organización de los oligonucleótidos utilizados para determinar la presencia de un operón formado por *rsmz7* y *arfA1*. Los oligonucleótidos fueron: *rsmz7Fw+rsmz7Rv* que amplifican un fragmento de 0.127 kb; *arfA1Fw+arfA1Rv* que amplifican un fragmento de 0.146 kb; *rsmz7Fw+arfA1Rv* que amplifican un fragmento de 0.479 kb.

Como se muestra en la figura 19-A, se amplificó correctamente el producto del gen *rsmZ7* así como el de *arfA1* (Fig. 19-B), los controles positivos y negativos se obtuvieron correctamente. En contraste, no se obtuvo un producto de amplificación a partir de los oligonucleótidos *rsmz7Fw+arfA1Rv* (Fig. 19-C), por lo que podemos concluir que no existe la presencia de un transcrito *rsmZ7-arfA1* por lo que estos genes no están organizados en un operón.

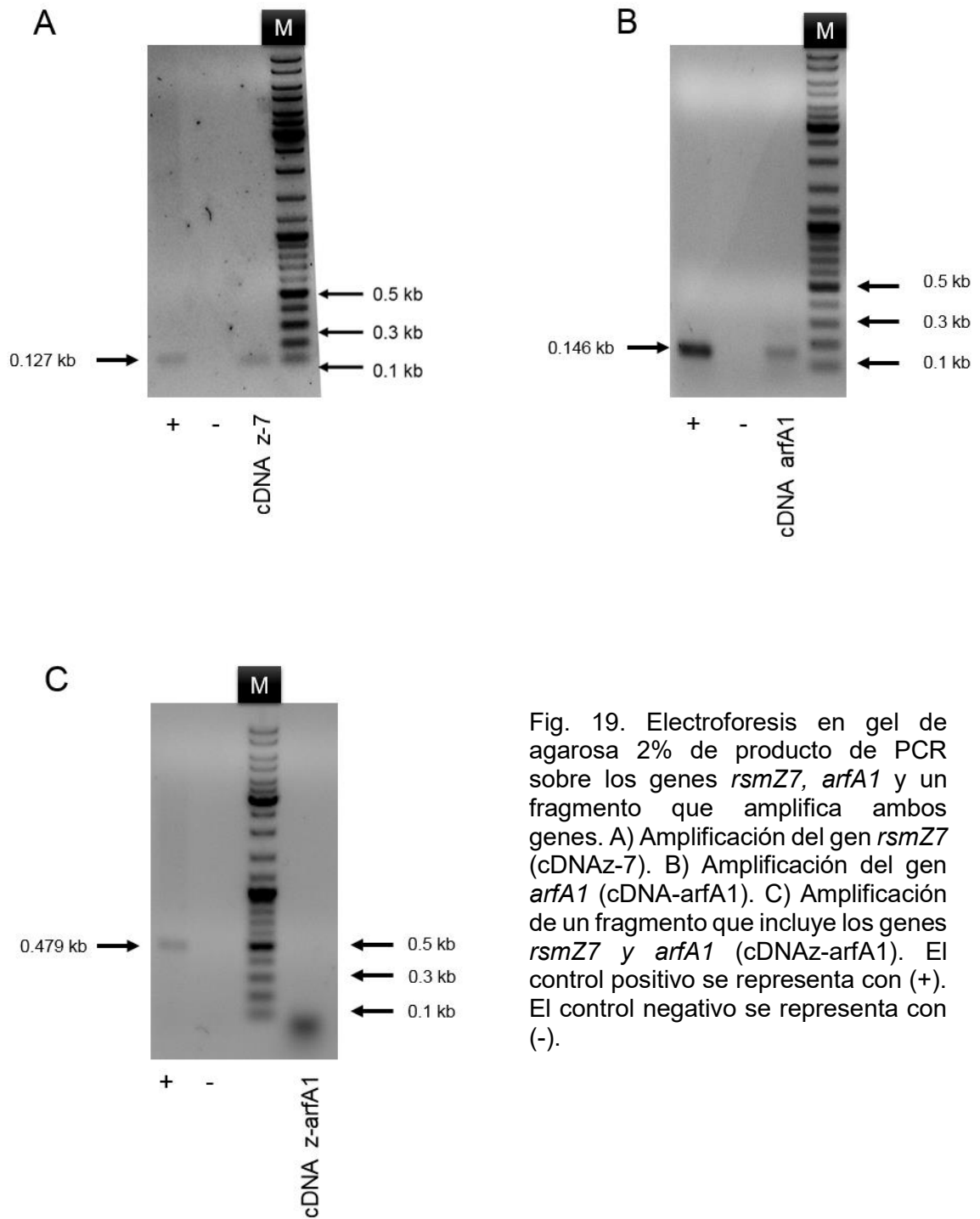


Fig. 19. Electroforesis en gel de agarosa 2% de producto de PCR sobre los genes *rsmZ7*, *arfA1* y un fragmento que amplifica ambos genes. A) Amplificación del gen *rsmZ7* (cDNAz-7). B) Amplificación del gen *arfA1* (cDNA-arfA1). C) Amplificación de un fragmento que incluye los genes *rsmZ7* y *arfA1* (cDNAz-arfA1). El control positivo se representa con (+). El control negativo se representa con (-).

6.5 Inactivación del gen *arfA1* y su efecto en la transcripción y traducción de los genes involucrados en la síntesis ARs y PHB

6.5.1 Expresión de los genes *arpR* y *arsA* en la mutante *arfA1*

La mutante *arfA1* presenta un fenotipo claro en la reducción de la síntesis de PHB y ARs, por lo que se decidió determinar si la inactivación del gen *arfA1* tenía un efecto sobre la transcripción y/o traducción de los genes reguladores y biosintéticos de la síntesis de estos polímeros.

Se realizaron ensayos de determinación de la actividad de β -glucuronidasa en derivadas de la cepa silvestre UW136 y de la mutante *arfA1* con fusiones transcripcionales y traduccionales en los genes *arpR* y *phbR*, así como de los genes biosintéticos *arsA* y *phbB*.

El ensayo de determinación de la actividad de β -glucuronidasa para los genes *arpR* y *arsA* se realizó en células incubadas en medio líquido Burk-Butanol con un crecimiento de 72 h. Como muestra la figura 20, no se observan cambios significativos en la transcripción y traducción del gen *arpR*. Por otro lado, existe una reducción significativa en la transcripción del gen *arsA*, lo cual se ve reflejado en su expresión traduccional. Por lo que, podemos concluir que bajo estas condiciones la mutación en el gen *arfA1* afecta de manera negativa la transcripción del gen *arsA*.

6.5.2 Expresión de los genes *phbR* y *phbB* en la mutante *arfA1*

El ensayo de determinación de la actividad de β -glucuronidasa para los genes *phbR* y *phbB* se realizó en medio líquido PY suplementado con sacarosa al 2% con un crecimiento de 48 h.

Como se muestra en la figura 21, existe un leve aumento en la expresión transcripcional del gen *phbR* en la cepa *arfA1*⁻, y por lo tanto, en su expresión traduccional. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico las diferencias que

se observan no son relevantes debido a un cruce de la desviación estándar de cada una de las cepas.

A pesar de que no se observa un aumento considerable en la expresión transcripcional del gen *phbB* en la cepa *arfA1*- y en la cepa WT, existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos de acuerdo con el análisis estadístico, contrario a esto, la expresión a nivel traduccional se ve reducida significativamente.

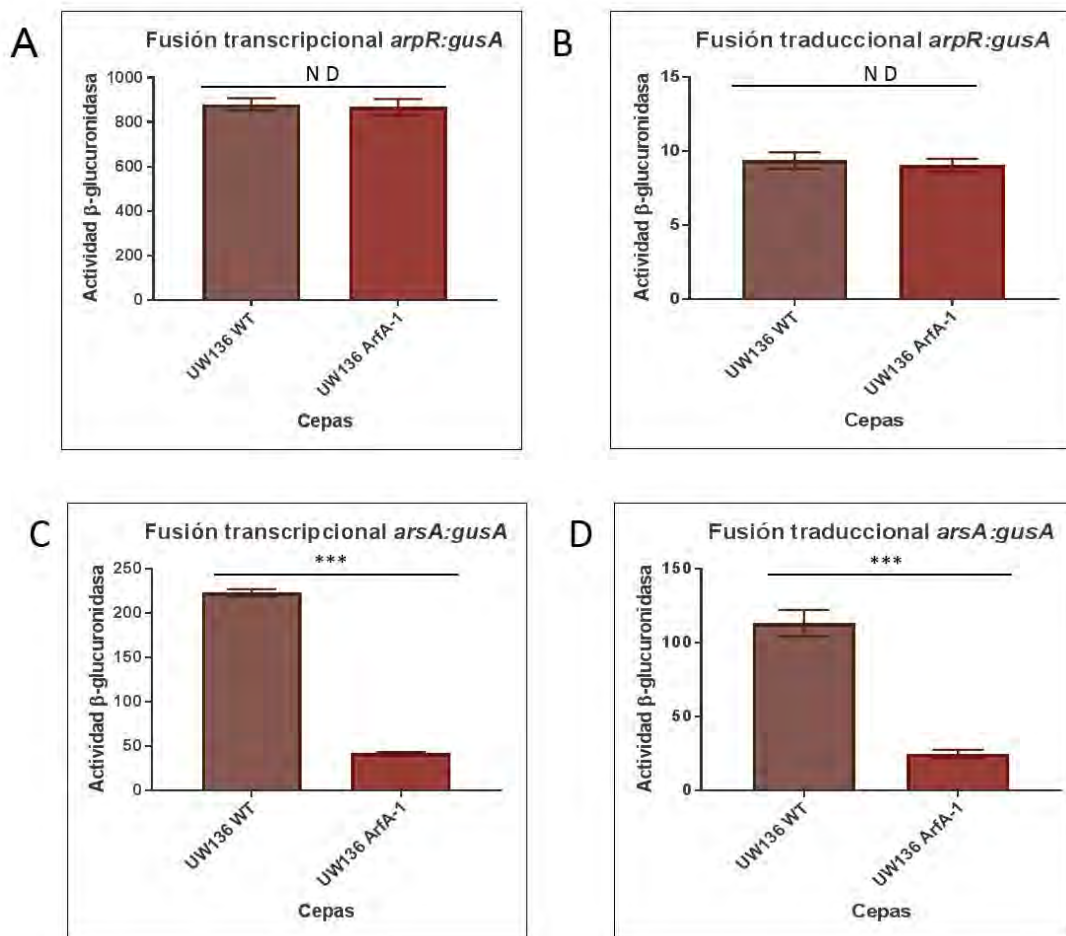


Fig. 20. Actividad de β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales y traduccionales de los genes *arpR* y *arsA* en las cepas UW136 y *arfA1*. Los datos corresponden al análisis de tres experimentos independientes. La diferencia significativa fue analizada mediante *t-test* y se encuentra indicada (***) $p < .001$; ND-No diferencias significativas.)

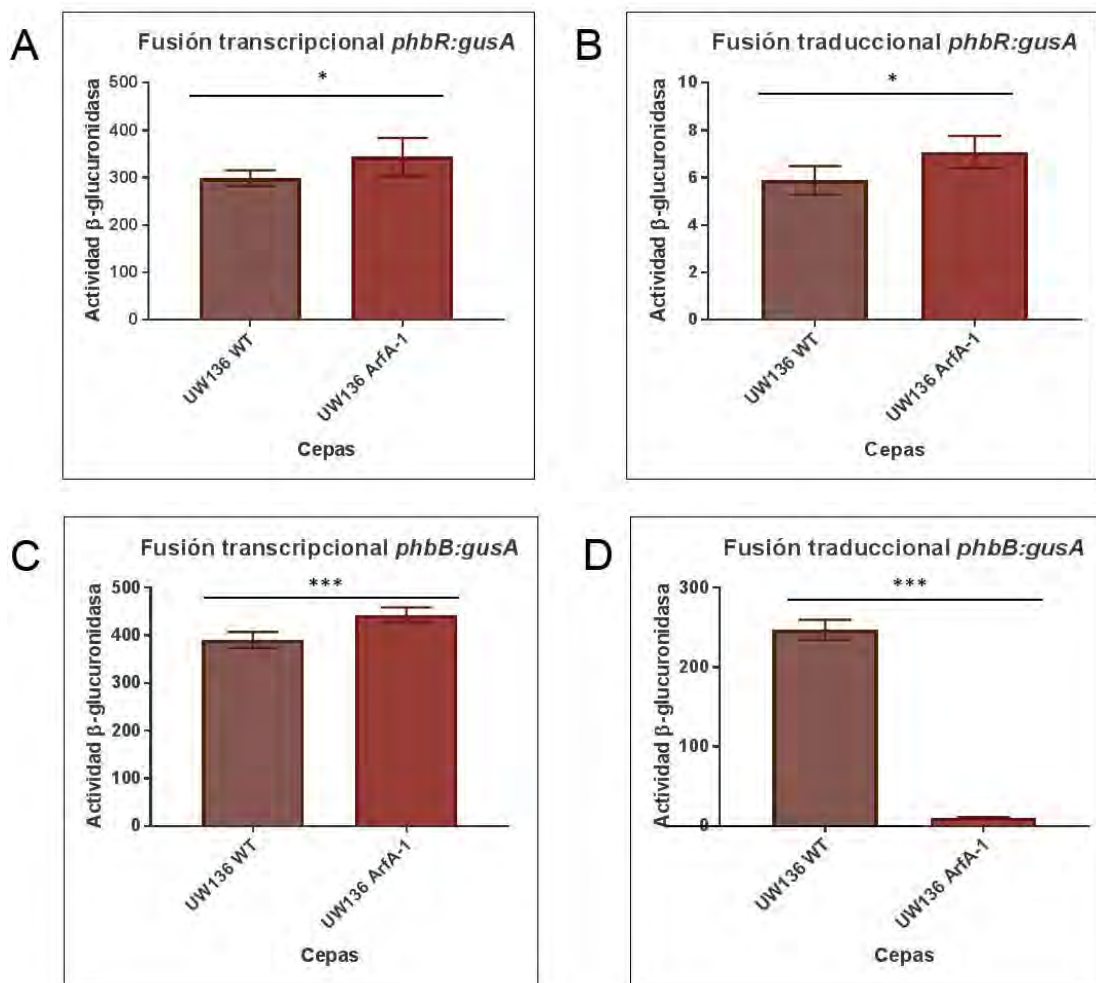


Fig. 21. Actividad de β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales y traduccionales de los genes *phbR* y *phbB* en las cepas *UW136* y *arfA1*. Los datos corresponden al análisis de tres experimentos independientes. La diferencia significativa fue analizada mediante *t-test* y se encuentra indicada (** $p < .001$)

6.6 Genes involucrados en el rescate de ribosomas presentes en *A. vinelandii*

Dado que el producto del gen *arfA1* presentó homología con ArfA cuya función es rescatar ribosomas estancados en complejos *non-stop*, surgió la pregunta si mutaciones en otros genes cuyos productos participan en el rescate de ribosomas también afectan de manera negativa la síntesis de PHB y ARs.

Se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma de *A. vinelandii* para identificar a los genes que participan en los otros sistemas de rescate de ribosomas por trans-traducción (*ssrA-smpB*) y por el rescate alternativo de ribosomas B (*arfB*) (Tabla 4).

Gen	Fenotipo Mutante	Localización (Avin)
<i>ssrA (tmRNA)</i>	Ligero aumento en producción de PHB y ARs	55180
<i>smpB</i>	----	43050
<i>arfA1</i>	Disminuye producción de PHB Disminuye producción de ARs	08930
<i>arfA2</i>	Disminuye producción de PHB Producción de ARs similar a WT	08960
<i>arfB</i>	Producción de PHB y ARs similar a WT	34690

Tabla 4. Genes involucrados en el rescate de ribosomas presentes en *Azotobacter vinelandii*.

En el laboratorio se construyó la mutante *ssrA* (Muriel, 2012. Datos no publicados) que codifica para el RNA especializado conocido como *tmRNA* y participa en el sistema de trans-traducción. Esta cepa presentó un ligero aumento en la producción de PHB y ARs en comparación con la cepa silvestre de acuerdo al fenotipo

observado (Fig. 22). Por otro lado, las cepas mutantes *arfA1*⁻ y *arfA1*⁻ *arfA2*⁻ presentan una reducción más evidente en la producción de PHB y ARs comparada con la cepa silvestre. En cuanto a la cepa *arfA2*, se presenta un fenotipo de producción de PHB y ARs similar al descrito anteriormente. Adicionalmente, una mutante en *arfB* presentó un fenotipo de producción de PHB y ARs similar al de la cepa silvestre.

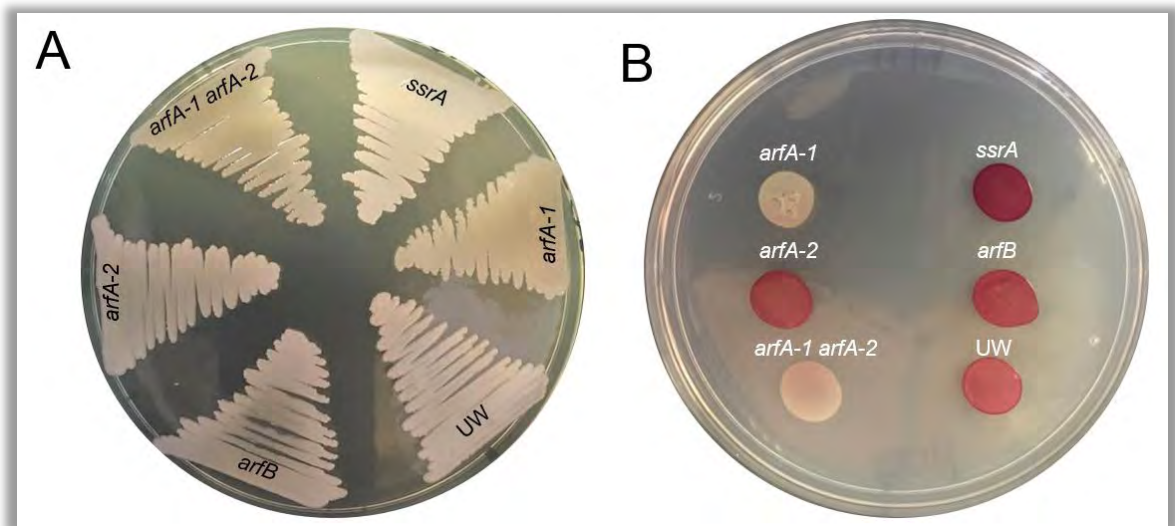


Fig. 22. A) Fenotipo de opacidad en cultivo en placa PY sacarosa 2%. B) Análisis de Fast-Blue para la determinación cualitativa de ARs. Se muestran las cepas UW136, *ssrA*⁻, *arfA1*, *arfA2*, *arfA1*⁻*arfA2*⁻ y *arfB*⁻.

7 Discusión

En el presente trabajo se determinó que el gen *Avin08930* codifica para una proteína de 53 aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 44% con la proteína ArfA de *E. coli*, la cual se conforma de 72 aminoácidos y participa en un sistema alternativo de rescate de ribosomas que se encuentran estancados en complejos *non-stop* a través del reclutamiento de RF2 (factor de liberación-2) (Keiler, 2015).

Cabe mencionar que en *A. vinelandii* existen dos copias del gen *arfA*, las cuales son codificadas por los genes *Avin08930* renombrado como *arfA1*, y *Avin08960* renombrado como *arfA2*, por lo tanto, ambos genes son parálogos.

La retención de dos copias de un gen, producto de una duplicación génica, depende de su función, el evento por el que se duplicó, la especie en la que ocurre y su velocidad de expresión (Magadum *et al.*, 2013). No es común para las especies tener dos genes idénticos, si el producto del gen forma parte de una vía de regulación, debido al desequilibrio que se puede producir por el aumento en la dosis génica (Pierce, 2009). Sin embargo, existe la posibilidad de que se conserve la misma función en genes duplicados. Esto ocurre cuando a) el segundo gen proporciona una función de apoyo cuando el locus original se desactiva por mutación; b) existe una ventaja selectiva ocasionada por el aumento en la expresión del producto del gen duplicado; c) existe una subfuncionalización del gen duplicado, es decir que, ambos genes permanecen en el genoma un período de tiempo, durante el cual se diferencian en algunos aspectos de sus funciones (Magadum *et al.*, 2013). Es probable que la duplicación del gen *arfA* en *A. vinelandii* se presente como una ventaja selectiva debido a su función, sin embargo, son necesarios experimentos bioquímicos y/o genéticos que demuestren esta hipótesis.

Como se había mencionado anteriormente, en *E. coli*, el RNAm de *arfA* adopta una estructura de horquilla en su extremo 3', que es reconocida y escindida por la RNAsa III, para regular los niveles de ArfA cuando hay suficiente actividad de

tmRNA, y de esta manera, evitar la competencia entre los sistemas de rescate de ribosomas. En *A. vinelandii*, el RNAm de *arfA1* también adopta una estructura de horquilla en su extremo 3' (Fig. 15). Sin embargo, la secuencia de esta estructura secundaria no está conservada en los homólogos de *arfA*, por lo que no ha sido posible determinar una secuencia consenso reconocida por la RNAsa III (Garza-Sánchez *et al.*, 2011), y por lo tanto, se requerirán de experimentos adicionales para comprobar y determinar los sitios de escisión en *arfA1* por la RNAsaIII (*Avin13780*).

De acuerdo al contexto cromosómico en el que se encuentra *arfA1*, existía la posibilidad de que el fenotipo observado fuera producto de una alteración en el gen *rsmZ7*. Sin embargo, la hipótesis anterior se descartó al existir una correlación completa entre la secuencia del gen *rsmZ7* de *A. vinelandii* y la secuencia obtenida del plásmido *pJET rsmZ7-ArfA1* (Fig.16), de manera que podemos concluir que el fenotipo observado en la cepa *arfA1*⁻ no es producto de una mutación en *rsmZ7*.

En este proyecto se determinó el sitio de inicio de la transcripción del gen *arfA1* por primer extension (Fig. 17), el cual se localiza a 142 nucleótidos río arriba del ATG (inicio del gen) en la cepa UW136 y en la mutante *arfA1*. Sin embargo, el resultado obtenido se debe corroborar utilizando otro método, como por ejemplo, 5' RACE (Carey *et al.*, 2013; Schauster *et al.*, 2014).

Para complementar la información obtenida del experimento anterior, se realizó un análisis *in silico* a través de los programas SoftBerry y VirtualFootprint de la región reguladora de *arfA1* a 85 b río arriba del inicio del gen *rsmZ7* con el fin de identificar posibles promotores del gen *arfA1*. Se identificó un posible promotor σ^D y una secuencia de reconocimiento de Fnr dentro de la región reguladora del gen *rsmZ7*, por el contrario, no se obtuvieron resultados para la región reguladora de *arfA1*. Sin embargo, de manera manual se identificó el sitio de una posible secuencia reconocida por el factor σ^D , aunque son necesarios experimentos que comprueben esta hipótesis. Cabe mencionar que este factor sigma interviene en la expresión transcripcional de *arfA* en *E. coli* (Chadani *et al.*, 2011). Fnr es un factor de transcripción que regula la transcripción de distintos genes en respuesta a la anaerobiosis (privación de oxígeno), el cual reconoce la secuencia consenso

TTGATN₄ATCAA donde N representa un nucleótido (Barnard, 2003). En *A. vinelandii* el regulador Fnr es codificado por el gen *Avin19910* y la posible secuencia consenso que reconoce se encuentra marcada en la Fig. 17.

A pesar de los datos obtenidos, son necesarios experimentos que nos permitan aclarar estos resultados, por ejemplo, se podrían diseñar fusiones transcripcionales con diferentes longitudes que abarquen la región reguladora de *arfA1*, de manera que su actividad nos permita identificar el sitio de su promotor.

Aunque lo consideramos poco probable, se consideró que *rsmZ7* y *arfA1* podrían estar organizados en un operón, dado que existe un ejemplo de un transcrito formado por un RNAm que codifica para una proteína y un RNA pequeño no codificante, es decir, el transcrito formado por *cbrB-crcZ* (Hernández-Arranz *et al.*, 2016). En este trabajo se demostró que *arfA1* se transcribe de manera independiente de *rsmZ7* en *A. vinelandii* (Fig. 19). A diferencia del caso anterior, en donde CrbB y CrcZ participan en un sistema de regulación post-transcripcional, aún no sabemos si existe una relación directa entre el sistema Rsm y el sistema de rescate de ribosomas. Otra diferencia es que en *A. vinelandii* el transcrito estaría liderado por el RNA pequeño no codificante y no por un RNAm que codifica para una proteína, además el espacio intergénico entre ambos genes es de 177 nucleótidos, por lo que es muy probable que se encuentre un promotor en esa región. No han sido reportados casos en donde se encuentre a *arfA* formando parte de un operón.

Los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la actividad de β -glucuronidasa para conocer el efecto de la inactivación del gen *arfA1* sobre la transcripción y traducción de los genes *arpR* y *arsA*, así como de *phbR* y *phbB* se muestran en las figuras 20 y 21, respectivamente. Debido a que el descubrimiento de ArfA es reciente, son pocos los estudios que han sido reportados sobre su estructura, función, organización y regulación genética. Es por esta razón que no podemos explicar con detalle los resultados obtenidos. En este caso se esperaba una reducción en la traducción de los genes estudiados de acuerdo a la función que realiza ArfA, sin embargo, no observamos un efecto en los genes reguladores, *arpR*

y *phbR*, pero si en los genes estructurales, *arsA* y *phbB*, aunque el efecto fue sobre transcripción y traducción, respectivamente.

Considerando la inconsistencia de los resultados obtenidos, es probable que los efectos observados en la mutante *arfA1* sean un resultado de pleiotropía, el fenómeno por el cual un gen es responsable de múltiples efectos fenotípicos (Paaby & Rockman, 2013).

Dado que existen diferentes eventos por los que se genera un complejo *non-stop*, tales como, la terminación prematura de la transcripción, daño al RNAm, un corrimiento en el marco de lectura, falta de reconocimiento del codón de paro y/o la actividad de enzimas que degradan RNA (RNAsas) (Keiler, 2015), es difícil identificar y categorizar los blancos sobre los que actúa ArfA, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que exista una alta probabilidad que RNAm grandes sean más propensos a generar complejos *non-stop*. En este caso los genes estructurales involucrados en la síntesis de PHB y ARS se transcriben como un solo transcrito de una longitud aproximada de 12 kb y 4 kb, respectivamente.

Una mutación en alguno de los elementos del sistema de trans-traducción, por lo general, conduce a una disminución en la viabilidad celular, particularmente, bajo varias condiciones de estrés, tales como, fluctuaciones en la temperatura, privación de nutrientes o presencia de antibióticos (Keiler, 2015; Huter *et al.*, 2017). En *A. vinelandii*, la mutante *ssrA* presentó un ligero aumento en la producción de PHB y ARs (Fig. 22), sin embargo, es necesario realizar una cuantificación más exhaustiva. Además, se podría crecer a la cepa *ssrA*⁻ bajo distintas condiciones de estrés para determinar el efecto de esta mutación en la viabilidad celular, tal como, el crecimiento, la producción de ARs, su capacidad de enquistamiento, entre otros.

No han sido reportados fenotipos para mutaciones individuales en los genes *arfA* y *arfB* en la presencia de un sistema de trans-traducción funcional, lo cual es consistente con la función de soporte que proveen estos sistemas alternativos (Keiler, 2015). Sin embargo, en *A. vinelandii* la mutante *arfA1* presentó una reducción en la producción de PHB y alquilresorcinoles (Fig. 22). Por otro lado, la mutante *arfA2* presentó una disminución en la producción de PHB, y la mutante

arfB, un fenotipo similar a la cepa UW136. Es interesante el fenotipo observado en la cepa *arfA1*⁻ ya que es probable que este sistema tenga una función más significativa en *A. vinelandii* que el sistema de trans-traducción, ya que en este último, no observamos un fenotipo de reducción en la síntesis de PHB y ARs.

8 Conclusiones

- El producto del gen *arfA1* presenta identidad con la proteína ArfA de *E. coli*.
- El gen *arfA1* se transcribe de manera monocistrónica y su sitio de inicio de transcripción se localiza a 147 nucleótidos del inicio ATG.
- Una mutación en el gen *arfA1* disminuye la producción de PHB y ARs, ya que la expresión de los genes biosintéticos *phbB* y *arsA* disminuye a nivel traduccional y transcripcional, respectivamente. Sin embargo, la expresión de los genes reguladores *phbR* y *arpR* no se ve afectada.
- En *A. vinelandii* están presentes los genes que codifican para los tres sistemas de rescate de ribosomas, los cuales son: el sistema de trans-traducción, el factor de rescate alternativo A y el factor de rescate alternativo B.

9 Perspectivas

- Caracterizar la expresión del gen *arfA1*, así como la de su parálogo *arfA2*, en distintas condiciones de crecimiento en la cepa silvestre y en una mutante *ssrA*.
- Determinar la actividad de la RNAsa III sobre el RNAm de *arfA1*.
- Identificar el sitio del promotor del gen *arfA1*.
- Caracterizar una mutante en el gen *arfB* (*Avin 34690*).

10 Bibliografía

- Barnard, A., Green, J. y Busby, S. (2003). Transcription regulation by tandem-bound FNR at *Escherichia coli* promoters. *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, No. 20, p. 5993–6004.
- Carey, M., Peterson, C. y Smale, S. (2013). The primer extension assay. *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.prot071902.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. y Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.
- Castañeda, M., López-Pliego, L., Espín, G. (2016). *Azotobacter vinelandii* Small RNAs: Their roles in the formation of cysts and other processes. Non-coding RNAs and inter-kingdom communication.
- Chadani, Y. *et al.* (2010). Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system. *Mol. Microbiol.* 78, 796–808.
- Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K. y Abo, T. (2011). *Escherichia coli* YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways. *Mol. Microbiol.* 80, 772–785.
- Cocotl-Yáñez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Nuñez, C., Castañeda, M., Segura, D., Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology.* 157:1685–1693. doi: 10.1099/mic.0.046268-0 PMID: 21454367.
- Demo, G. *et al.* (2017). Mechanism of ribosome rescue by ArfA and RF2. *eLife* 2017;6:e23687. DOI: 10.7554/eLife.23687.

- Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii* en *Microbios en Línea*. Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J. Editores. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., Horinouchi, S. (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 6356–6361.
- Gallegos, M. R. (2013). Estudio de la proteína IIA Ntr no fosforilada sobre la expresión de los genes *phbB* y *phbR* en *Azotobacter vinelandii*. UNAM, Tesis de Posgrado en Ciencias bioquímicas.
- Garza-Sánchez, F., Janssen, B., Schaub, R. y Hayes, C. (2011). tmRNA regulates synthesis of the ArfA ribosome rescue factor. *Molecular Microbiology*. 80(5),1204–1219. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07638.x.
- González, Y., Meza, J., González., Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 77-115.
- Hernández-Arranz, S., Sánchez-Hevia, D., Rojo, F. y Moreno, R. (2016). Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA. *RNA*, Vol. 22, No. 12. pp. 1902–1917.
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., y Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiol.* 157(11):10.
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M. y Espín, G. (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 158: 1953–1963.

- Huter, P. *et al.* (2017). Structural basis for ribosome rescue in bacteria. *Trends in biochemical sciences*, Aug. 2017, Vol. 42, No. 8.
- Jendrossek, D., Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polihidroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:403–32 doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- Keiler, K. (2015). Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*: volume 13, pages 285–297, doi:10.1038/nrmicro3438.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F., y Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology.* 67: 241 - 253.
- Magadum S., Banerjee U., Murugan P., Gangapur D. y Ravikesavan R. (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* 92, 155–161.
- Manzo, J., Sanchez, E., Velazquez, C. *et al.* (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene algD by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 21: 147–159
- Mitrophanov, A., Groisman, E. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes and development* 22:2601–2611. www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1700308.
- Miyanaga, A., Funa, N., Awakawa, T., y Horinouchi, S. (2008). Direct Transfer of Starter Substrates From Type I Fatty Acid Synthase to Type III Polyketide Synthases in Phenolic Lipid Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 871-876.

- Muriel-Millan, L. F. Moreno, S. Romero, Y. Bedoya-Perez, L.P. Castaneda, M. Segura, D. Espin, G. (2015). The Unphosphorylated EIIANtr Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii* *PLoS ONE*, 10, e0117184.
- Paaby, A., Rockman, M. (2013). The many faces of pleiotropy. *Trends in Genetics*, February 2013, Vol. 29, No. 2. [dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.010](https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.010).
- Parkinson J.S., Kofoed E.C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins: *Annual Rev: Gene.* 26; 71-112.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Gúzman, J., Servín-González, L. and Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on transcriptional activator *phbR*. *J. Bacteriol.* 184:5672-5677.
- Reusch, R. N. y Sadoff H. L. (1981). Lipid Metabolism During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 145: 889-895.
- Reusch, R., Sadoff, H. (1979). 5-n-Alkylresorcinols from Encysting *Azotobacter vinelandii*: Isolation and Characterization. *Journal of bacteriology*. Aug. 1979, p.448-453; 0021-9193/79/08-0448/06\$02.00/0.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* 29:1321-1330.
- Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M.Á., Castañeda, M., *et al.* (2016). The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE* 11(4): e0153266. doi:10.1371/journal.pone.0153266.

- Romero, Y., Moreno, S., Guzman, J., Espin, G., y Segura, D. (2013). The sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 195: 1834–1844.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 39:516-39.
- Schuster, C.F., Bertram, R. (2014). Fluorescence Based Primer Extension Technique to Determine Transcriptional Starting Points and Cleavage Sites of RNases In Vivo. *J. Vis. Exp.* (92), e52134, doi:10.3791/52134.
- Segura, D., Cruz, T., y Espín, G. (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology* 179: 437–443.
- Segura, D., Noguez, R. Espín, G. (2008). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología* V14 CS3.indd 361.
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y. (2009). Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alquilresorcinols are not essential for cysts desiccation resistance. *Journal of Bacteriology* 191: 3142–3148.
- Segura, Daniel; Nuñez, Cinthia; and Espín, Guadalupe. (2014). *Azotobacter* Cysts. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000295.pub2

- Suaza-García, E., Coy-Barrera, E. (2014). Alkylresorcinols: natural compounds with biological importance. ISSN 1900-4699. Volumen 10. Número 2. Páginas 210-222.
- Suzuki, K., Wang, X., T. Weilbacher, A.K. Pernesting, Ö. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, y T. Romeo. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:5130-5140.
- Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yanez, M., Espín, G. (2017). GacA regulates the PTS_{Ntr}-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii* *Fems Microbiology Letters*, 364, fnw278.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. y Miller W. 2000 A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:302-214.