



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría en Ciencias Bioquímicas**

Regulación de la síntesis de PHB por IHF a través de la vía RsmZ/A en  
*Azotobacter vinelandii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Pablo Olache Álvarez

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Gloria Soberón Chávez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. José Alberto Hernández Eligio  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos; Enero 2023



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.

## DEDICATORIA

*A mi familia, Yolanda Álvarez, Fernando Olache y Luis Olache.*

*A mis abuelos Fernando y María Luisa, los extraño todos los días.*

*A mis abuelos Arturo y Noemí.*

*A Yamili Vargas.*

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por brindarme un espacio y un ambiente de conocimientos sin igual, de todos los ámbitos. Ser parte de la UNAM ha sido una de las más grandes experiencias de mi vida.

A la UNAM por el apoyo económico PAPIIT IN212120 otorgado a la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo por apoyo al proyecto.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

A la **Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo**, por aceptarme como parte de su grupo de investigación, así como por ser una guía y una excelente tutora. Por su apoyo y atención que me fueron brindados en todo momento, sin los cuales no hubiese sido posible mi avance y culminación de este trabajo. Sin lugar a duda, una piedra angular en mi formación académica.

A los miembros de mi comité tutorial, el **Dr. José Alberto Hernández Eligio** y la **Dra. Gloria Soberón Chávez**, por su invaluable conocimiento y consejo a lo largo de la realización de este trabajo que me brindaron semestre tras semestre, lo cual promovió el desarrollo íntegro del proyecto. Les agradezco los acertados comentarios y las discusiones que se generaron en cada reunión que tuvimos, sus aportaciones fueron de suma importancia.

A los miembros de mi jurado, el **Dr. José Luis Puente García**, la **Dra. Katy Juárez López**, el **Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán**, el **Dr. Luis Servín González** y el **Dr. Miguel Cocotl Yáñez**, por el tiempo, conocimientos, consejos y correcciones muy valiosos que me otorgaron y que fueron cruciales para mejorar la calidad de este trabajo.

A las técnicas académicas del laboratorio 6 del Instituto de Biotecnología. A la **Biol. María Soledad Moreno León**, quien me brindó su apoyo y conocimientos para la construcción de la cepa mutante  $UW\ ihfA^-$ , para el diseño de vectores y para la evaluación cualitativa de alquilresorcinoles. A la **M. C. Josefina Guzmán Aparicio** por su asesoramiento y apoyo para realizar la cuantificación de PHB. Ambas han sido parte fundamental en mi formación como estudiante y como persona. Siempre me han otorgado su apoyo y consejo tanto en

cuestiones académicas como personales con total disposición y amabilidad. Les agradezco por todo.

A todos los miembros del grupo Espín-Merino. Al **Dr. Daniel Genaro Segura González** y a la **Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López**, por todos sus consejos y conocimiento que me brindaron durante los seminarios en donde presenté mi trabajo que me ayudaron a enriquecer y mejorar mi formación. Al **M. C. José Luis Gama Ferrer** por su amistad y por su apoyo en el trabajo de laboratorio como preparación de soluciones y medios de cultivo. A todos mis compañeros y amigos del laboratorio: Vicho, Cristian, Jess, Juli, Mar, Chanti, Fer, Moyis, Karlita, Denisse, Thalís, Karen, Juan Pablo, Dayren, Doña Mago y a la M. B. Maria Luisa Tabche Barrera, en quienes encontré amistades muy valiosas, así como ayuda y asesoramiento en los experimentos y en los seminarios realizados a lo largo de la elaboración de este trabajo. Sin lugar a duda, la culminación de mi proyecto de maestría no hubiese sido posible sin la amistad y apoyo de cada uno de ellos.

A mis amigos Cristian, Óscar, Vicho, Angy, Yuvi, Andie, Karen, Adair, Bruno, Ana y Rogelio, por haber compartido un sinnúmero de experiencias y momentos agradables donde las risas nunca faltaron, como debe de ser. Gracias por su sincera amistad.

A mi mamá, **Yolanda Álvarez**, quien día con día desde que tengo memoria, ha sido pilar fundamental en mi vida. Por haberme dado todo el amor, cariño, apoyo y conocimiento que me han permitido llegar hasta este punto. Es una persona que tiene mi máxima adoración y admiración y le debo todo lo que soy. Gracias por estar siempre.

A mi papá, **Fernando Olache**, quien a través del ejemplo me ha inculcado valores y enseñanzas invaluable. Por ser una persona en quien puedo confiar y que sé con certeza que siempre encontraré en él un apoyo incondicional. Gracias por todos los felices momentos que nos has hecho pasar, puedo decir en definitiva que tu presencia brinda mucha alegría a nuestras vidas.

A mi hermano, **Luis Olache**, por ser mi compañero de aventuras y travesuras desde siempre. Gracias por estar en todo momento y por brindarme gratos momentos y recuerdos desde nuestra infancia hasta el día de hoy.

A **Yamili Vargas**, por ser mi compañera de vida, por todos aquellos momentos que hemos vivido juntos y por los que nos faltan vivir. Por todo el amor y confianza que me brindas todos los días y por ser aquella persona que me llena de plenitud y dicha. Por ser una inspiración tanto en lo personal como en lo académico. Gracias por todo.

## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria capaz de sintetizar distintos polímeros, principalmente al llevar a cabo un proceso de diferenciación celular conocido como enquistamiento. Uno de estos polímeros es el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), un poliéster biodegradable y resistente al agua que presenta características similares al polipropileno. La síntesis de PHB en *A. vinelandii* se encuentra regulada por una gran variedad de mecanismos y sistemas a distintos niveles de la expresión génica. Uno de los mecanismos principales que intervienen en la regulación de síntesis de PHB es el sistema Gac/Rsm, que consiste en el sistema de dos componentes GacS/GacA, la proteína RsmA y los RNAs pequeños *rsmZ1-7*, y *rsmY*. En *A. vinelandii*, se ha reportado que RsmA inhibe la traducción de genes de la ruta biosintética de PHB al tener afinidad sobre distintos RNAs mensajeros, mientras que los RNAs pequeños antagonizan a RsmA. Por otro lado, se ha reportado en otros modelos de estudio que el factor de integración al hospedero (IHF), una proteína heterodimérica asociada a nucleoide (NAP) capaz de modificar la estructura del DNA, regula la expresión de RNAs pequeños del sistema Rsm. En este trabajo se estudió la regulación de IHF sobre la síntesis de PHB en *A. vinelandii* mediante la elaboración y caracterización de cepas mutantes en los genes *ihfA* e *ihfB*. Se observó que las cepas mutantes en cualquiera de los monómeros de IHF presentan un mayor tiempo de duplicación en una curva de crecimiento comparadas con una cepa silvestre en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria, que es donde se ha reportado que ocurre una mayor expresión de *ihf* en otros modelos de estudio. En las mismas cepas mutantes, se observó una disminución en la producción de PHB comparadas con la cepa silvestre tanto en ensayos cualitativos como cuantitativos, lo que indica que IHF es un regulador positivo de la síntesis de PHB. Adicionalmente, se encontró que las mutantes en *ihf* exhiben una disminución en la expresión de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2* y en la traducción de *phbR*, por lo que se puede concluir que IHF controla la síntesis de PHB al actuar como un regulador positivo de la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*. Para reforzar esta idea, se evaluó otro fenotipo regulado por la vía Rsm, la producción de alquilresorcinoles (ARs), en donde se observó una disminución en las mutantes en *ihf*, lo que concuerda con su papel propuesto en la regulación del sistema Rsm. Cabe destacar que las mutantes individuales en *ihfA* e *ihfB* mostraron un comportamiento similar a la doble mutante *ihfA/ihfB* en los fenotipos evaluados, por lo que se concluye que la ausencia de uno solo de los monómeros tiene como consecuencia una versión no funcional de IHF en *A. vinelandii*.

## ABSTRACT

*Azotobacter vinelandii* is a bacterium that synthesizes a variety of polymers, mainly by undergoing a cell differentiation process known as encystment. One of these polymers is poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), a biodegradable and water-resistant polyester that shows similar characteristics to polypropylene. PHB synthesis in *A. vinelandii* is regulated by diverse mechanisms and systems that act upon different levels of gene expression. One of the main mechanisms that intervene in PHB synthesis regulation is the Gac/Rsm system, which consists of the two component system GacS/GacA, RsmA and the small RNAs *rsmZ1-7*, and *rsmY*. It has been reported that RsmA inhibits translation of genes belonging to the PHB biosynthetic pathway in *A. vinelandii*, while the small RNAs titrate RsmA. On the other hand, in other bacteria it has been reported that the integration host factor (IHF), a heterodimeric nucleoid-associated protein (NAP) capable of modifying DNA structure, regulates the expression of small RNAs from the Rsm system. In this work, IHF regulation over PHB production was studied through the construction and characterization of *ihfA* and *ihfB* mutants in *A. vinelandii*. It was observed that mutant strains in any of the two IHF monomers had higher duplication times in a growth curve than those of the wild-type strain in the transition from exponential to stationary growth, which is the point of most *ihf* expression in other bacteria. In the same mutant strains, a reduction in PHB production was observed in comparison to the wild-type strain in both qualitative and quantitative assays. This result indicates that IHF is a positive regulator of PHB synthesis. Additionally, it was found that *ihf* mutants exhibit a decrease in *rsmZ1* and *rsmZ2* transcription and in *phbR* translation. This results, in conjunction, demonstrate that IHF controls PHB synthesis by its role as a positive regulator of *rsmZ1* and *rsmZ2* expression. To strengthen this idea, alkylresorcinols (ARs) production, another phenotype regulated by the Rsm system, was evaluated in the *ihf* mutants, where it was diminished compared to the wild-type strain. This result matches with the proposed regulatory role of IHF over the Rsm system. It is important to note that single *ihfA* and *ihfB* mutants exhibited a similar behavior to the double mutant *ihfA/ihfB* in the evaluated phenotypes, which means that the absence of even a single *ihf* monomer results in a non-functional version of IHF in *A. vinelandii*.



## CONTENIDOS

### Índice General

1. Introducción.....	3
1.1. Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	3
1.2. Enquistamiento .....	4
1.3. Síntesis de PHB .....	6
1.4. Sistemas de regulación involucrados en la síntesis de PHB .....	8
1.4.1. Sistema Gac-Rsm.....	8
1.5. Factor de integración al hospedero (IHF).....	10
2. Antecedentes.....	13
1.1. RsmA controla la expresión de genes involucrados en la síntesis de PHB a nivel post-transcripcional .....	13
1.2. La proteína EIIA <sup>Ntr</sup> , en su estado no fosforilado, promueve la degradación del factor sigma RpoS por medio del complejo chaperona-proteasa ClpAP .....	14
1.3. La expresión de <i>csrA</i> ( <i>rsmA</i> ) está regulada por IHF y ClpP en <i>Legionella pneumophila</i> .....	17
1.4. IHF regula la expresión de RNAs pequeños del sistema Csr/Rsm.....	19
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivo general .....	21
5. Objetivos particulares .....	21
6. Materiales y métodos.....	21
1.1. Medios y condiciones de cultivo .....	21
1.2. Extracción de plásmido por el método del perclorato .....	22
1.3. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	23
1.4. Transformación de <i>E. coli</i> .....	23
1.5. Extracción de DNA cromosomal de <i>A. vinelandii</i> .....	24
1.6. Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .....	25
1.7. Transformación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> con DNA de plásmido o DNA cromosomal.....	25
1.8. Cuantificación de proteína por el método de Lowry .....	25
1.9. Determinación de la constante de crecimiento ( $\mu$ ) y del tiempo de duplicación (g) a partir de una curva de crecimiento .....	26
1.10. Medición cuantitativa de actividad de $\beta$ -glucuronidasa.....	27
1.11. Corte de extremos 3' en el vector pJETihfARc digerido con la enzima BstXI ...	28
1.12. Construcción de mutantes de la cepa UW136 de <i>A. vinelandii</i> .....	29
1.13. Cuantificación de la transcripción de <i>rsmA</i> , <i>rsmZ1</i> , <i>rsmZ2</i> y <i>phbR</i> .....	36

1.14.	Construcción de fusión traduccional <i>phbR::gusA</i> .....	39
1.15.	Extracción y cuantificación de polihidroxiбутирато (PHB) .....	41
1.16.	Evaluación cualitativa de la producción de alquilresocinoles (ARs).....	42
7.	Resultados y discusión .....	43
1.1.	Análisis de homología de IHFA e IHFB de <i>A. vinelandii</i> y otras especies .....	43
1.1.	La mutación en <i>ihfA</i> y/o en <i>ihfB</i> tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de <i>A. vinelandii</i> .....	45
1.2.	La mutación en <i>ihfA</i> y/o <i>ihfB</i> provoca una disminución en la producción de PHB.....	47
1.3.	La transcripción de <i>rsmA</i> aumenta en ausencia de <i>clpP</i> y disminuye en ausencia de IHF.....	51
1.4.	La transcripción de <i>rsmZ1</i> y <i>rsmZ2</i> disminuye en ausencia del heterodímero IHF $\alpha\beta$ .....	53
1.5.	IHF controla la expresión de <i>phbR</i> en <i>A. vinelandii</i> .....	57
1.6.	IHF regula la síntesis de alquilresocinoles (ARs) en <i>A. vinelandii</i> .....	62
8.	Conclusiones.....	65
9.	Anexos .....	66
10.	Referencias .....	69

# 1. Introducción

## 1.1. Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Su morfología es predominantemente ovoide, sin embargo, presentan un amplio rango de formas, desde bacilos hasta células cocoides (Fig. 1). Son bacterias aerobias y organotróficas (Espín, 2001). Una de las características más importantes de esta bacteria, es su capacidad de fijar nitrógeno de manera no simbiótica (Becking, 1981). Sin embargo, posee otras características destacables, como, la formación de quistes bajo condiciones adversas o durante la fase estacionaria de crecimiento , así como la producción de compuestos de interés en distintas áreas como la agronomía y la medicina (Salmeron et al., 1990; Segura et al., 2020).

Dado que *A. vinelandii* es una bacteria Gram negativa, morfológicamente posee una pared celular compuesta principalmente por la membrana externa y una capa delgada de peptidoglicano. La membrana externa actúa como una segunda bicapa lipídica, la cual, además de fosfolípidos, tiene una gran cantidad de polisacáridos y lípidos unidos formando una estructura denominada capa de lipopolisacárido. Entre la membrana interna y la externa existe un espacio denominado periplasma, en donde existe una gran concentración de proteínas (Madigan & Martinko, 2001). Es interesante destacar que las células de *A. vinelandii* son relativamente grandes, puesto que el tamaño de las células vegetativas es 16 veces mayor que el de células de *E. coli* (Efu et al., 1996).

El tamaño de *A. vinelandii* se debe, en parte, a que este microorganismo presenta poliploidía, es decir, múltiples copias de su cromosoma. En el 2001, Maldonado, et al., reportaron, mediante el uso de endonucleasas y análisis de fragmentos por electroforesis en gel de campo pulsado que el cromosoma de *A. vinelandii* tiene un tamaño de 4,700 kb aproximadamente, mientras que, en el 2009, Setubal, et al., reportaron la secuencia completa del genoma de *A. vinelandii*, de 5,365,318 pb de tamaño. En el genoma se encontraron genes que correlacionan con un estilo de vida estrictamente aerobio, además de que esta especie no presenta plásmidos (Maldonado et al., 1994; Setubal et al., 2009).

## 1.2. Enquistamiento

Las células de *A. vinelandii* son capaces de llevar a cabo un proceso de diferenciación celular llamado enquistamiento, donde la bacteria sufre cambios morfológicos, metabólicos y fisiológicos. El enquistamiento es una transformación que se lleva a cabo entre 3 y 5 días, y su inducción depende de factores tales como el tipo de nutrientes que se encuentren en el medio. En presencia de carbohidratos como glucosa, los quistes corresponden únicamente al 0.1% de la población celular, sin embargo, en medios con *n*-butanol o  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) como fuentes únicas de carbono, ocurre enquistamiento completo en 120 horas (Sadoff, 1975; Segura et al., 2020).

Al inducirse el enquistamiento, las células vegetativas pierden su motilidad y adoptan una forma esférica (Fig. 1). Adicionalmente, la pared celular se engrosa y la célula en estado latente se denomina cuerpo central, la cual se encuentra rodeada por dos capas compuestas principalmente de alginato, denominadas intina y exina. Por otro lado, metabólicamente,

también ocurren cambios durante la transición del estado vegetativo al de enquistamiento, como lo es la reducción en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la inducción de enzimas que participan en el metabolismo de PHB. La síntesis de RNA se mantiene hasta por 12 horas después de la inducción del enquistamiento y la síntesis de proteínas se mantiene durante este proceso (Hitchins & Sadoff, 1973; Martínez-Ortiz et al., 2020; Sadoff, 1975).

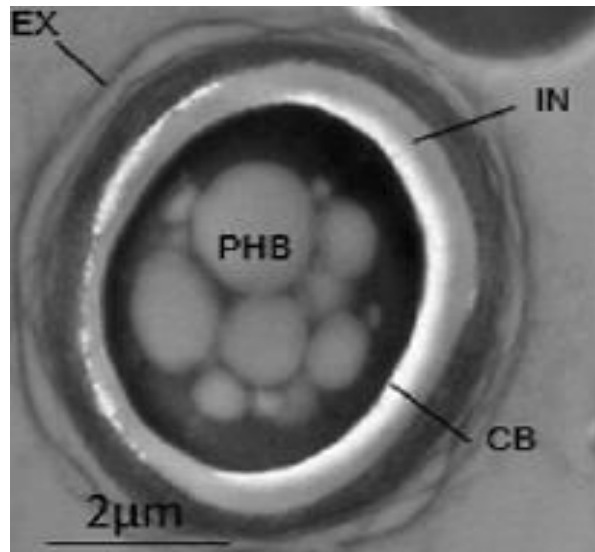


Figura 1. Quiste de *A. vinelandii*. Presenta gránulos de PHB en el cuerpo central (CB) y se encuentra rodeado por capas de intina (IN) y exina (EX). Modificado de Martínez, 2020

Los quistes poseen la capacidad de resistir condiciones deletéreas como la desecación. Además del alginato que compone a la intina y a la exina, en los quistes se encuentran otros polímeros como los alquilresorcinoles, que son lípidos fenólicos que reemplazan a los fosfolípidos en la membrana del quiste y forman parte de la exina (Cocotl-Yañez et al., 2014). Por otro lado, el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), otro componente del quiste, es un poliéster que posee propiedades similares al polipropileno con potencial de ser empleado como un plástico natural biodegradable. El PHB pertenece a la familia de los polihidroxialcanoatos (PHAs), que están compuestos de monómeros de ácidos grasos con grupos 3-hidroxilo. Estos compuestos son sintetizados por una gran variedad de bacterias y son acumulados en forma

de gránulos intracelulares que funcionan como una reserva de nutrientes que no alteran el estado osmótico de la célula (Madison & Huisman, 1999).

### 1.3. Síntesis de PHB

El PHB es un termoplástico biodegradable y biocompatible, compuesto por monómeros de 3-hidroxi-butirato. *A. vinelandii* se encuentra entre las pocas especies de bacterias junto con *Cupriavidus necator* y *Azohydromonas lata* capaces de producir el polímero en grandes concentraciones. Sin embargo, existen más de 300 especies distintas de microorganismos capaces de sintetizar PHAs (Choi & Lee, 1999).

En *A. vinelandii*, la síntesis de PHB se favorece principalmente en condiciones de limitación de oxígeno y preferencialmente durante la fase estacionaria. Esto ocurre debido a que, en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, los agentes reductores como el NADH no pueden ser oxidados, entonces, al no disponer de NAD<sup>+</sup> libre, las reacciones oxidantes del ciclo de Krebs son inhibidas, lo que tiene como consecuencia la acumulación de acetil-CoA (Oeding & Schlegel, 1973). La acumulación de acetil-CoA favorece la producción de PHB, debido a que esta molécula es precursora en la síntesis de PHB. La primera reacción es la condensación de dos moléculas de acetil-CoA (Senior & Dawes, 1973). Esta reacción se encuentra catalizada por la enzima  $\beta$ -cetotiolasa, y tiene como producto una molécula de acetoacetil-CoA. El segundo paso es una reacción de reducción del acetoacetil-CoA a D- $\beta$ -hidroxi-butiril-CoA, catalizada por la enzima acetoacetil-CoA reductasa, y donde se emplea NADPH como agente reductor. Por último, la enzima PHB sintasa se encarga de catalizar la

reacción de polimerización de las unidades de D- $\beta$ -hidroxibutiril-CoA para formar el PHB (Segura et al., 2000).

Los genes que codifican para las tres enzimas involucradas en la síntesis de PHB, es decir, la  $\beta$ -cetotilasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa, se encuentran organizados en el genoma de *A. vinelandii* en un operón, denominado *phbBAC* (Fig. 2). Este operón se encuentra conformado por los genes *phbB*, que codifica para la acetoacetyl-CoA reductasa; *phbA*, que codifica para la  $\beta$ -cetotilasa; y *phbC*, que codifica para la PHB sintasa (Segura et al., 2003).

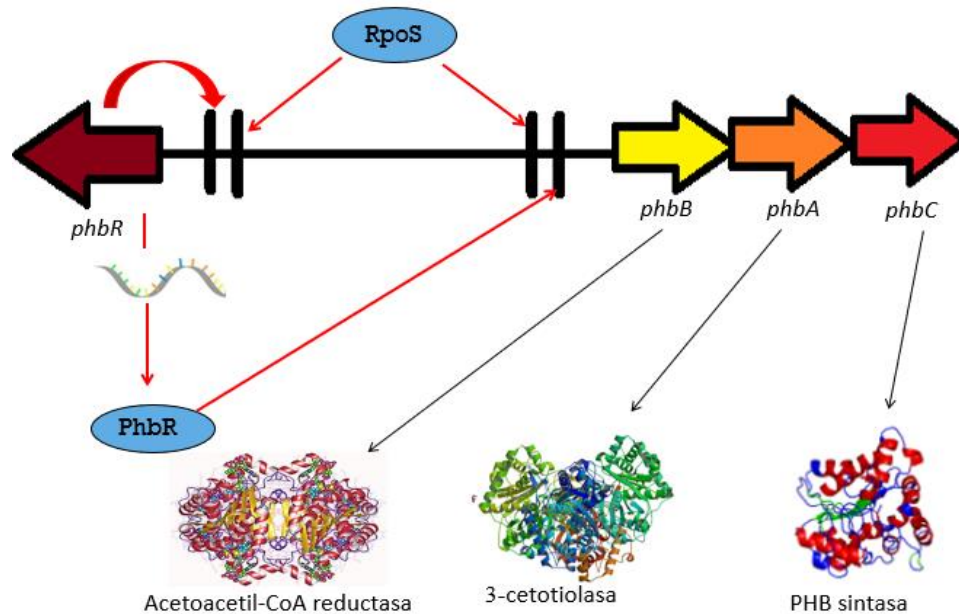


Figura 2. Representación del operón biosintético *phbBAC* donde se muestran los genes *phbB*, *phbA* y *phbC*, así como su respectivo producto proteico.

Río arriba del operón biosintético *phbBAC*, se encuentra el gen *phbR*, que codifica para un activador transcripcional de la familia AraC y que, en *A. vinelandii*, promueve la transcripción del operón biosintético, principalmente en fase estacionaria. Por otro lado, el factor sigma de

fase estacionaria RpoS, reconoce el promotor del operón biosintético *phbBAC* y promueve su transcripción. Por lo tanto, tanto RpoS como PhbR son factores positivos que participan en la regulación de la síntesis de PHB a nivel transcripcional. La inducción de la transcripción de genes como *phbB* ocurre durante la transición de fase exponencial a fase estacionaria (Hernandez-Eligio et al., 2011; Peralta-Gil et al., 2002).

#### *1.4. Sistemas de regulación involucrados en la síntesis de PHB*

##### *1.4.1. Sistema Gac-Rsm*

Los sistemas de dos componentes (TCS) son uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica más comunes en bacterias. Generalmente, estos sistemas responden a cambios en las condiciones del medio, alterando el metabolismo y fisiología de los microorganismos. Estos suelen estar compuestos de una proteína cinasa sensora y su respectivo regulador de respuesta, donde la primera, en respuesta a alguna señal en particular, se autofosforila y, posteriormente, transfiere el grupo fosforilo al regulador de respuesta. Una vez activado el regulador de respuesta, este puede tener distintas actividades regulatorias que le permiten al microorganismo en cuestión sobrevivir a cambios en las condiciones ambientales (Heeb & Haas, 2001; Hoch, 2000).

El sistema de dos componentes GacS/GacA es uno de los más estudiados en la familia Pseudomonadaceae. A pesar de que aún no se conoce la señal externa que estimula a este sistema, se sabe que GacS/GacA controlan una gran variedad de procesos, principalmente a nivel post-transcripcional por medio de la inducción de distintos factores de regulación como



los son los RNAs pequeños RsmX, RsmY y RsmZ. GacS es la histidín cinasa, y GacA es el regulador de respuesta. GacS/GacA se encuentra involucrado en la regulación de genes de virulencia, percepción de quórum y formación de biopelículas en especies del género *Pseudomonas* (Haas & Défago, 2005; Workentine et al., 2009).

En *A. vinelandii*, el sistema GacS/GacA regula, entre otros procesos, la producción de alginato, PHB y alquilresorcinoles. Lo anterior, lo realiza mediante el control del sistema Rsm, el cual, está compuesto por una proteína de unión a RNA denominada RsmA, y un conjunto de RNAs pequeños (Fig. 3). RsmA, al unirse a secuencias consenso del RNA, cerca o sobrelapando la región Shine-Dalgarno, es capaz de regular la estabilidad y traducción de los mRNA al bloquear la interacción de éstos con el ribosoma. La interacción de RsmA con sus mRNA blanco, aumenta la susceptibilidad de los RNAs a ser degradados. Por otro lado, los pequeños RNA, que en *A. vinelandii* son ocho (*rsmZ1-7* y *rsmY*), y cuya expresión está controlada por GacA, poseen una función antagonista a RsmA. Los RNAs pequeños, presentan alta afinidad por RsmA, compitiendo con los mRNA blanco e impidiendo la unión de RsmA a la secuencia Shine-Dalgarno del RNA (Manzo et al., 2012a; Trejo et al., 2017a).

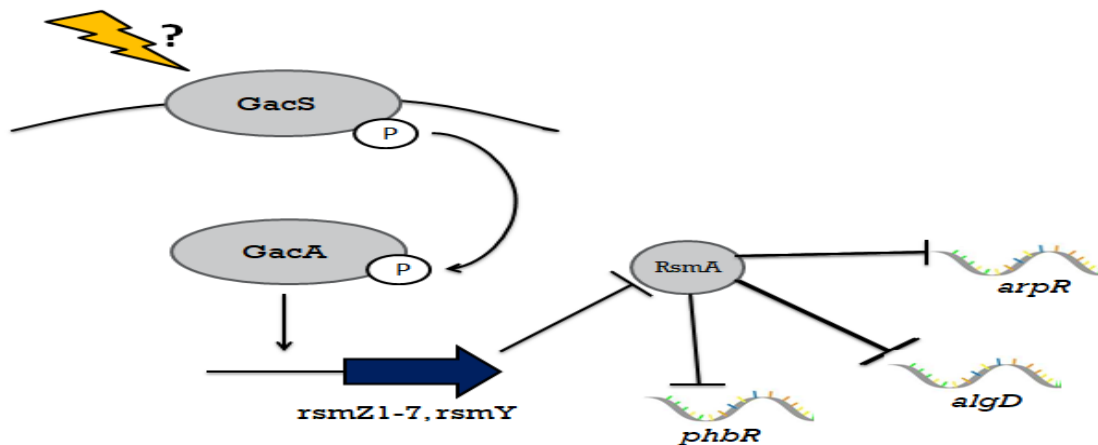


Figura 3. Sistema Gac-Rsm en *A. vinelandii*. Tras la activación orquestada por un estímulo externo aún no reportado, la cinasa sensora GacS fosforila al regulador de respuesta GacA, el cual, entre otras funciones, promueve la transcripción de los pequeños RNA *rsmZ1-7* y *rsmY*. Estos pequeños RNA, al presentar una alta afinidad por RsmA, inhiben su actividad de regulador negativo post-transcripcional que ejerce sobre el transcrito de genes como *phbR* y *algD*.

### 1.5. *Factor de integración al hospedero (IHF)*

A pesar de no poseer un núcleo como en el caso de las células eucariotas, las bacterias han desarrollado mecanismos que le permiten compactar y moldear su cromosoma o regiones de éste con el fin de contender con distintos tipos de estrés de manera adaptativa, así como para mantener una estructura organizada de DNA, RNA y proteínas (Morikawa et al., 2006; Murphy & Zimmerman, 1995). Además de fenómenos como el superenrollamiento de DNA, el nucleoide de las bacterias depende para su organización y compactación de distintos factores como las proteínas asociadas a nucleoide (NAPs, por sus siglas en inglés). Las NAPs, anteriormente denominadas “proteínas parecidas a histonas”, son proteínas abundantes, básicas y generalmente de bajo peso molecular que son capaces de unirse al DNA y, generalmente, alterar o modificar su arquitectura, compactando distintas regiones del cromosoma. Su actividad determina las regiones compactas del nucleoide y aquellas que se encuentran disponibles en respuesta a distintos estímulos con el fin de activar una respuesta apropiada (Dillon & Dorman, 2010; Krogh et al., 2018).

Una de las características más importantes de las NAPs es su capacidad de intervenir en diversos procesos como la transcripción y la recombinación gracias a su afinidad por el DNA e incluso, algunas de ellas son capaces de influenciar la expresión génica a nivel post-transcripcional gracias a que pueden unirse a moléculas de RNA (Dorman, 2014). Las NAPs principales que se han descrito son HU, IHF, HNS, Fis, entre otras, y una gran cantidad de ellas presentan baja especificidad para la secuencia que reconocen, aunque la mayoría se unen a secuencias ricas en AT (Luijsterburg et al., 2006; Prieto et al., 2012).

El factor de integración al hospedero (IHF) es una proteína heterodimérica formada por IHFA e IHFB y se ha reportado que posee especificidad para secuencias que poseen el motivo TCAANNNTTR. IHF es capaz de regular la transcripción a nivel global, generalmente, mediante la inducción de dobleces en el DNA, lo que tiene como consecuencia que la RNA polimerasa establezca interacciones con activadores transcripcionales, formando el complejo abierto de la transcripción. A pesar de que la forma heterodimérica  $\alpha\beta$  es predominante, se ha reportado en *Salmonella enterica* subespecie serovar, que las formas homodiméricas  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$  también son biológicamente activas. Es importante destacar que esta proteína no modifica la expresión de sus blancos por sí sola *in vivo*, ya que su actividad principal es la de alterar la arquitectura del nucleoide, modificando las posibles interacciones entre factores de transcripción y sus secuencias blanco. Adicionalmente, se ha reportado que IHF es capaz de inducir dobleces drásticos en la estructura del DNA de hasta  $180^\circ$  (Dillon & Dorman, 2010; Freundlich et al., 1992; Prieto et al., 2012; Yoshua et al., 2021).

Es importante destacar que *A. vinelandii* posee en su genoma una copia de cada uno de los genes que codifican para cada uno de los monómeros de IHF, denominados *ihfA* e *ihfB*. Además, estos genes no se encuentran formando un operón, por lo que la transcripción de uno es independiente del otro (Figs. 4 y 5).

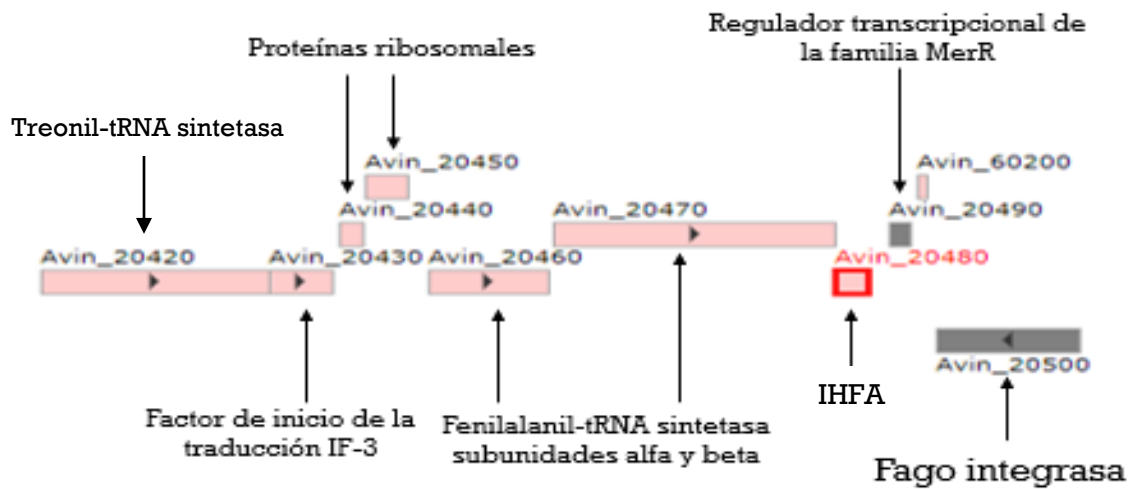


Figura 4. Contexto genómico de *ihfA* en *A. vinelandii*. Las cajas representan la región codificante de cada uno de los genes marcados con flechas negras. A su vez se indica la proteína para la cual codifican. Las flechas negras dentro de las cajas indican la dirección de la transcripción de cada gen. Arriba de cada gen se encuentra escrito su respectivo identificador (Avin) de la base de datos KEGG. Los colores de cada caja representan categorías funcionales a las que pertenecen los distintos genes. En este caso, los marcados en color rosa pertenecen a la categoría de Procesamiento de información genética mientras que los grises no se encuentran clasificados. Obtenido de la base de datos KEGG.

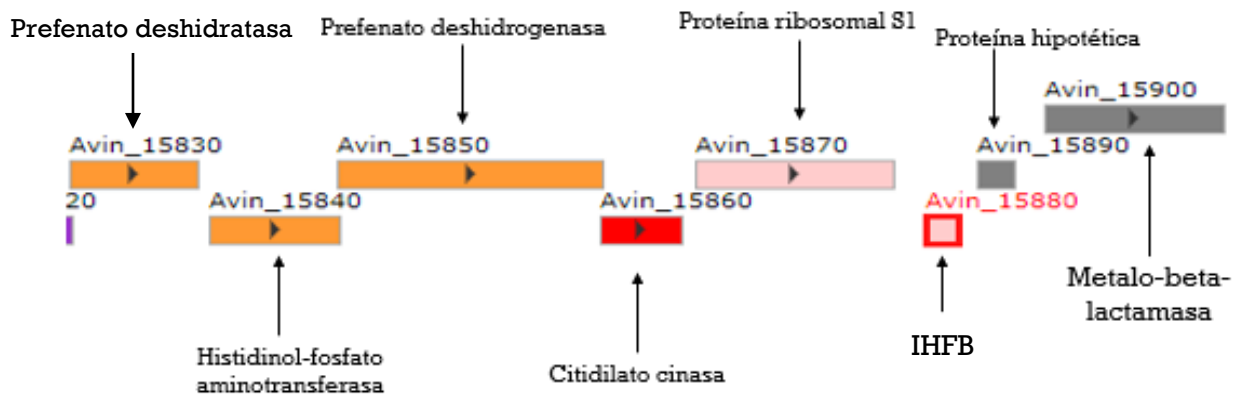


Figura 5. Contexto genómico de *ihfB* en *A. vinelandii*. Las cajas representan la región codificante de cada uno de los genes marcados con flechas negras. A su vez, se indica la proteína para la cual codifican. Las flechas negras dentro de las cajas indican la dirección de la transcripción de cada gen. Arriba de cada gen se encuentra escrito su respectivo identificador (Avin) de la base de datos KEGG. Los colores de cada caja representan categorías funcionales a las que pertenecen los distintos genes. En este caso, los marcados en color rosa pertenecen a la categoría de Procesamiento de información genética, los marcados en color naranja pertenecen a Metabolismo de aminoácidos, el color rojo indica la categoría Metabolismo de nucleótidos y los grises no se encuentran clasificados. Obtenido de la base de datos KEGG.

## 2. Antecedentes

### 1.1. *RsmA controla la expresión de genes involucrados en la síntesis de PHB a nivel post-transcripcional*

En *A. vinelandii*, el sistema Gac-Rsm es un regulador de la síntesis de polímeros. La mutación en la cinasa censora *gacS* presenta una disminución en la producción de alginato y en la transcripción de *algD*, además de una reducción en la acumulación de PHB y deficiencia de enquistamiento, en comparación con la cepa silvestre (Castañeda et al., 2000).

El sistema Rsm controla la síntesis de PHB en *A. vinelandii* por medio de la interacción de la proteína RsmA con la secuencia Shine-Dalgarno de los transcritos de genes que participan en la regulación (*phbR*) y ruta biosintética del polímero (*phbB*). Dicha interacción provoca una disminución en la estabilidad y así en los niveles de los RNAs mensajeros, ocasionando una disminución de la traducción al bloquearse la secuencia Shine-Dalgarno y, por ende, la entrada del ribosoma al complejo traduccional (Hernández-Eligio, et al., 2012).

Se ha reportado que RsmA se une a las moléculas de mRNA de *phbR* y *phbB in vitro*, y que las cepas mutantes en *rsmA* presentan un incremento en el nivel de transcrito de dichos genes, lo que indica que RsmA promueve su degradación e inhibe su traducción. Por otro lado, se ha observado que en *A. vinelandii* la mutación en el gen *gacA*, presenta un fenotipo opuesto a la mutante *rsmA*, es decir, existe una reducción en los niveles de los transcritos de *phbR* y *phbB*. Esto se debe a que GacA activa la transcripción de los RNAs pequeños del sistema Rsm (*rsmZ1-7* y *rsmY*), los cuales antagonizan a RsmA e impiden su interacción con los transcritos

de *phbR* y *phbB*. Es por esto por lo que los pequeños RNA actúan como factores de regulación positiva de la expresión de genes involucrados en la ruta biosintética de PHB. Cabe destacar que hasta ahora, únicamente se ha reportado la interacción *in vitro* de dos de los ocho pequeños RNA (*rsmZ1* y *rsmZ2*) con RsmA (Hernandez-Eligio et al., 2012; Manzo et al., 2012).

### 1.2. *La proteína EIIA<sup>Ntr</sup>, en su estado no fosforilado, promueve la degradación del factor sigma RpoS por medio del complejo chaperona-proteasa ClpAP*

Las bacterias poseen un mecanismo de expresión génica diferencial cuando se encuentran en condiciones adversas, lo que les permite contender con los cambios fisiológicos y metabólicos que son causados por cambios en las condiciones del medio. Un conjunto de proteínas que participan en el proceso de contender contra condiciones deletéreas, son las proteínas de choque térmico, las que incluyen a chaperonas y proteasas que promueven el correcto plegamiento o la degradación de una gran diversidad de polipéptidos. Dentro de este conjunto de proteínas se encuentra la familia de HSP100/Clp ATPasas que realizan las funciones anteriormente mencionadas. Estas proteínas son clasificadas de acuerdo con la presencia de distintos dominios de unión a ATP, aunque existen excepciones, como el caso de ClpP, que no posee dominios de unión a ATP y únicamente tiene actividad de peptidasa. Sin embargo, estas peptidasas son capaces de asociarse a proteínas adaptadoras que regulan la afinidad de la proteasa por los distintos tipos de sustratos (Battesti & Gottesman, 2013; Lemos & Burne, 2002).

En *A. vinelandii*, se ha reportado que la proteasa ClpP, en conjunto con factores de especificidad dependientes de ATP como ClpX y ClpX2, está involucrada en la regulación

del metabolismo del nitrógeno, al promover la degradación de proteínas como NifB y NifEN, que participan en la biosíntesis de cofactores en el complejo de nitrogenasa (Martínez-Noël et al., n.d.).

Por otro lado, se ha reportado que la proteasa ClpP también participa en la regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*. De acuerdo con Muriel-Millán, et al., 2017, la proteasa ClpP, junto con la chaperona ClpA, participan en la degradación del factor sigma de fase estacionaria RpoS. RpoS es un factor de regulación positivo de la transcripción de genes involucrados en la síntesis de PHB tales como *phbR* y *phbB*, por lo que, su degradación tiene como consecuencia una disminución en la síntesis de PHB. La degradación de RpoS por el complejo ClpAP ocurre en la fase estacionaria únicamente cuando la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> del sistema de fosfotransferencia asociado a nitrógeno (PTS<sup>Ntr</sup>) se encuentra en su estado no fosforilado. El sistema PTS<sup>Ntr</sup> consiste en un conjunto de tres proteínas (EI<sup>Ntr</sup>, NPr y EIIA<sup>Ntr</sup>) que participan en una cascada de fosforilación, donde el último aceptor del grupo fosforilo es EIIA<sup>Ntr</sup>. En cepas mutantes de *A. vinelandii* donde EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra no fosforilada, se observa una disminución en la síntesis de PHB debido a la reducción de la expresión de *phbR* y *phbBAC* (Muriel-Millán et al., 2017<sup>a</sup>; Noguez et al., 2008).

Cabe destacar que, Muriel-Millán, et al., 2017, reportó que al cuantificar la actividad transcripcional de *phbB* en cepas mutantes en *ptsP*, es decir, donde EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra no fosforilada, se determinó una disminución en la expresión del gen *phbB* en comparación con la cepa silvestre, ocasionado por la degradación del factor sigma RpoS por el complejo chaperona-proteasa ClpAP. Además, en una doble mutante *ptsP-clpP*, se observó un

incremento de la expresión transcripcional de *phbB* con respecto de la cepa silvestre. Sin embargo, al realizar la cuantificación de la actividad traduccional de *phbB* en la cepa doble mutante *ptsP-clpP*, no se observó un incremento en la actividad (Fig. 6). Adicionalmente, la producción de PHB en la cepa mutante *ptsP-clpP* se encuentra reducida con respecto a la cepa silvestre. Este resultado sugiere que existe un mecanismo de regulación post-transcripcional en el que, la ausencia de ClpP y la condición no fosforilada de EIIA<sup>Ntr</sup>, provoca la disminución en la traducción de *phbB* (Muriel-Millán et al., 2017b). Estos datos permiten proponer la hipótesis de que el efecto negativo sobre la traducción de *phbB* podría estar causado por un regulador negativo post-transcripcional como RsmA.

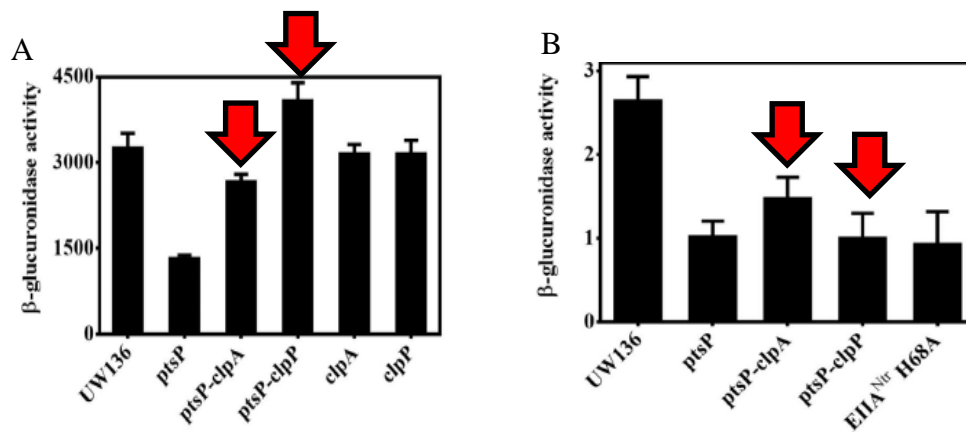


Figura 6. A) Actividad transcripcional de *phbB* en distintas cepas de *A. vinelandii*. B) Actividad traduccional de *phbB* en distintas cepas de *A. vinelandii*. Se encuentran marcadas con flechas rojas las barras que corresponden a las cepas mutantes *ptsP-clpP*, en donde no se observó la recuperación esperada en la actividad traduccional con respecto de la cepa silvestre. Modificado de Muriel-Millán, et al., 2017).



### 1.3. *La expresión de csrA (rsmA) está regulada por IHF y ClpP en Legionella pneumophila*

*L. pneumophila* es una bacteria Gram negativa que se suele encontrar en ambientes de agua dulce y cuya forma de vida es parasítica, ya que habitan dentro de protozoarios. Estas bacterias son capaces de provocar enfermedades respiratorias en humanos que inhalan o aspiran agua contaminada por *Legionella*. La enfermedad que provocan es una forma severa de neumonía (Fields et al., 2002). Esta bacteria es capaz de llevar a cabo un proceso de diferenciación celular donde se producen cambios fisiológicos, morfológicos y metabólicos que depende principalmente de la disponibilidad de nutrientes (Byrne & Swanson, 1998). Estas distintas fases celulares que puede adoptar *L. pneumophila* se denominan replicativa y transmisiva, las cuales son similares a las fases de crecimiento exponencial y post-exponencial, respectivamente, en cuanto a los programas de expresión génica que determinan el estado metabólico de la célula (Oliva et al., 2018).

Se ha reportado que uno de los componentes principales que determinan el estado metabólico y la transición entre fases celulares en *L. pneumophila* es la proteína CsrA, un homólogo a RsmA en *A. vinelandii* (Molofsky & Swanson, 2003).

En el 2019, Ge et al., reportaron que, en *L. pneumophila*, la expresión de *csrA* se encuentra regulada de manera temporal por ClpP, lo cual ocurre en la fase post-exponencial *in vitro*. En esta fase, la transcripción de *csrA* se encuentra regulada de manera negativa por el factor de integración al hospedero (IHF). Sin embargo, durante la fase exponencial (replicativa), ClpP degrada a IHF, lo que promueve la expresión de *csrA*. De esta forma, tanto la expresión como

la acumulación de CsrA se presenta en la fase exponencial debido a la degradación de IHF mediada por ClpP, mientras que, en la fase post-exponencial, la proteasa no degrada a IHF, lo que disminuye la expresión de *csrA* y, adicionalmente, degrada a la proteína CsrA que se encontraba acumulada (Ge et al., 2019).

El modelo propuesto por Ge et al., 2019, podría explicar los resultados de Muriel-Millán, 2017, en donde, en una mutante *ptsP* (donde EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra en su estado no fosforilado) de *A. vinelandii*, la transcripción, pero no la traducción, del gen *phbB*, se recupera al inactivar a *clpP*. Uno de los reguladores negativos de la traducción de *phbB* en *A. vinelandii* es RsmA. Si en *A. vinelandii* se presentase un mecanismo de regulación similar al reportado por Ge et al., 2019, entonces, la inactivación de *clpP* podría promover un aumento en la acumulación de RsmA, lo que explicaría el fenómeno de no recuperación de la traducción de *phbB* en la doble mutante *ptsP/clpP*.

Es importante mencionar que, con respecto a la regulación de la expresión de *rsmA* en *A. vinelandii*, se ha reportado que este gen se transcribe a partir de al menos dos promotores, uno de los cuales es dependiente del factor sigma RpoS (Quiroz-Rocha et al., 2017a). Adicionalmente, el transcrito de *rsmA* es degradado por una vía en la que participa la pirofosfohidrolasa RppH tanto en *A. vinelandii* como en *E. coli* (Bedoya-Pérez et al., 2018).

#### 1.4. *IHF regula la expresión de RNAs pequeños del sistema Csr/Rsm*

Entre la diversidad de blancos de IHF en los genomas bacteriano se encuentran RNAs pequeños pertenecientes al sistema Csr/Rsm. Se ha reportado que en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, IHF es un regulador positivo de la expresión de *csrB*, un pequeño RNA de la familia Csr que inhibe la actividad de CsrA/RsmA, por lo que participa en la regulación de la expresión génica. Además, se demostró que IHF se une directa y específicamente a la región reguladora de *csrB* (Martínez et al., 2014).

Adicionalmente, tanto en *Erwinia amylovora* como en *Salmonella typhimurium*, IHF regula de manera positiva la expresión de *rsmB*, lo cual tiene efectos sobre distintos fenotipos, como la hipermotilidad en mutantes *ihfA*<sup>-</sup> e *ihfB*<sup>-</sup>. Mientras que, en *Pseudomonas protegens*, se ha reportado que IHF induce la expresión de *rsmZ* en fase estacionaria, además que presenta una alta afinidad por su región promotora (Ferreiro & Gallegos, 2021; Lee & Zhao, 2016).

Se ha reportado que existen secuencias putativas de unión a IHF y H-NS en *A. vinelandii* en las regiones promotoras de *rsmZ2* y *rsmZ1* (Figs. 7 y 8) (López-Pliego, 2018). Sin embargo, no se han reportado trabajos experimentales que confirmen la regulación de estos RNAs pequeños por IHF en *A. vinelandii*. No obstante, la existencia de secuencias putativas de unión a proteínas nucleoides en la región promotora de *rsmZ1* y *rsmZ2*, sugiere que su expresión podría estar regulada por estos factores.

*rsmZ1*

**AAACAAAGGAGGCGGGGTAGCCCCCGCCTCCTTGTGTTCCCTTCTTCCCTGGTTCACCATCCTGG**

**TGAATCGCCGTCCTGCGATGTCCCTGGCTGCCATCCCCGTCAGCCGACGTCGTTCCATCGACG**TGGA

AGTGATATTAATCCCTCCGGGAAGGGGACAAGCAGTCGAAAATCGCTCTCCGTCGGTGCTTATGTT  
-10

GCGGTGCAGCAAAGGCCCGCGCTTTTCAATCGCTTGGCACTTTCGCCGCATGTGATGGAGCTCT

Sitio de unión a IHF

TCCAGCCTACCGCACGCATGGTCGATGTCTTACA

Caja de unión a GacA

Figura 7. Representación de *rsmZ1* y su región promotora. Se señalan la secuencia codificante para el pequeño RNA *rsmZ1* con un sombreado negro y letras en color blanco, el sitio -10, el sitio de unión a IHF y la caja de unión a GacA.

*rsmZ2*

**TGTAAGCCATTGCCTACAGGATATGTAGGTCAGATGGTTGCCCGCATCCTGGACGAG**

Caja de unión a GacA

**TACTGGGTATCTTTAATTTATTGATTTTTATGGGTATTTTTTATTTTTTGGAAGCGTCCG**

Sitio de unión a H-NS

TGGCGCCGGGAGCGGGTTTTGGCCCCTTGTTCGCCCGGGGCGCACGCTAATATC  
-10

**GCGTCCGTGTCGACGGAGCGACCGGGTTGTCACGGACGATGACCATGGATTTCG**

**CAGGACGGCGAATCATCAGGATGATGAGCCAGGGAAAAAAGGGAAAAAAGGACTG**

**AAGAGCAGGCGAGGTTATCCTCGCCT**

Figura 8. Representación de *rsmZ2* y su región promotora. Se señalan la secuencia codificante para el pequeño RNA *rsmZ2* con un sombreado negro y letras en color blanco, el sitio -10, el sitio de unión a H-NS y la caja de unión a GacA.

### **3. Hipótesis**

En *A. vinelandii*, RsmA se encuentra regulada a nivel postraducciona por la proteasa ClpP y a nivel transcripcional por IHF de manera directa, o bien indirecta a través de la regulación de la expresión de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2*.

### **4. Objetivo general**

Determinar si la proteasa ClpP regula la estabilidad de RsmA y, si IHF tiene un efecto sobre la expresión de *rsmA*, *rsmZ1* y *rsmZ2*.

### **5. Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de la inactivación de IHF sobre la transcripción de *rsmA*.
- Determinar si ClpP tiene como blanco a RsmA.
- Determinar si IHF tiene un efecto sobre la actividad de RsmA mediante la regulación de la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*

### **6. Materiales y métodos**

#### *1.1. Medios y condiciones de cultivo*

Las cepas de *A. vinelandii* fueron incubadas en medio mínimo Burks-Sacarosa (BS), cuya composición, en g/L, es de: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7.3; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2;

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 160; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5; NaSO<sub>4</sub>, 18.3; Sacarosa, 200. Adicionalmente, se empleó medio PY (por sus siglas en inglés Peptone-Yeast) cuya composición, en g/L, es de: Peptona, 5; Levadura, 3. A este medio se le adicionó sacarosa 2%. Los cultivos líquidos se incubaron con una agitación de 200 rpm, a 30 °C.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo fueron incubadas a 37 °C, en medio Luria-Bertani (LB), que contiene, en g/L: peptona de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5.

### *1.2. Extracción de plásmido por el método del perclorato*

Se incubaron las cepas de *E. coli* en medio LB líquido durante la noche. Se realizó la centrifugación de las muestras y su posterior recuperación en 175 µL de *buffer* TES (Tris 50mM pH 8.5, EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa 15%) y se le añadieron 30 µL de lisozima (10 mg/mL), tras lo cual, se dejaron incubando en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 µL de agua helada, se mezclaron en vórtex y se incubaron a 73 °C durante 15 minutos. Pasado dicho tiempo, se centrifugaron y se les removió el *pellet* utilizando un palillo estéril. Se añadieron 60 µL de NaClO<sub>4</sub> 5 M y 600 µL de isopropanol, tras lo cual, se mezclaron y se centrifugaron por 15 minutos. Después de dicho lapso, se le realizaron 3 lavados a la pastilla celular utilizando 1 mL de etanol 70% y centrifugando durante 10 minutos cada vez. Por último, cada muestra fue secada mediante un equipo Savant™ durante 15 minutos a 60 °C, para, posteriormente, resuspender en 40 µL de RNAsa (20 µg/mL).

### 1.3. Preparación de células competentes de *E. coli*

Se tomó una colonia de *E. coli* y se inoculó medio LB a 200 revoluciones por minuto (rpm) toda la noche. Al día siguiente, se añadió 1 mL del preinóculo a 99 mL de medio LB sin antibiótico y se volvió a incubar a 37 °C hasta que la D.O. (600 nm) estuviese en un valor entre 0.4-0.5. Una vez alcanzada la D.O. deseada, se transfirieron las células a tubos cónicos de 50 mL y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos, tras lo cual, se centrifugaron a 4 °C a 3600 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los *pellets* con 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío, para después incubar en hielo durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las células a 4°C a 3600 rpm durante 10 minutos. Luego, se resuspendieron las pastillas celulares en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> con glicerol 15% frío. Por último, se realizaron alícuotas en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -72 °C.

### 1.4. Transformación de *E. coli*

Se emplearon 200 µL de las células quimiocompetentes preparadas mediante el método descrito en la sección anterior. Primero, se les agregaron 10 µL del plásmido correspondiente. Se incubaron en hielo por 30 minutos y, posteriormente, se les aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos. Después, se les agregó 1 mL de medio LB líquido sin antibiótico y se incubaron durante una hora a 37 °C y 200 rpm. Para finalizar, se plaquearon distintos volúmenes de este cultivo en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente y se incubaron toda la noche junto con un control negativo al que no se le añadió ningún plásmido.

### 1.5. *Extracción de DNA cromosomal de A. vinelandii*

Se incubaron las cepas de *A. vinelandii* en 100 mL de medio BS durante 36 horas a 30 °C. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las células y se les realizó un lavado con 1 mL de solución amortiguadora TE 50/20 (Tris-Cl 50 mM, EDTA pH 8.0 20 mM). Se realizó una segunda centrifugación y la pastilla celular resultante fue resuspendido en 450 µL de solución amortiguadora TE 50/20. A estas soluciones se le agregaron 50 µL de lisozima (10 mg/mL) y se incubaron por 30 minutos a 37 °C. Después, se les agregaron 50 µL de proteasa (10 mg/mL) y se incubaron por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se les agregaron 50 µL de SDS 10% y se incubaron por 15 minutos a 37 °C. Tras esto, se añadieron 100 µL de NaCl 5 M, se mezcló y se incubaron durante 10 minutos a 65 °C. Se adicionaron 80 µL de solución CTAB 10% NaCl 0.7 M previamente calentada y se incubaron por 15 minutos a 65 °C. Se procedió a realizar una serie de extracciones: la primera, con 500 µL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm, recuperando el sobrenadante; la segunda, con 1 volumen de una solución cloroformo-alcohol isoamílico 24:1; y la tercera, con 1 volumen de la solución cloroformo-fenol-alcohol isoamílico, centrifugando cada vez a 13,000 rpm durante 5 minutos. Luego, se añadieron 0.6 volumen de isopropanol y se recuperaron las hebras de DNA por centrifugación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos con 1 mL de etanol 70%, centrifugando y descartando el sobrenadante cada vez. Tras los lavados, las muestras se secaron por medio del equipo Savant™ durante 15 minutos a 65 °C y se resuspendieron en 30 µL de RNAsa (20 µg/mL). Por último, fueron incubadas a 37 °C durante una hora para eliminar el RNA contaminante.



### *1.6. Preparación de células competentes de A. vinelandii*

Se subcultivaron las cepas de *A. vinelandii* a partir de placas frescas en medio CM (medio de competencia) a 30 °C de 24 a 48 horas. Posteriormente, a partir de esos cultivos, se sembraron las células en cajas de CM en toda su superficie y se incubaron a 30 °C de 12 a 15 horas. Pasado ese lapso, se recolectaron las células con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se centrifugaron durante 10 minutos a 4,000 rpm. Por último, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron las células en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

### *1.7. Transformación de células competentes de A. vinelandii con DNA de plásmido o DNA cromosomal*

A 200 µL de células competentes se les agregaron 5µg de plásmido linearizado o 5 µg de DNA cromosomal en un tubo de 1.5 mL. Una vez mezclados ambos componentes, se colocaron sobre medio CM sólido, extendiendo la solución con ayuda de la punta de la micropipeta de 1 mL en una superficie aproximada de 2 cm<sup>2</sup>. Esta mezcla se dejó incubando por 24 horas a 30°C. Posteriormente, pasado ese lapso, se recolectó el tapete con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, lo cual fue utilizado para plaquear en medio de selección. Las incubaciones se mantuvieron de 2 a 4 días a 30 °C.

### *1.8. Cuantificación de proteína por el método de Lowry*

Con el fin de determinar las unidades de nmoles de PNP u ONP producidos/min/µg de proteína en los ensayos de actividad de β-galactosidasa y β-glucuronidasa, se realizaron ensayos de cuantificación de proteína por el método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Para

esto, pasado el tiempo de incubación pertinente, se colectó 1 mL del medio de cultivo para luego centrifugarlo y resuspenderlo en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. De esta solución, se tomaron 20 µL y se le añadieron 180 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Luego, se le añadió 1 mL de solución reactiva (Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N; Solución B: Tartrato de Na y K 2%; Solución C: CuSO<sub>4</sub> 1%) y se mantuvo en reposo durante 10 minutos. Tras dicho tiempo, se agregaron 0.1 mL de reactivo Folin con 1 volumen de H<sub>2</sub>O y se dejaron en reposo por 30 minutos en oscuridad. La lectura de absorbancia se realizó a 625 nm. Al mismo tiempo, se corrió una curva patrón con las concentraciones de albúmina descritas a continuación en µg/mL: 25, 50, 100, 200, 400 y 600. Todos los ensayos de cuantificación de proteína se realizaron por triplicado técnico.

### *1.9. Determinación de la constante de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (g) a partir de una curva de crecimiento*

Con la finalidad de comparar el comportamiento de crecimiento de las cepas mutantes UW *ihfA*, UW *ihfB* y UW *ihfA/ihfB* con el de la cepa control UW136 de una manera cuantitativa, se determinó la constante de crecimiento (μ) (Ecuación 1) de cada una de las cepas, así como su respectivo tiempo de duplicación (g) (Ecuación 2 y 3) empleando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ecuación 1. } \mu = \frac{((\log_{10} N_t - \log_{10} N_0)2.303)}{(t - t_0)}$$

Donde:

N<sub>t</sub>= Concentración de proteína en mg/mL en un tiempo t

N<sub>0</sub>= Concentración de proteína en mg/mL en el tiempo cero (t<sub>0</sub>)

$$\text{Ecuación 2. Número de generaciones en } t - t_0 = \frac{(\log_{10} N_t - \log_{10} N_0)}{\log_{10} 2}$$

$$\text{Ecuación 3. } g = \frac{t - t_0}{\text{Número de generaciones en } t - t_0}$$

Donde:

$N_t$ = Concentración de proteína en mg/mL en un tiempo  $t$

$N_0$ = Concentración de proteína en mg/mL en el tiempo cero ( $t_0$ )

### 1.10. Medición cuantitativa de actividad de $\beta$ -glucuronidasa

Con el fin de realizar la cuantificación de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, se llevó a cabo una medición espectrofotométrica de la absorbancia a 405 nm de las distintas cepas empleadas para el ensayo de cuantificación de actividad transcripcional, utilizando el sustrato cromogénico p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucupiranosido (PNPG).

Para la realización de este ensayo, se incubaron las cepas empleadas, en medio PY líquido adicionado con sacarosa 2% y los antibióticos correspondientes, a 30 °C durante 72 horas. Para cada una de las cepas se tomaron muestras a las 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas, las cuales fueron centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos, para luego ser resuspendidas en 730  $\mu$ L de *buffer* Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.04 M, KCl 0.01 M,  $\text{MgSO}_4$  0.001 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05 M), y adicionalmente, se les agregaron 10  $\mu$ L de lisozima y 10  $\mu$ L de Tritón X-100. Por último, se le adicionó a cada una de las muestras 100  $\mu$ L de sustrato PNPG, e inmediatamente se colocaron en una incubadora a 37 °C con agitación. Una vez colocadas

las muestras en la incubadora, se tomó el tiempo de reacción, marcado por un cambio de tonalidad en la muestra de transparente a amarillo, en cuanto cada tubo se tornó amarillo, se le agregó 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M para detener la reacción.

Tras finalizar el procedimiento, se procedió a realizar la medición de absorbancia de cada una de las muestras a 405 nm contra un blanco al que se le realizó el mismo procedimiento. Adicionalmente se realizó la cuantificación de proteína en  $\mu\text{g/mL}$  de cada muestra mediante el método de Lowry. La actividad obtenida, en unidades de  $\beta$ -glucuronidasa (nmoles de PNP producidos/min/ $\mu\text{g}$  de proteína), se obtiene mediante la siguiente ecuación:

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

### *1.11. Corte de extremos 3' en el vector pJETihfARc digerido con la enzima BstXI*

Con el fin de construir la cepa mutante UW*ihfA*<sup>-</sup>, se buscó un sitio único de corte dentro de la secuencia codificante de *ihfA* en *A. vinelandii* y se encontró un sitio BstXI. El gen *ihfA* se amplificó por medio de una PCR a partir de DNA cromosomal de la cepa UW136 de *A. vinelandii* empleando los oligonucleótidos ihfAFwRc e ihfARvRc descritos en la tabla 1 en la sección de Anexos en este trabajo. Posteriormente, el amplicón obtenido fue clonado en el vector pJET1.2 Blunt, el cual fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* Top10. Posteriormente se realizó la purificación del plásmido obtenido por el método del perclorato y, una vez purificado, se llevó a cabo una digestión con BstXI de *ihfA* dentro del vector pJET 1.2Blunt. Luego, se procedió a realizar un corte de extremos 3' de la digestión

resultante debido a que dicho extremo no es compatible con los extremos romos que genera la digestión con SmaI que se empleó para liberar el casete de resistencia de gentamicina. Para ello, se incubaron 2 µL del vector digerido con BstXI junto con 1 µL de DNA Blunting Enzyme que forma parte del kit CloneJET PCR Cloning de ThermoScientific™ y 10 µL de la solución tampón del mismo kit mencionado. La mezcla fue incubada a 70 °C por 10 minutos y, posteriormente, se añadió 1 µL de ligasa y se llevó el volumen de reacción a 20 µL con el fragmento correspondiente al casete de gentamicina.

### *1.12. Construcción de mutantes de la cepa UW136 de A. vinelandii*

Se construyeron cepas mutantes de la variante silvestre UW136 de *A. vinelandii*, en donde se realizaron mutaciones por inserción de los genes *ihfA* (Avin\_20480), *ihfB* (Avin\_15880), así como la doble mutante *ihfA*/*ihfB* mediante el método de recombinación homóloga. Para ello, se emplearon los oligonucleótidos *ihfARcFw*, *ihfARcRv*, *ihfBRcFw* e *ihfBRcRv* descritos en la tabla 1 con el fin de amplificar los genes *ihfA* e *ihfB* empleando como templado DNA cromosomal de la cepa UW136. Una vez realizada la reacción de PCR con dichos oligonucleótidos, se comprobó la banda esperada de 509 pb en un gel de agarosa (Fig. 9) y se procedió a utilizar el producto de amplificación para realizar una reacción de ligación con el vector pJET Blunt 1.2. La reacción de ligación se mantuvo durante toda la noche a 22 °C.

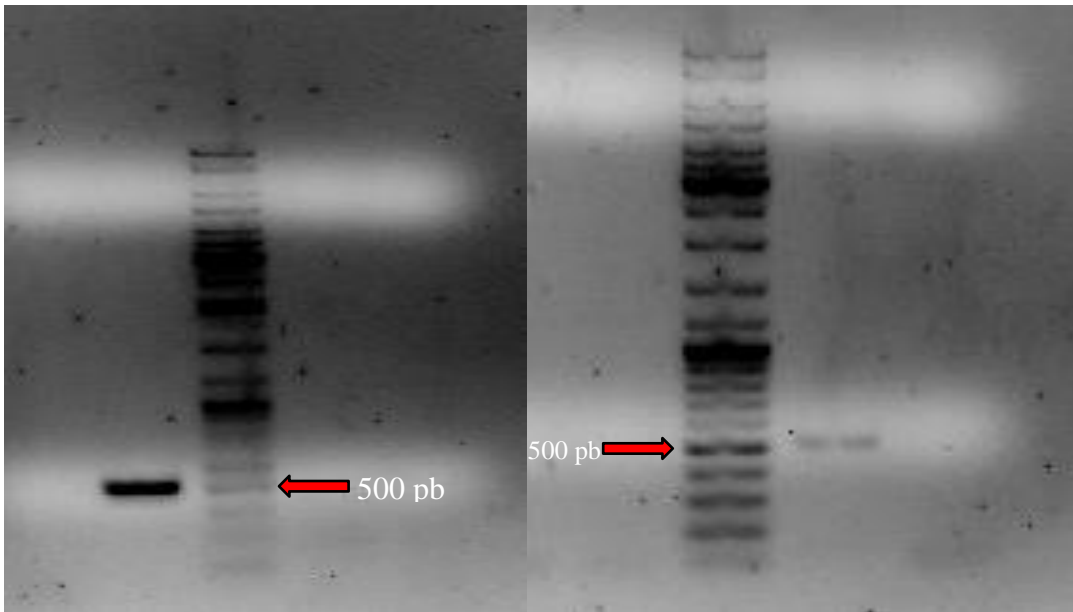


Figura 9. PCR de DNA cromosomal de la cepa UW136 de *A. vinelandii* empelando los oligonucleótidos *ihfAFwRc*, *ihfARvRc*, *ihfBFwRc* e *ihfBRvRc*, obteniendo la banda esperada de 509 pb para ambos casos.

Posteriormente, se empleó el producto de ligación para transformar células competentes de *E. coli* de la cepa Top10, las cuales fueron sembradas en medio LB complementado con ampicilina y se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron y posteriormente se sembraron distintas candidatas en medio LB líquido durante toda la noche con el fin de realizar la extracción de plásmido con el método del perclorato. Una vez purificado el plásmido, se procedió a comprobar que los genes *ihfA* e *ihfB* se ligaron correctamente en el vector (Fig. 10) mediante una reacción de digestión con la enzima BglII, obteniendo una banda de 2928 pb y otra de 555 pb para ambos plásmidos. De esta manera, se obtuvieron los vectores pJET*ihfARc* (Fig. 11) y pJET*ihfBRc* (Fig. 12).

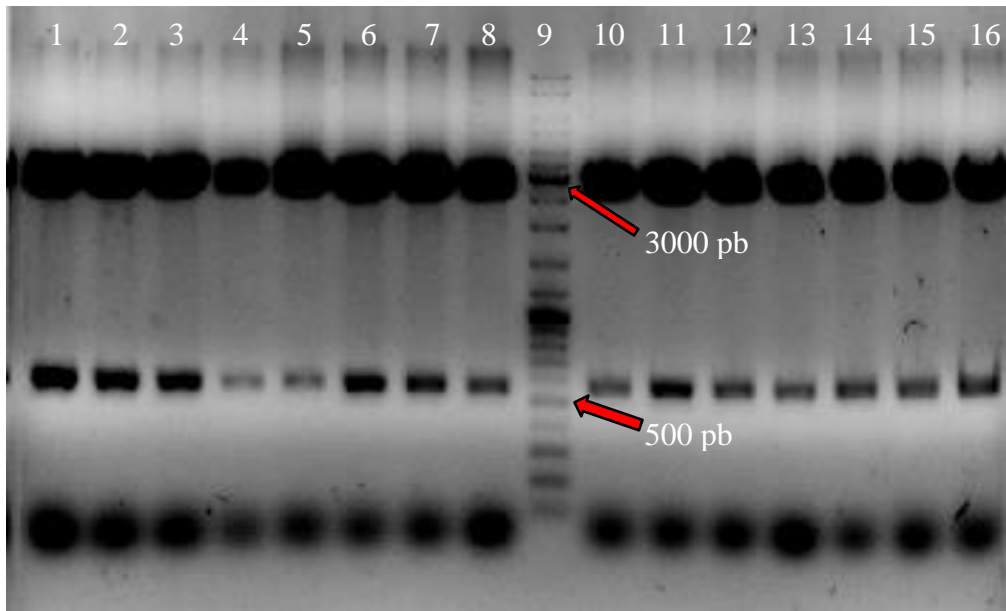


Figura 10. Digestión de plásmidos pJET*ihfARc* (Carriles 1-8) y de pJET*ihfBRc* (Carriles 10-16) con BglII. Se obtuvo el patrón esperado de 2928 pb y 555 pb.

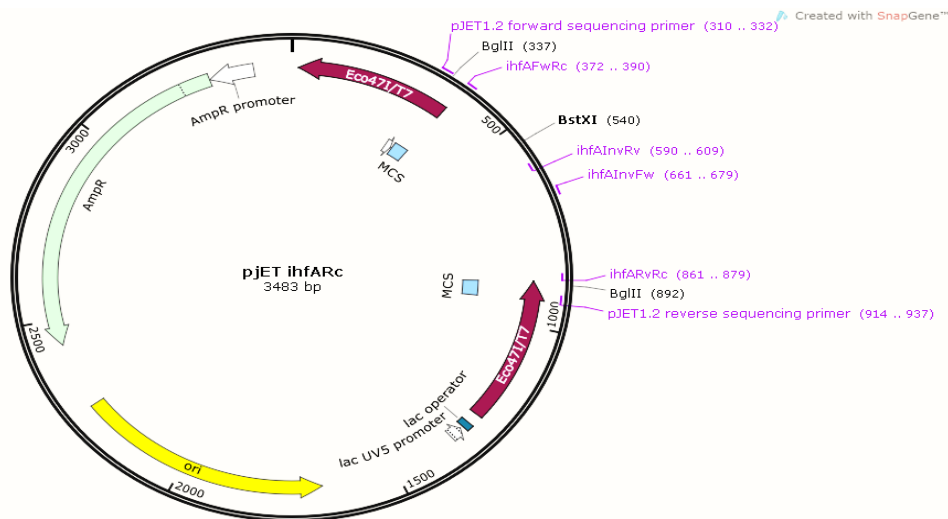


Figura 11. Mapa del vector pJET*ihfARc*, se marcaron los sitios de restricción BglII. Se muestra el sitio único de restricción BstXI dentro de la secuencia codificante de *ihfA*.

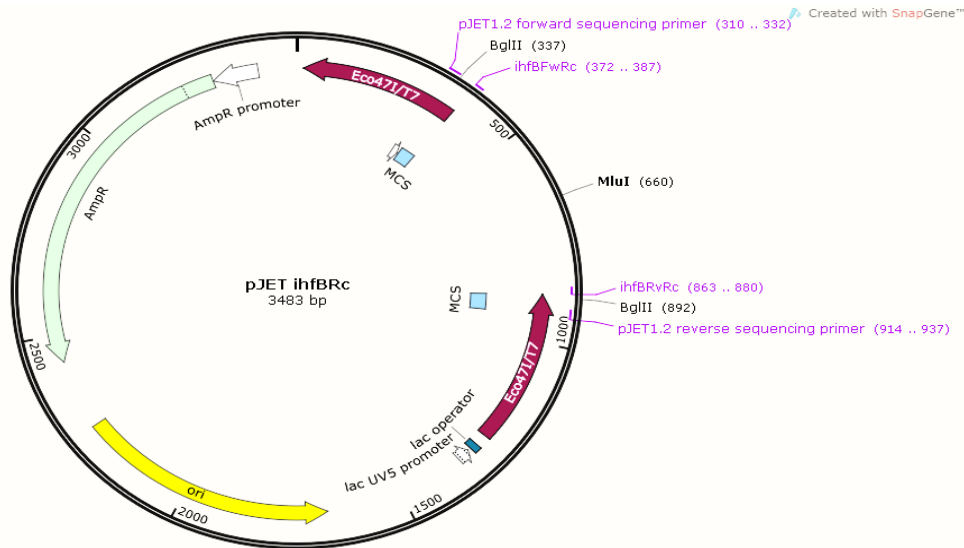


Figura 12. Mapa del vector pJET*ihfBRc*, se marcaron los sitios de restricción BglII. Se muestra el sitio único de restricción MluI dentro de la secuencia codificante dentro de *ihfB*.

Empleando el *software* SnapGene™ 1.1.3, se buscaron sitios únicos de restricción dentro de los genes *ihfA* e *ihfB*, con el fin de realizar la reacción de digestión para linearizar los vectores pJET*ihfARc* y pJET*ihfBRc*, e insertar un casete de resistencia. En el caso de pJET*ihfARc*, se seleccionó un sitio de restricción BstXI mostrado en la figura 7, mientras que para pJET*ihfBRc* se seleccionó un sitio MluI mostrado en la figura 8.

Los casetes de resistencia fueron obtenidos a partir de los vectores pBSL141-Gentamicina y pBSL99-Kanamicina. El casete de gentamicina fue liberado del vector mediante una reacción de digestión con la enzima SmaI. Lo mismo se realizó para liberar el casete de kanamicina con la enzima MluI. Ambas reacciones fueron cargadas en un gel de agarosa y se purificó la banda correspondiente a cada uno de los casetes mediante el GeneJET Gel Extraction Kit de ThermoScientific™.



Una vez obtenidos los casetes de resistencia de kanamicina y gentamicina, se procedió a linearizar los vectores pJET*ihfA*Rc y pJET*ihfB*Rc con las enzimas *Bst*XI y *Mlu*I, respectivamente. Luego se realizaron las reacciones de ligación correspondientes, el casete de kanamicina se ligó al vector pJET*ihfB*Rc linearizado, mientras que el casete de gentamicina se ligó al vector pJET*ihfA*Rc. Las reacciones de ligación se mantuvieron a 22 °C durante toda la noche. Una vez completada la reacción de ligación, se obtuvieron los vectores denominados pJET*ihfA*::Gm y pJET*ihfB*::Km. Se procedió a transformar células competentes Top10 con las reacciones de ligación, las células se dejaron incubando en medio LB sólido adicionado con gentamicina en el caso de las células transformadas con el vector pJET*ihfA*::Gm y con kanamicina para las células transformadas con el plásmido pJET*ihfB*::Km. Posteriormente se seleccionaron distintas candidatas para inocular medio LB líquido, los cultivos se mantuvieron a 37 °C toda la noche. Luego se llevó a cabo el protocolo de extracción de plásmido de las distintas candidatas seleccionadas.

Con el fin de comprobar la orientación de los casetes de resistencia dentro de la secuencia codificante de los genes *ihfA* e *ihfB* en los vectores pJET*ihfA*::Gm y pJET*ihfB*::Km, respectivamente, se realizaron reacciones de digestión de los plásmidos extraídos con enzimas que resultasen en un patrón de digestión distinto dependiendo de la orientación del casete. En el caso de *ihfA*, se realizó una digestión con la enzima *Eco*RI, la cual, generó un patrón de 3163 y 1241 pb para la orientación no polar, y otro de 4064 y 340 pb para la polar (Fig. 13). Por otro lado, para *ihfB*, se llevó a cabo una digestión con la enzima *Nco*I, que generó un

patrón de 4162 y 523 pb para la orientación no polar y otro de 3492 y 1193 pb para la polar (Fig. 14).

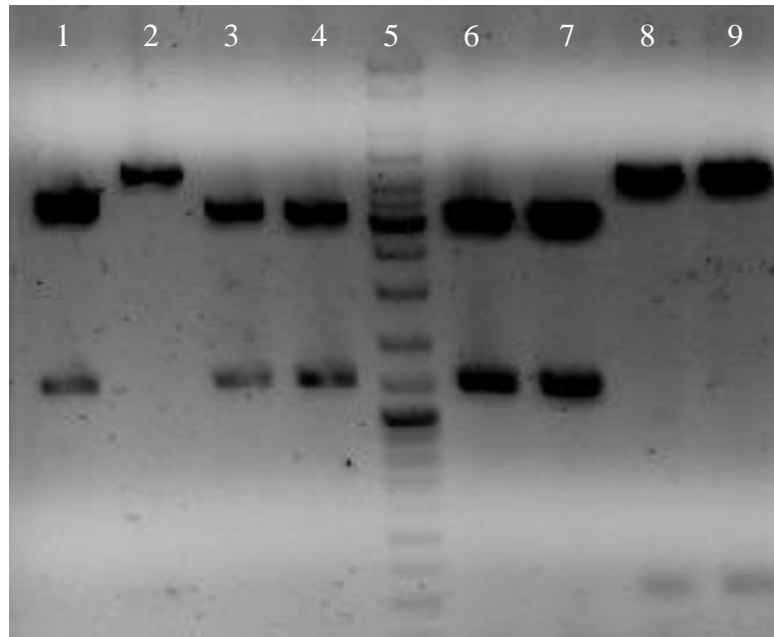


Figura 13. Patrón de digestión del vector pJET*ihfA*::Gm con la enzima EcoRI. Se observa la orientación no polar del casete en los carriles 1, 3, 4, 6 y 7. La orientación polar se observa en los carriles 2, 8 y 9.

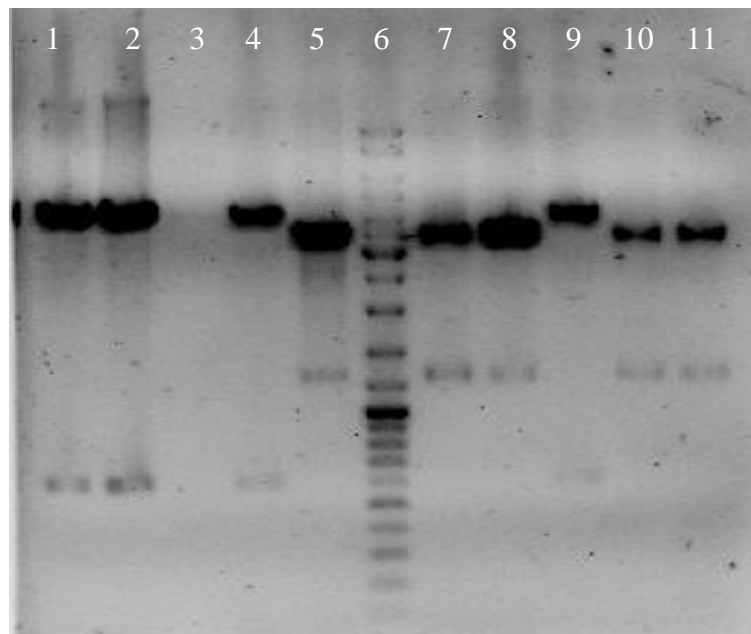


Figura 14. Patrón de digestión del vector pJET*ihfB*::Km con la enzima NcoI. Se observa la orientación no polar del casete en los carriles 1, 2, 4 y 9. La orientación polar se observa en los carriles 5, 7, 8, 10 y 11.

Tras comprobar que se habían obtenido tanto la orientación no polar como la polar para ambos vectores (pJET*ihfA*::Gm y pJET*ihfB*::Km), se procedió a realizar la transformación de la cepa silvestre UW136 con los vectores linearizados correspondientes a la orientación no polar, mediante una reacción de digestión con la enzima ScaI. Una vez obtenidas colonias candidatas para las cepas UW*ihfA*::Gm y UW*ihfB*::Km, se procedió a realizar un PCR de colonia con los oligonucleótidos *ihfARcFw*, *ihfARcRv*, *ihfBRcFw* e *ihfBRcRv*, y empleando DNA cromosomal de la cepa UW136 como control negativo, con el fin de comprobar que las células tuviesen una copia mutante de ambos genes (Figs. 15 y 16).

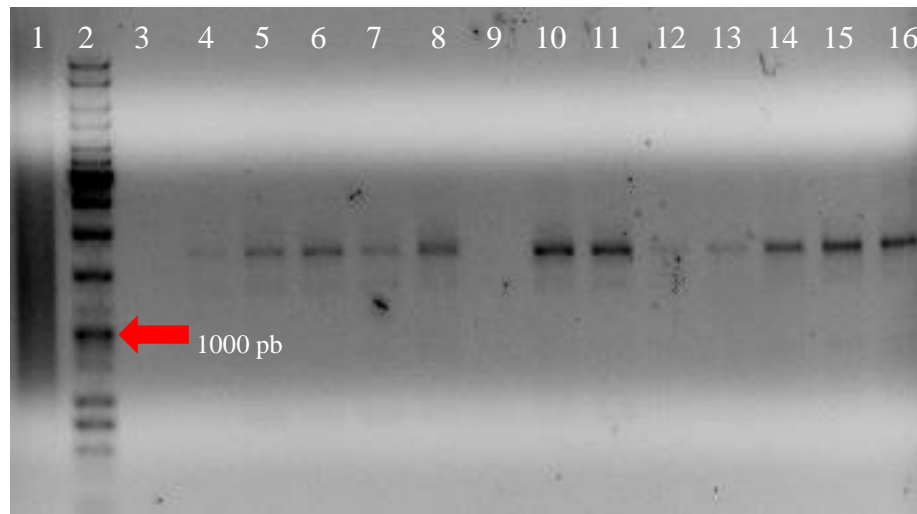


Figura 15. PCR de colonia de candidatas UW*ihfB*::Km con los oligonucleótidos *ihfBRcFw* e *ihfBRcRv*. En los carriles 3 a 16 se cargaron las muestras de DNA correspondientes a las colonias candidatas de tener la versión mutante de *ihfB* que posee un tamaño de 1712 pb.

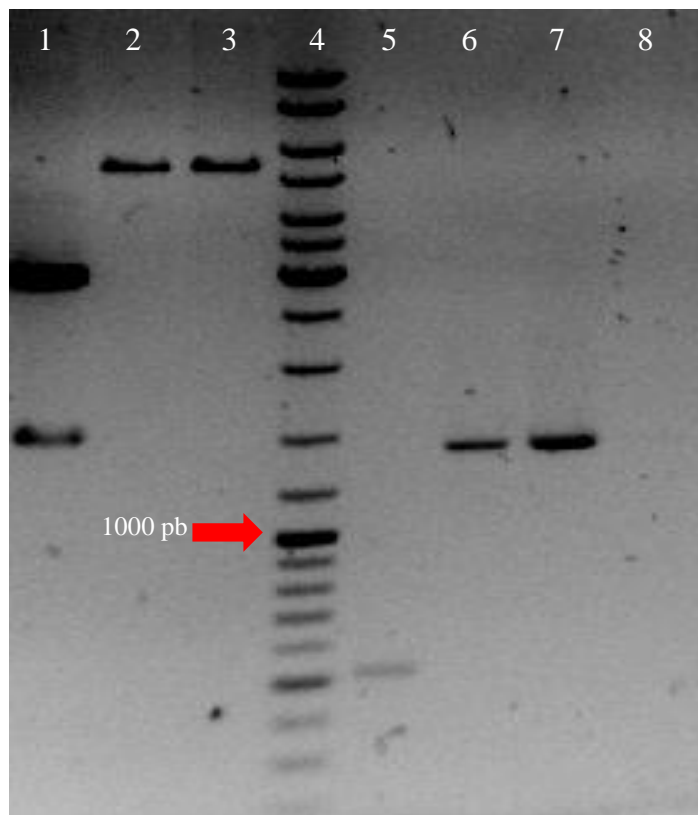


Figura 16. PCR de colonia de candidatas UW*ihfA*::Gm con los oligonucleótidos *ihfARcFw* e *ihfARcRv*. En los carriles 6 a 8 se cargaron las muestras de DNA correspondientes a las colonias candidatas de tener la versión mutante de *ihfB* que posee un tamaño de 1430 pb.

Para la construcción de la cepa doble mutante UW*ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>, se prepararon células competentes de la cepa UW*ihfA*<sup>-</sup>, las cuales fueron transformadas con DNA cromosomal obtenido de la cepa UW*ihfB*<sup>-</sup>. Las colonias candidatas obtenidas se seleccionaron y se sembraron en cajas de medio BS sólido adicionado con los dos marcadores de resistencia correspondientes, kanamicina y gentamicina.

### 1.13. Cuantificación de la transcripción de *rsmA*, *rsmZ1*, *rsmZ2* y *phbR*

Con la finalidad de determinar si IHF regula la transcripción de *rsmA*, se realizó la determinación del perfil de expresión de *rsmA* en las cepas mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup>, UW

*ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> y UW *clpP*<sup>-</sup>. Para ello, se empleó la cepa UW*rsmA*-T, la cual posee una fusión transcripcional de *rsmA* con el reportero *gusA* integrada en el cromosoma de la cepa UW136 de *A. vinelandii*. Esta fusión contiene un fragmento de 274 pb que corresponden al promotor de *rsmA* fusionado a la secuencia de *gusA* de acuerdo con lo reportado por Bedoya-Pérez, et al., 2018. Se llevó a cabo la extracción de DNA cromosomal de las cepas mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup>, UW *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> y UW *clpP*<sup>-</sup> con el fin de utilizar dicho DNA para transformar células competentes de *A. vinelandii* de la cepa UW*rsmA*-T. De esta forma se obtuvo cada una de las cepas mutantes con la construcción de la fusión transcripcional de *rsmA* con la finalidad de cuantificar su expresión.

Se cultivaron las cinco cepas mutantes mencionadas, junto con la cepa silvestre UW136 como control, en medio BS líquido adicionado con rifampicina y los marcadores de selección correspondientes a cada cepa durante 18 horas a 30 °C, a manera de preinóculo. Posteriormente, se realizó la medición de la D.O. a 600 nm de cada uno de los preinóculos con el fin de normalizar todos los inóculos a una D.O. de 0.1. La inoculación se llevó a cabo en medio PY sacarosa 2% por triplicado biológico para cada cepa.

Todos los cultivos fueron incubados durante 72 horas a 30 °C con agitación de 200 rpm. Para la muestra que correspondió a las 8 horas, se empleó el volumen total de 25 mL de cultivo, mientras que para los demás tiempos se tomó 1 mL de cada cultivo.

Una vez tomadas las muestras correspondientes a las 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas para cada una de las cepas, se procedió a realizar el ensayo de cuantificación de proteína por el método de Lowry; así como el de cuantificación de actividad transcripcional con el gen *gusA* como reportero por el método de  $\beta$ -glucuronidasa, empleando el sustrato cromogénico 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNPG).

Para la cuantificación de la expresión de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2*, se siguió el mismo procedimiento que el descrito para la cuantificación de la transcripción de *rsmA*. En este caso se emplearon las cepas SAWZ1 y SAWZ2 que poseen fusiones transcripcionales de *rsmZ1* y *rsmZ2* con el gen reportero *gusA* (Hernandez-Eligio et al., 2012). Se prepararon células competentes de las cepas SAWZ1 y SAWZ2 y se realizó la transformación de dichas células con DNA cromosomal de las mutantes UWihfA<sup>-</sup>, UWihfB<sup>-</sup> y UWihfA<sup>-</sup>/UWihfB<sup>-</sup>.

El mismo procedimiento fue realizado para cuantificar la transcripción y la traducción de *phbR*. En este caso se emplearon las cepas AHW5 (Hernandez-Eligio et al., 2011) y UW*phbR*gusTd (Este trabajo), que poseen fusiones transcripcional y traduccional, respectivamente, con el gen reportero *gusA*. Se prepararon células competentes de las cepas mencionadas y se realizó la transformación de dichas células con DNA cromosomal de las mutantes UWihfA<sup>-</sup>, UWihfB<sup>-</sup> y UWihfA<sup>-</sup>/UWihfB<sup>-</sup>.

#### 1.14. Construcción de fusión traduccional *phbR::gusA*

Se realizó la construcción de *phbR::gusA* traduccional con la finalidad de cuantificar la traducción de *phbR* en el cromosoma de *A. vinelandii*. Para ello, se realizó una PCR punto final de la región promotora de *phbR* y los primeros 16 codones de su secuencia codificante. El oligonucleótido *forward* empleado (FwphbRXbaI), posee una secuencia de XbaI, mientras que el oligonucleótido *reverse* (RvphbRgusA), posee los primeros 20 nucleótidos de la secuencia de *gusA* en su extremo 5', con el fin de hibridar la secuencia de *phbR* con la de *gusA*. Por otro lado, se amplificó por medio de una PCR punto final, la secuencia codificante de *gusA*. El oligonucleótido *forward* empleado (FwgusAphbR), posee los primeros 20 nucleótidos de la secuencia codificante de *phbR* en su extremo 5' con la finalidad de hibridar la secuencia de *phbR* con la de *gusA*. Mientras que, el oligonucleótido *reverse* (RvgusAPpuMI), posee en su extremo 5' una secuencia de PpuMI. Los amplicones resultantes, tanto de *phbR* como de *gusA*, fueron purificados empleando el GeneJET Gel Extraction Kit de ThermoScientific™.

Posteriormente, los amplicones purificados fueron empleados como DNA templado en una reacción de PCR punto final, en la cual se dejaron correr 13 ciclos sin oligonucleótidos con el fin de que se realizara la hibridación entre ambos amplicones. Una vez pasados los 13 ciclos, se añadieron los oligonucleótidos FwphbRXbaI y RvgusAPpuMI y se dejaron correr 34 ciclos adicionales, con la finalidad de obtener el amplicón correspondiente a la fusión *phbR::gusA* traduccional, flanqueada con sitios de restricción XbaI-PpuMI. El amplicón resultante de 2182 pb fue clonado en el vector pJET1.2-Blunt y se realizó la transformación de células quimiocompetentes *E. coli* Top10. Una vez obtenida la cepa Top10pJET*phbRgusA*Td, se llevó

a cabo la extracción de plásmido por el método del perclorato y se realizaron reacciones de digestión, tanto del vector pJET*phbRgusATd*, como del pUMAgusA con las enzimas XbaI y PpuMI para ambos casos. Los fragmentos obtenidos se emplearon en una reacción de ligación que se mantuvo a 16 °C durante toda la noche y el vector obtenido, denominado pUM*AphbRgusATd* (Fig. 17), fue empleado para transformar celular quimicompetentes *E. coli* Top10.

Posteriormente, el vector pUM*AphbRgusATd* fue purificado con el método de perclorato y se le realizó una reacción de digestión con la enzima ScaI con el fin de linearizar el plásmido. El vector linearizado fue utilizado para transformar células competentes de la cepa UW136 de *A. vinelandii*, aprovechando los sitios de recombinación de *mela* del plásmido pUM*AphbRgusATd* para insertar la construcción de la fusión traduccional de *phbR* en el cromosoma de *A. vinelandii*, obteniendo como resultado la cepa UW*phbRgusATd*.

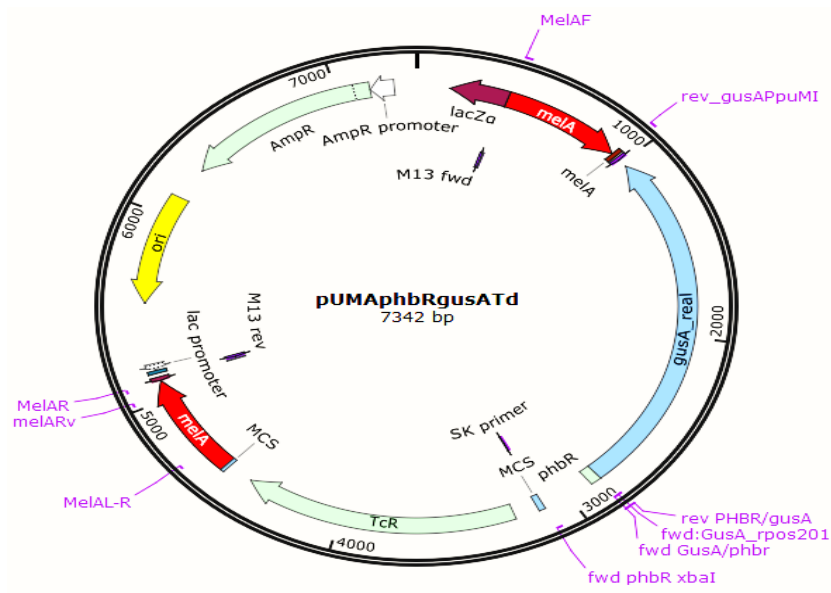


Figura 17. Vector pUM*AphbRgusATd* construido para la cuantificación de la traducción de *phbR*.



La secuencia de los oligonucleótidos mencionados se encuentra en la tabla 1 en la sección de Anexos de este trabajo.

### *1.15. Extracción y cuantificación de polihidroxibutirato (PHB)*

Para realizar la extracción y cuantificación de PHB de las cepas mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup> y UW *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>, se siguió el método espectrofotométrico descrito por Law y Slepecky (LAW & SLEPECKY, 1961). Para ello, se realizaron preinóculos de cada una de las cepas empleadas: UW136, UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup> y UW *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>, en medio BS líquido y se incubaron a 30 °C durante 18 horas. Posteriormente, se realizó la medición de la D.O. a 600 nm de cada uno de los preinóculos con el fin de normalizar todos los inóculos a una D.O. de 0.1. La inoculación se llevó a cabo en medio PY sacarosa 2% por triplicado biológico para cada cepa.

Todos los cultivos fueron incubados durante 72 horas a 30 °C con agitación de 200 rpm. Se tomó una muestra de 1 mL de cada una de las cepas empleadas a las 18 y a las 72 horas. Una vez obtenidas todas las muestras, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos y se les realizó un lavado con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> para después volver a centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, se le agregó al paquete celular 1 mL de hipoclorito de sodio al 30%, se resuspendió y se mantuvo en incubación durante 1 hora a 37 °C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13000 rpm y se lavó el paquete celular con 1 mL de agua, para después realizar otra centrifugación. Después, se le agregó al paquete celular 1 mL de etanol absoluto, se resuspendió y se centrifugó por 20

minutos a 13000 rpm. Una vez descartado el sobrenadante con ayuda de una pipeta, se le agregó al paquete celular 1 mL de acetona fría y se resuspendió para después centrifugar a 13000 rpm durante 20 minutos, tras lo cual, se descartó el sobrenadante y se dejaron secando las muestras durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se resuspendió el PHB obtenido en 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calentaron los tubos a 95 °C durante 10 minutos. Por último, se procedió a leer la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a 235 nm utilizando celdas de cuarzo y ácido sulfúrico concentrado como blanco.

#### *1.16. Evaluación cualitativa de la producción de alquilresocinoles (ARs)*

Con el fin de evaluar el fenotipo de producción de alquilresorcinoles (ARs) en las cepas mutantes en IHF de *A. vinelandii*, y en la cepa silvestre como control, se empleó el método colorimétrico con sales de Azul Rápido B (Sampietro et al., 2021). Para ello, se pusieron a incubar preinóculos de cada una de las cepas mutantes *UWihfA<sup>-</sup>*, *UWihfB<sup>-</sup>* y *UWihfA<sup>-</sup>/ihfB<sup>-</sup>*, así como de la cepa silvestre UW136 a 30°C durante toda la noche. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada uno de los cultivos, se lavaron las células y se resuspendieron en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Luego, se inocularon 20 µL en cajas de medio Burk-Butanol que se incubaron a 30 °C para teñirse con la solución de Azul Rápido a las 120 horas.

La solución de tinción de Azul Rápido se preparó en un volumen de 50 mL empleando 2.5 mL de ácido acético, 250 mg de Azul B Rápido y 47.5 mL de agua.

## 7. Resultados y discusión

### 1.1. Análisis de homología de IHFA e IHFB de *A. vinelandii* y otras especies

El genoma de *A. vinelandii* posee genes homólogos a *ihfA* e *ihfB*. El porcentaje de identidad de las proteínas codificadas en estos genes entre *A. vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como con sus homólogos en *L. pneumophila* y *Escherichia coli* fue analizada mediante un alineamiento realizado por medio del programa de alineamiento ClustalOmega (Madeira et al., 2022) (Figs. 18 y 19).

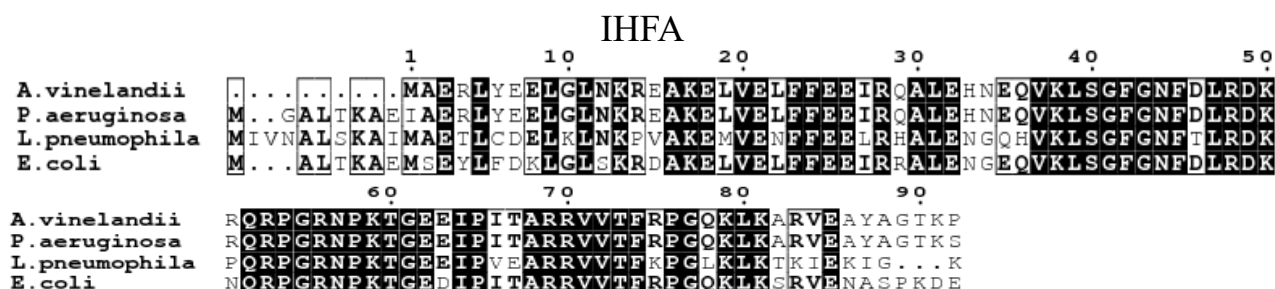


Figura 18. Alineamiento de secuencias de IHFA de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* y *E. coli* a nivel de aminoácidos. Los residuos de aminoácido similares entre las cuatro secuencias se encuentran delimitados por un borde negro. Las posiciones donde coincide el mismo aminoácido en las cuatro secuencias se encuentran sombreadas en negro con letras en blanco. Los números en la parte superior de la figura corresponden a la posición del correspondiente aminoácido en la secuencia de IHFA de *A. vinelandii*.

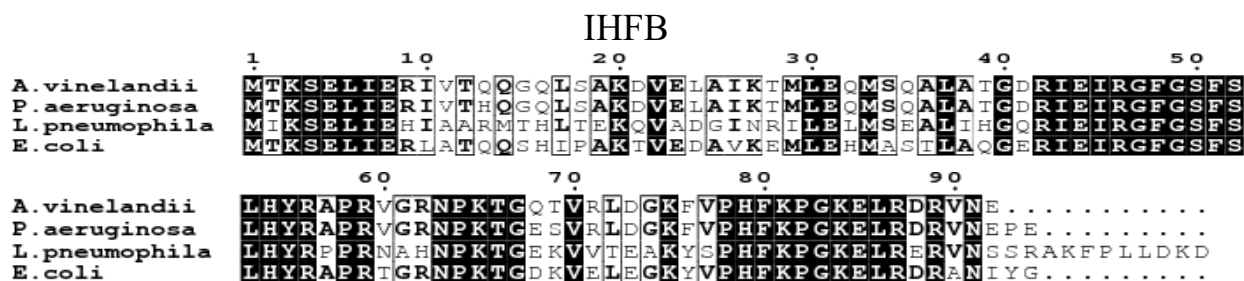


Figura 19. Alineamiento de secuencias de IHFB de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* y *E. coli* a nivel de aminoácidos. Los residuos de aminoácido similares entre las cuatro secuencias se encuentran delimitados por un borde negro. Las posiciones donde coincide el mismo aminoácido en las cuatro secuencias se encuentran sombreadas en negro con letras en blanco. Los números en la parte superior de la figura corresponden a la posición del correspondiente aminoácido en la secuencia de IHFB de *A. vinelandii*.

De acuerdo con los alineamientos realizados, el monómero IHFA de *A. vinelandii* presenta una identidad del 97.83% con IHFA de *P. aeruginosa*, mientras que, con *L. pneumophila* y *E. coli* posee una identidad del 69.66% y del 78.26%, respectivamente. Por otro lado, en el caso de IHFB, la proteína de *A. vinelandii* presenta porcentajes de identidad de 96.74%, 60.87% y 73.91% con las proteínas de *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* y *E. coli*, respectivamente. Debido a los altos porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos entre IHFA e IHFB de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *L. pneumophila*; arriba del 50%, es probable que el heterodímero IHFAB presente similitudes en las secuencias blanco, entre las que se encuentran RNAs pequeños del sistema Rsm/Csr y RsmA en *L. pneumophila* (Ge et al., 2019; Vakulskas et al., 2015). Por lo tanto, se sugiere que IHF en *A. vinelandii* se encuentra regulando genes y sistemas de regulación similares a los descritos en las otras especies mencionadas.

Este resultado concuerda con los datos reportados en la literatura, ya que las proteínas asociadas a nucleoide (NAPs), en general, se encuentran bien conservadas en bacterias. Es importante destacar que aunque IHF no presenta una distribución tan amplia como otras NAPs tales como HU, presenta un alto grado de conservación en bacterias Gram negativas, particularmente en aquellas que pertenecen al filo Proteobacteria, como es el caso de los géneros *Azotobacter*, *Echerichia*, *Pseudomonas* y *Legionella* (Goodman et al., 1999; Nash, 1996; Oberto et al., 1994).

### 1.1. La mutación en *ihfA* y/o en *ihfB* tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *A. vinelandii*

Con el fin de determinar si IHF juega un papel en la regulación de la síntesis de PHB a través de controlar la expresión de los reguladores RsmA y/o *rsmZ1* y *rsmZ2* se construyeron, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, las cepas de *A. vinelandii* derivadas de la cepa UW136 con mutaciones en los genes *ihfA*, *ihfB*, así como la doble mutante *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>. En la figura 20 se muestra el fenotipo de crecimiento de las tres mutantes mencionadas comparadas con la cepa silvestre UW136 (Fig. 20). El ensayo de crecimiento se realizó en medio PY sacarosa 2%, a través de la cuantificación de la proteína total mediante el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry et al., 1951).

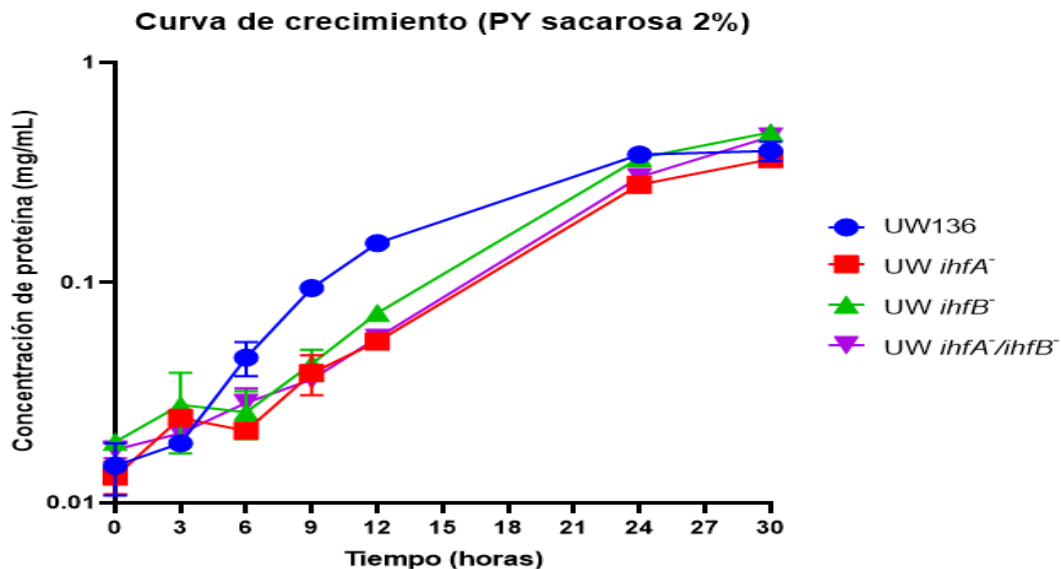


Figura 20. Curva de crecimiento de las cepas mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup>, *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> y la cepa silvestre UW136. La medición se realizó a las 3, 6, 9, 12, 24 y 30 horas en medio PY sacarosa 2% a 30 °C. Los valores de crecimiento fueron medidos por concentración de proteína (mg/mL). Se realizó una prueba ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar el valor de proteína entre las cepas mutantes y la cepa silvestre UW136 en cada tiempo.

Tabla 1. Constante de crecimiento calculada en horas<sup>-1</sup> y tiempo de duplicación calculado en horas de cada una de las cepas empleadas en la curva de crecimiento presentada en la figura 20.

Cepa	Constante de crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Tiempo de duplicación (horas)
<b>UW136</b>	0.1453	4.77
<b>UW <i>ihfA</i><sup>-</sup></b>	0.117	5.92
<b>UW <i>ihfB</i><sup>-</sup></b>	0.1216	5.62
<b>UW <i>ihfA</i><sup>-</sup>/<i>ihfB</i><sup>-</sup></b>	0.127	5.45

De acuerdo con los datos presentados en la figura 20 y la tabla 1, las cepas mutantes en *ihfA* y en *ihfB*, así como la doble mutante, presentan un tiempo de duplicación mayor al observado en la cepa silvestre UW136, sin embargo, dichas delecciones son viables, lo cual indica que el heterodímero IHF no es esencial para la supervivencia de *A. vinelandii*. Este resultado coincide con trabajos anteriores donde se ha reportado que, en *Dickeya dadantii*, las mutantes que carecen de IHF crecen de manera más lenta que la cepa silvestre. Cabe destacar que en *D. dadantii*, la mutación en *ihfB* presenta un severo déficit de crecimiento (Douillié et al., 1994). También resulta importante mencionar que la cinética de crecimiento entre las mutantes sencillas y la doble es muy similar, lo cual coincide con la naturaleza funcional heterodimérica de IHF (Reverchon et al., 2021).

Los valores de crecimiento medidos por concentración de proteína (mg/mL) que presentan una diferencia significativa entre la cepa silvestre y las cepas mutantes *ihf* corresponden a las muestras obtenidas a las 9 y 12 horas de crecimiento exponencial. Por otro lado, en el caso de

las muestras correspondientes a la fase exponencial temprana y a la fase estacionaria, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para la cepa silvestre y las mutantes *ihf*. Este comportamiento corresponde con datos reportados en otros modelos como *E. coli*, donde se ha demostrado que la concentración intracelular de IHF aumenta en la fase estacionaria temprana con respecto de la fase exponencial y de la fase estacionaria tardía (Azam et al., 1999). Esto significa que la mayor abundancia intracelular de IHF ocurre en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento, lo cual podría explicar la disminución observada en la tasa de crecimiento de las mutantes *ihf* con respecto de la cepa silvestre de las 9 a las 12 horas de cultivo en *A. vinelandii* (Fig. 20).

### *1.2. La mutación en ihfA y/o ihfB provoca una disminución en la producción de PHB*

Dado que la síntesis de PHB es uno de los procesos metabólicos que se encuentran regulados por RsmA en *A. vinelandii* (Hernandez-Eligio et al., 2012), se realizó la cuantificación de PHB en las cepas mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup> y UW *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> con el fin de determinar el efecto que tiene la inactivación de estos genes en la producción del polímero mencionado. Se sembraron las cepas UW*ihfA*<sup>-</sup> y UW*ihfB*<sup>-</sup> junto con la cepa silvestre UW136 en placas de medio PY sacarosa 2%, con el fin de realizar una evaluación cualitativa de la producción de PHB de las cepas mencionadas (Figs. 21 y 22). La cuantificación de PHB se realizó mediante el método espectrofotométrico descrito por Law y Slepecky (Law & Slepecky, 1961).

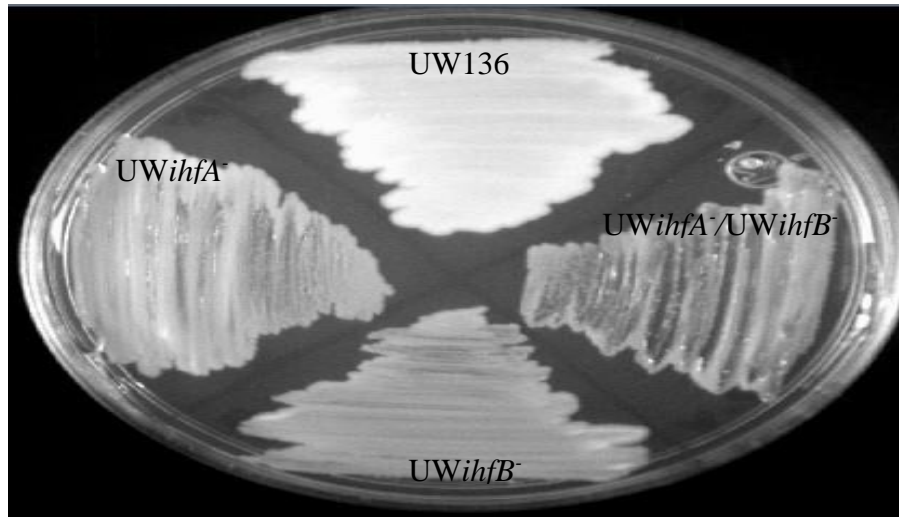


Figura 21. Cepas UW136, UWihfA<sup>-</sup>, UWihfB<sup>-</sup> y UW ihfA<sup>-</sup>/ihfB<sup>-</sup> sembradas en medio PY sacarosa 2% (60 horas). Se puede observar que tanto las cepas mutantes sencillas UWihfA<sup>-</sup> y UWihfB<sup>-</sup> como la doble mutante, producen menos PHB que la cepa silvestre UW136 debido a que las mutantes presentan un fenotipo opaco con respecto de la silvestre.

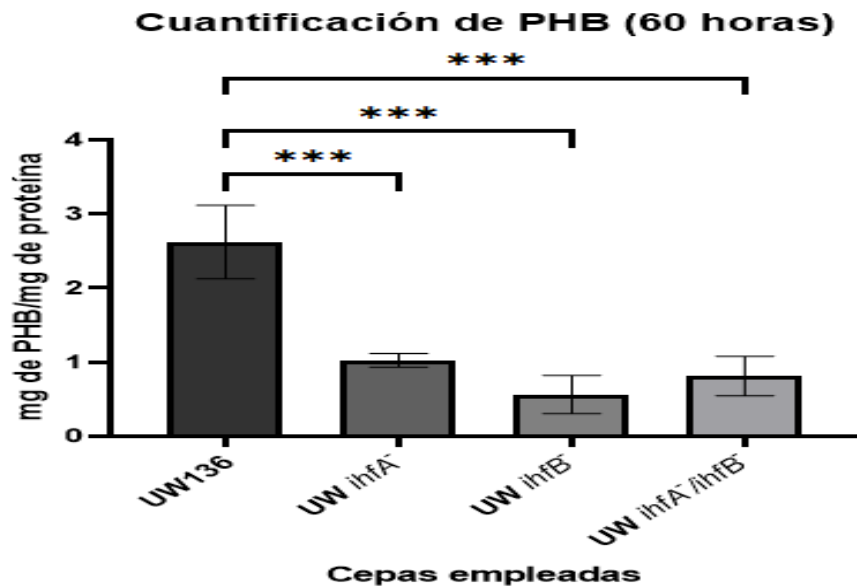


Figura 22. Cuantificación de producción de PHB de las cepas UW136, UW ihfA<sup>-</sup>, UW ihfB<sup>-</sup> y UW ihfA<sup>-</sup>/ihfB<sup>-</sup>. Las mediciones se realizaron a las 60 horas de cultivo en medio líquido PY sacarosa 2%. Los datos representan promedio  $\pm$  desviación estándar obtenidos por triplicado biológico. \*\*\*  $p < 0.05$  obtenida al realizar una prueba ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.



Tanto la evaluación cualitativa de la producción de PHB (Figura 21), como la cuantificación de la síntesis de éste (Figura 22), las cepas mutantes en *ihfA*, *ihfB* e *ihfA/ihfB* mostraron una disminución con respecto de la cepa silvestre UW136. Las cepas mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup> e *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> sembradas en medio PY sacarosa 2% muestran un fenotipo opaco comparado con la cepa control UW136 que muestra un fenotipo blanco, lo cual indica una producción de PHB menor en las mutantes comparadas con la cepa silvestre.

Por otro lado, los resultados del ensayo cuantitativo confirmaron los observados en el ensayo cualitativo, ya que se observó una disminución significativa de PHB en las mutantes carentes de la proteína IHF con respecto de la cepa silvestre. La producción promedio de PHB obtenida para la cepa silvestre a las 60 horas fue de 2.62 mg de PHB/mg de proteína, mientras que, para las mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup> e *ihfA/ihfB*<sup>-</sup>, la producción fue de 1.02, 0.56 y 0.81 mg de PHB/mg de proteína, respectivamente. La producción promedio de PHB entre las tres cepas mutantes no presentó diferencias significativas, lo que indica que la ausencia del heterodímero  $\alpha\beta$  no es compensada por la presencia de los homodímeros  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$ .

Los resultados obtenidos en los ensayos de producción de PHB indican que el factor de integración al hospedero (IHF), es un regulador positivo de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, debido a que las mutantes en *ihfA*, *ihfB* y la doble mutante *ihfA/ihfB*<sup>-</sup>, presentan una disminución en la producción del polímero con respecto de la cepa silvestre. Sin embargo, el efecto observado puede ser resultado de la alteración de una gran variedad de mecanismos dado que IHF es un regulador global de procesos como la transcripción del DNA (Monteiro et al., 2019).

De manera similar a lo reportado en este estudio, en *L. pneumophila*, se ha reportado que, mutantes en IHF son deficientes en la formación de inclusiones intracelulares de PHB durante el enquistamiento. *L. pneumophila* es capaz de formar quistes en la fase post-exponencial de crecimiento, que es la fase donde se ha reportado una mayor acumulación de IHF. Entre las características de los quistes, se encuentra la formación de inclusiones citoplásmicas de PHB, las cuales se encuentran ausentes en cepas mutantes en IHF. Este fenotipo sugiere que IHF funciona como un regulador positivo de genes involucrados en la ruta biosintética de PHB (Morash et al., 2009).

Por otro lado, se ha reportado que IHF participa en la regulación de la síntesis de alginato en *P. aeruginosa*, ya que actúa como un regulador positivo de la expresión de *algD*, lo que tiene como resultado una disminución del 50% de producción de alginato en cepas mutantes en IHF con respecto de la cepa silvestre (Delic-Attree et al., 1996).

Es importante destacar que IHF es un regulador global en bacterias (Pan et al., 2018; Spira & Yagil, 1999). Esto se debe directamente a su capacidad de moldear la estructura del DNA, por lo que se encuentra involucrado en la regulación de procesos como la transcripción de distintos genes. Se han reportado en distintas especies como en *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, y *Vibrio cholerae*, que mutantes en IHF presentan una disminución en la expresión de genes asociados a distintos fenotipos como virulencia e invasión celular (Mangan et al., 2006; Stonehouse et al., 2008). El papel regulador de distintos fenotipos de IHF parece mantenerse en *A. vinelandii*, puesto que de acuerdo con los resultados presentados en las

figuras 20, 21 y 22 de este trabajo, se observa que IHF tiene un impacto tanto en crecimiento como en producción de PHB.

### 1.3. *La transcripción de rsmA aumenta en ausencia de clpP y disminuye en ausencia de IHF*

En *L. pneumophila*, IHF es un regulador negativo de la expresión de *rsmA* en fase estacionaria y, en fase exponencial ClpP tiene como blanco a IHF. Para determinar si este mecanismo de regulación se conserva en *A. vinelandii*, se realizó la cuantificación de la transcripción de *rsmA* en las cepas mutantes UW*ihfA*<sup>-</sup>, UW*ihfB*<sup>-</sup>, UW*ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> y UW*clpP*<sup>-</sup>. Si hay conservación en el mecanismo de regulación, se esperaría que la transcripción de *rsmA* aumente en fase estacionaria en ausencia de alguno de los monómeros de IHF con respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, se esperaría que, en ausencia de *clpP*, la expresión de *rsmA* disminuya en fase exponencial dado que la proteasa no estaría degradando a IHF (Ge et al., 2019).

Para cuantificar la transcripción de *rsmA*, se empleó una fusión transcripcional que contiene la región promotora de *rsmA* fusionada a la secuencia codificante del gen reportero *gusA* ( $\beta$ -glucuronidasa) (Bedoya-Pérez et al., 2018). La cepa que contiene la fusión transcripcional de *rsmA* fue transformada con DNA cromosomal de *A. vinelandii* de las mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup>, UW *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> y UW *clpP*<sup>-</sup>, las cuales se seleccionaron con su respectivo casete de resistencia en medio de selección. Con el fin de observar la dinámica de la expresión de *rsmA* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, se procedió a realizar el ensayo

cuantitativo de  $\beta$ -glucuronidasa de muestras obtenidas a las 12, 36 y 72 horas tomadas a partir de cultivos de las cepas mutantes crecidas en PY sacarosa 2% a 30 °C (Fig. 23).

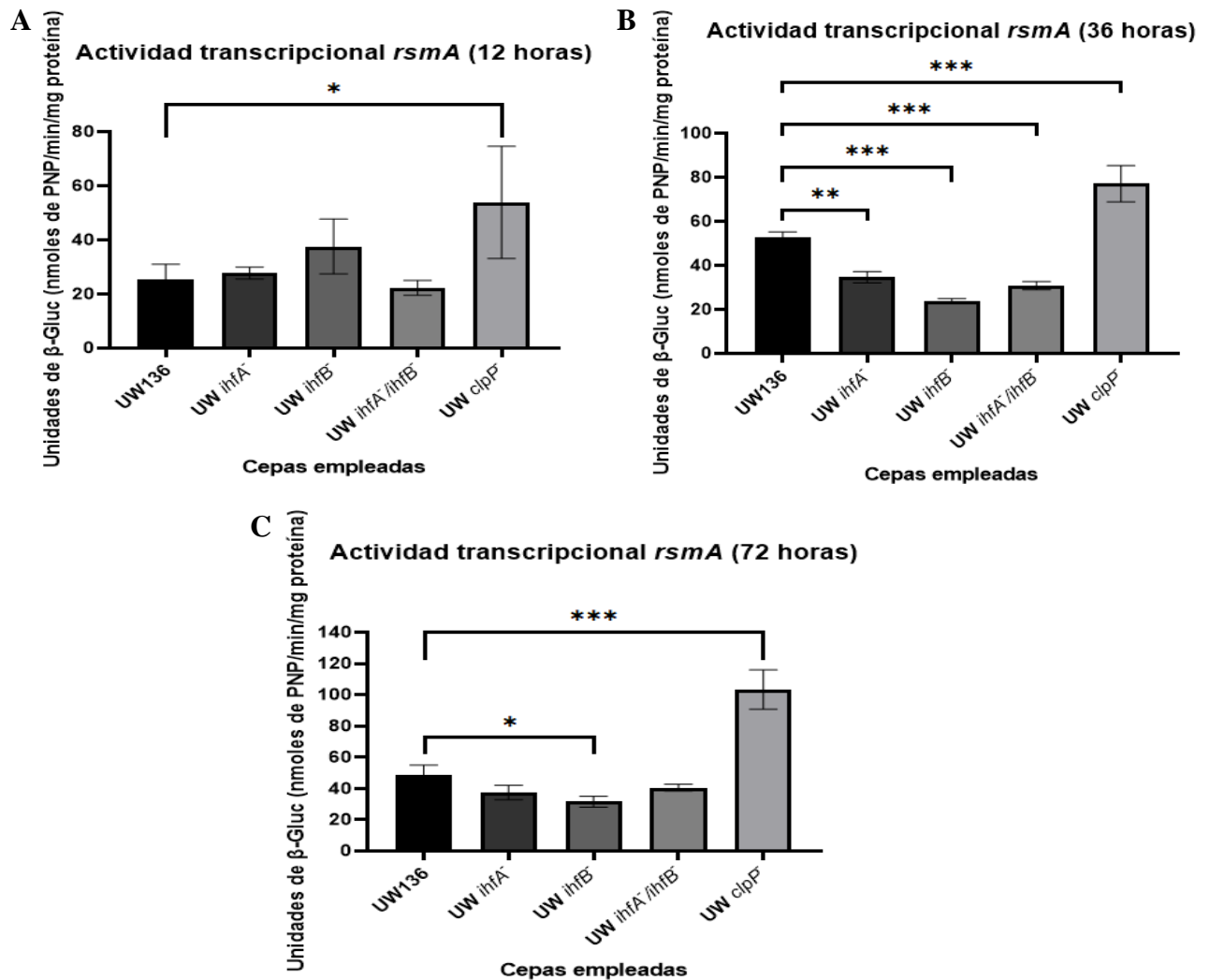


Figura 23. Cuantificación de la actividad transcripcional de *rsmA* de las cepas mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW *ihfB*<sup>-</sup>, UW *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> y UW *clpP*<sup>-</sup> junto con la cepa silvestre UW136 a las 12 (panel A), 36 (panel B) y 72 (panel C) horas de incubación a 30 °C en medio PY sacarosa 2%. Los datos representan promedio  $\pm$  desviación estándar obtenidos por triplicado biológico. \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.05$  obtenida al realizar una prueba ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

De acuerdo con los resultados presentados en la figura 23, el patrón de expresión de *rsmA* en ausencia de IHF no corresponde con el modelo propuesto por Ge et al., 2019 en *L. pneumophila*. Es decir, IHF no regula de manera negativa la transcripción de *rsmA*. Por el

contrario, en los resultados obtenidos en este ensayo, se observa una ligera disminución en la transcripción de *rsmA* a las 36 y 72 horas en las mutantes en *ihfA*, *ihfB* e *ihfA/ihfB* con respecto de la cepa silvestre. Por otro lado, siguiendo el mismo modelo, en la mutante en *clpP* se esperaría una disminución en la transcripción de *rsmA* en fase exponencial con respecto a la cepa silvestre debido a que la proteasa no estaría degradando a IHF y éste se encontraría reprimiendo la transcripción de *rsmA*. En contraste, la inactivación de *clpP* tiene un efecto positivo sobre la transcripción de *rsmA*, lo cual se observa en los tres tiempos de cultivo evaluados, donde se obtuvieron valores más altos de unidades de  $\beta$ -glucuronidasa en la cepa mutante UW *clpP* con respecto de los obtenidos para la cepa silvestre UW136 a las 12, 36 y 72 horas de crecimiento.

En *A. vinelandii* se ha reportado que *rsmA* posee un promotor dependiente de RpoS (Quiroz-Rocha et al., 2017b) y que ClpP es un regulador negativo de RpoS ya que este factor sigma es degradado durante la fase exponencial por el complejo chaperona-proteasa ClpXP<sup>-</sup> (Muriel-Millán et al., 2017a). Esto explicaría el aumento en la expresión de *rsmA* en la mutante UW *clpP*. Es importante destacar que se ha reportado que el factor sigma de fase estacionaria RpoS es también un regulador positivo de la expresión de *rsmA* en *Pectobacterium carotovorum* (Mukherjee et al., 1998).

#### 1.4. La transcripción de *rsmZ1* y *rsmZ2* disminuye en ausencia del heterodímero IHF $\alpha\beta$

Los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2* pertenecen al sistema de regulación Rsm y participan en la regulación de la expresión génica al titular a RsmA debido a que poseen alta afinidad por

esta proteína (Manzo et al., 2012a; Trejo et al., 2017b). Dado que se ha reportado en distintos modelos que IHF regula de manera positiva a varios RNAs pequeños, incluyendo a *rsmZ* en *Pseudomonas protegens* (Ferreiro & Gallegos, 2021; Lee & Zhao, 2016), se realizó la cuantificación de la actividad transcripcional de *rsmZ1* y *rsmZ2* a las 36 horas en las cepas mutantes UW *ihfA*<sup>-</sup>, UW*ihfB*<sup>-</sup> y UW*ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>, con el fin de determinar si en *A. vinelandii* estos RNAs pequeños son regulados por IHF (Figura 24).

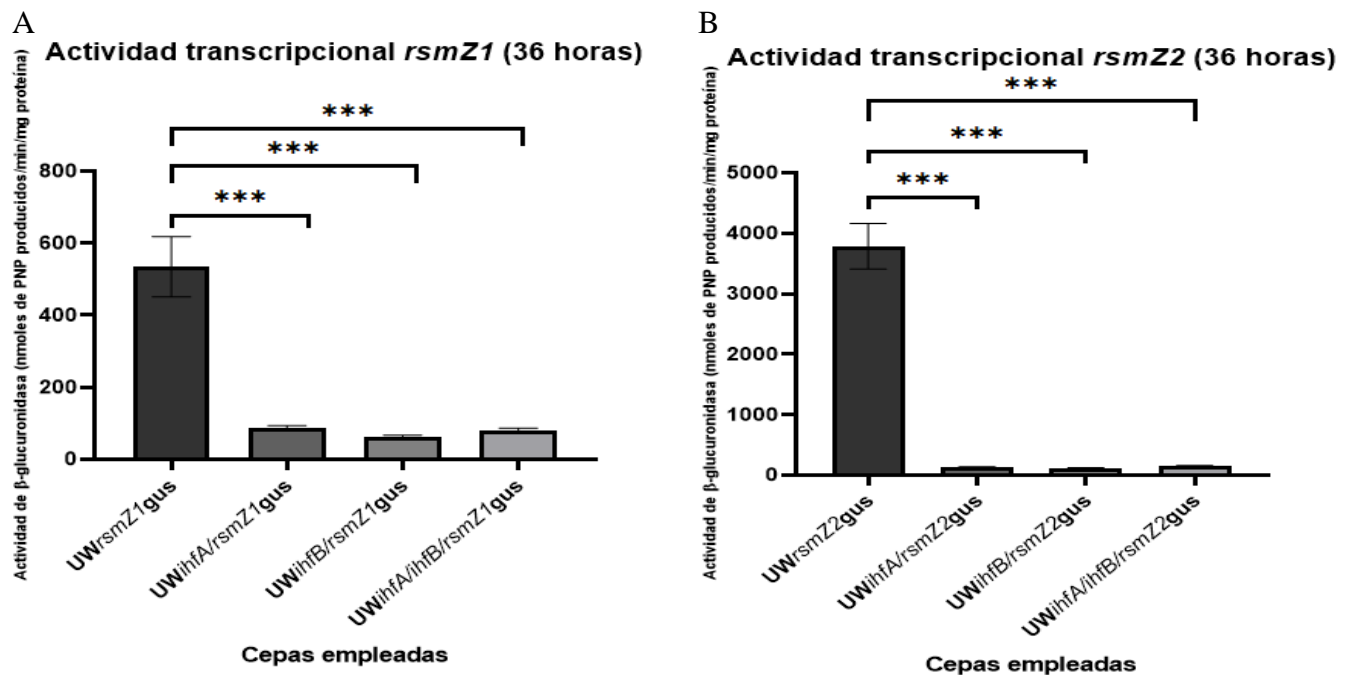


Figura 24. Cuantificación de la actividad de *rsmZ1* (panel A) y *rsmZ2* (panel B) en la cepa silvestre y en las mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup> e *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>. La muestra fue obtenida a las 36 horas de cultivo a 30 °C en medio PY sacarosa 2%. Los datos representan promedio ± desviación estándar obtenidos por triplicado biológico. \*\*\*  $p < 0.05$  obtenida al realizar una prueba ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

De acuerdo con los resultados presentados en la figura 24, las mutaciones en *ihfA* e *ihfB* en *A. vinelandii*, provocaron una disminución significativa en la transcripción de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2*. La actividad promedio de β-glucuronidasa de *rsmZ1* en la cepa silvestre fue de 534.3 nmoles de PNP producidos/min/mg de proteína, mientras que para las

mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup> e *ihfA/ihfB*<sup>-</sup> fue de 86.14, 63.69 y 81.67 nmoles de PNP producidos/min/mg de proteína, respectivamente. Por otro lado, para *rsmZ2*, la actividad en la cepa silvestre presentó un valor de 3783.41 nmoles de PNP producidos/min/mg de proteína, mientras las mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup> e *ihfA/ihfB*<sup>-</sup> presentaron valores de 131.39, 115.88 y 155.28 nmoles de PNP producidos/min/mg de proteína, respectivamente. La actividad transcripcional de *rsmZ1* y *rsmZ2* a las 36 horas entre las tres cepas mutantes no presentó diferencias significativas. Los niveles de actividad más altos en *rsmZ2* que en *rsmZ1* observados en la figura 24 coincide con lo descrito en trabajos previos. Esta diferencia, probablemente se debe a que existen diferencias entre las regiones reguladoras de estos dos RNAs pequeños, donde la principal diferencia radica en que el grado de conservación de la secuencia activadora (UAS, por sus siglas en inglés) o caja de unión a GacA es mayor en el caso de *rsmZ2* que en *rsmZ1* (Hernandez-Eligio et al., 2012; López-Pliego et al., 2018; Manzo et al., 2012a).

Resulta interesante destacar que el efecto de la ausencia de IHF sobre la transcripción de los RNAs pequeños es mayor para *rsmZ2* que para *rsmZ1*, lo cual podría deberse a que la caja de unión a GacA en *rsmZ2* se encuentra más alejada del sitio de inicio de la transcripción que en *rsmZ1*, por lo que el plegamiento de DNA provocado por IHF sería más importante para la expresión de *rsmZ2* que para *rsmZ1*.

Este resultado coincide con datos reportados previamente en otros modelos como *Salmonella enterica*, donde la expresión de *csrB* se encuentra drásticamente reducida en mutantes en el homólogo de *ihfA*, *himA*, por lo que IHF actúa como un regulador positivo de la transcripción de *csrB* pero no de *csrC* (Martínez et al., 2014). Cabe destacar que *csrB* y *csrC* son homólogos

de *rsmZ1* y *rsmZ2* (Muriel-Millán et al., 2017b). En *Erwinia amylovora*, IHF actúa como un regulador positivo de la expresión de *rsmB*, ya que mutantes de *ihfA* e *ihfB* presentan una reducción significativa en la transcripción de *rsmB* (Lee & Zhao, 2016). Con base en estos antecedentes, al igual que los estudios mencionados de las especies de *Salmonella* y *Erwinia*, IHF actúa como un regulador positivo de la expresión de los pequeños RNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* en *A. vinelandii*.

Anteriormente se había realizado un análisis *in silico* de la región promotora de los RNAs pequeños *rsmZ1-7* en *A. vinelandii*. En dicho estudio se detectó un sitio putativo de unión de IHF en la región promotora de *rsmZ1* y un sitio de H-NS en el promotor de *rsmZ2* (López-Pliego, 2018). Los resultados presentados en la figura 20 coinciden con la presencia de sitios de unión a IHF en los RNAs pequeños, lo que sugiere una interacción directa entre IHF y los promotores de *rsmZ1* y *rsmZ2* que es necesaria para la expresión de estos RNAs pequeños. Es importante destacar que en *Pseudomonas fluorescens* se ha reportado que IHF se une directamente y con alta afinidad al promotor de *rsmZ*, lo cual sugiere que la modificación estructural del DNA provocada por IHF es necesaria para la expresión de *rsmZ*, debido a que la caja de unión a GacA se encuentra localizada 180 pares de bases río arriba del elemento -10 del promotor del gen para este RNA pequeño (Humair et al., 2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se sugiere un mecanismo de regulación indirecto de IHF sobre RsmA. Si IHF promueve la expresión de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2*, entonces, la presencia de IHF inhibe, de forma indirecta, la actividad de RsmA puesto que IHF se encontraría favoreciendo la interacción entre RsmA y los RNAs pequeños. Al



promover la titulación de RsmA por *rsmZ1* y *rsmZ2*, IHF funciona como un regulador positivo a nivel post-transcripcional de genes involucrados en la ruta biosintética de PHB de manera indirecta. Este modelo de regulación de IHF sobre los RNAs pequeños coincide con los resultados de producción de PHB presentados en las figuras 17 y 18, puesto que, en las cepas mutantes en IHF, se observó una disminución en la síntesis de PHB con respecto de la cepa silvestre. Dado que IHF es necesario para la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*, entonces, en las mutantes *ihfA*<sup>-</sup>, *ihfB*<sup>-</sup> e *ihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup>, la acumulación de RsmA libre, provocaría la disminución observada en la producción de PHB.

### 1.5. IHF controla la expresión de *phbR* en *A. vinelandii*

El regulador transcripcional PhbR funciona como un activador transcripcional de *phbB*, el primer gen del operón *phbBAC*, al unirse de manera directa a su región promotora (Hernandez-Eligio et al., 2011), por lo que actúa como un regulador positivo de la síntesis de PHB. Por otro lado, la proteína RsmA tiene un papel negativo en la regulación de la síntesis de PHB, al inhibir la traducción y reducir la estabilidad de los transcritos de *phbR* y *phbB* (Hernandez-Eligio et al., 2012).

Dado que en este trabajo se demostró que IHF controla de manera positiva la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* debido a que la transcripción de ambos RNAs pequeños se encuentra disminuida en las mutantes en *ihfA* e *ihfB* (Fig. 20), entonces, IHF actuaría como un regulador negativo indirecto de la actividad de RsmA. Con el fin de demostrar esta relación entre IHF y RsmA, se procedió a realizar la cuantificación de la traducción de *phbR*. En caso de que IHF

promueva la actividad de los RNAs pequeños, la traducción de *phbR* en las mutantes *ihfA*<sup>-</sup> e *ihfB*<sup>-</sup>, se encontraría disminuida con respecto de la cepa silvestre.

Adicionalmente, se realizó un análisis informático de la región promotora de *phbR* empleando el *software* Virtual Footprint con la finalidad de encontrar sitios de unión a IHF (Tabla 2 y Fig. 25). Con esta herramienta se encontraron dos posibles sitios de unión de IHF en la región promotora de *phbR*, lo que indica que IHF podría estar regulando su expresión de manera directa.

Tabla 2. Sitios probables de unión a IHF encontrados con el programa Virtual Footprint. Se muestra la secuencia de cada uno de los sitios de unión, así como su posición y la hebra de DNA en la que se encuentran. Para el análisis se empleó la proteína IHF de *P. aeruginosa*.

Posición en la secuencia del promotor de <i>phbR</i> (Hebra +/-)	Secuencia de unión
437 (-)	CAATGCAT
159 (+)	CAAGGTTT

*phbR*

```
CATAGATTCCCTTCCTTTTTTGTCGGAGACCCTGGCTGCCACGACTGCTGAATGGCGTGTAGCTGCGCAGCGTCGTTTTGT
GTCGTGACTCGCGAGGCTCATTCTCGATTGGGTACACGCTTTAAGGATAGTGCCCGTTGGTGACATCGTACTGGCGATTGGTG
ACACCCTTTGCAAGGTTTTCCAGTGGCTTTTTGCTATCGGGCTGATATGGCGGTGATGGGGCGTAGCTGTAGCTATTGCCGC
  Sitio de unión a IHF 2
AGATGTGTGGAAGGGGACATCCACTTGGCGCGACTTCTGAAGGGCAGAGCCGAATTGATGATGGATGGAGAATGCCGAG
AGCGATGAATGGTCGTCTGGCGCCAGAATCCTGTGTTTTGATATCGACTTTCTGGCATGTGATGTACGGCGCATGGGCCCG
GTCGCTTGGCGAGGCGGGATTTGCCGTAGGAGCTAGAATGCTCGATGCATTGTTTTCCACATGCGTTTTGTTTTCTTGGCC
  -35                -10      Sitio de unión a IHF 1
CATGGAAGAGAGCGCGAAAAGGAATATGTTTACAGTCACTGTGAATTATGCACGGCTCGTCGAGGAGACG
```

Figura 25. Representación de los 500 pb empleados para el análisis informático de la región promotora de *phbR*. Se encuentra sombreado en negro y con letras blancas un fragmento de la secuencia codificante de *phbR*. Se señalan ambos sitios de unión a IHF encontrados con el programa VirtualFootprint y los sitios -10 y -35 del promotor de *phbR*.

Para realizar el ensayo de cuantificación de actividad traduccional de *phbR*, es necesario hacer la cuantificación de la actividad transcripcional. Por lo que, en primera instancia, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad transcripcional de *phbR* en la cepa silvestre UW136 y en las mutantes UW*ihfA*<sup>-</sup> y UW*ihfB*<sup>-</sup>. Las muestras fueron tomadas a las 36 horas de incubación (Fig. 26).

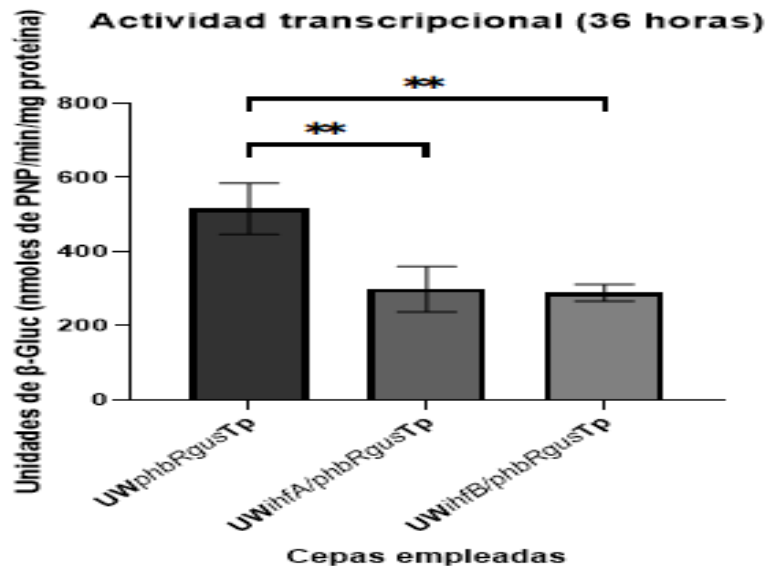


Figura 26. Cuantificación de la transcripción de *phbR* en la cepa silvestre UW136 como control y en las mutantes UW*ihfA*<sup>-</sup> y UW*ihfB*<sup>-</sup>, a las 36 horas de crecimiento. La incubación fue realizada a 30 °C en medio PY sacarosa 2%. Los datos representan promedio ± desviación estándar obtenidos por triplicado biológico. \*\*  $p < 0.05$  obtenida al realizar una prueba ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

Como se ha reportado anteriormente (Hernandez-Eligio et al., 2011), la transcripción de *phbR* en la cepa silvestre es significativamente mayor en la fase estacionaria comparada con la transcripción en la fase exponencial. De acuerdo con los datos obtenidos en la figura 26, el factor de integración al hospedero (IHF) funciona como un regulador de la expresión de *phbR*.

En la cuantificación realizada se observó una disminución en la transcripción de *phbR* en las cepas mutantes con respecto de la cepa silvestre. En este caso, se obtuvo un valor promedio de 515.56 nmoles de PNP producidos/min/mg de proteína para la cepa silvestre, mientras que para la mutante en *ihfA* se obtuvo un valor promedio de 298.59 y para la mutante *ihfB* de 288.75 nmoles de PNP producidos/min/mg de proteína. Estos datos demuestran que, en fase estacionaria, IHF actúa como un regulador positivo de la transcripción de *phbR*. Este resultado concuerda con la presencia de sitios de unión a IHF encontrados en la región promotora de *phbR* con el programa Virtual Footprint (Tabla 1 y Fig. 25), ya que se sugiere que IHF podría unirse directamente en la región del promotor de *phbR* y regular su transcripción.

Posteriormente, se realizó el ensayo de cuantificación de actividad traduccional de *phbR* en la cepa silvestre UW136 y en las mutantes UW*ihfA*<sup>-</sup> y UW*ihfB*<sup>-</sup>. Las muestras fueron tomadas a las 36 horas de incubación (Fig. 27).

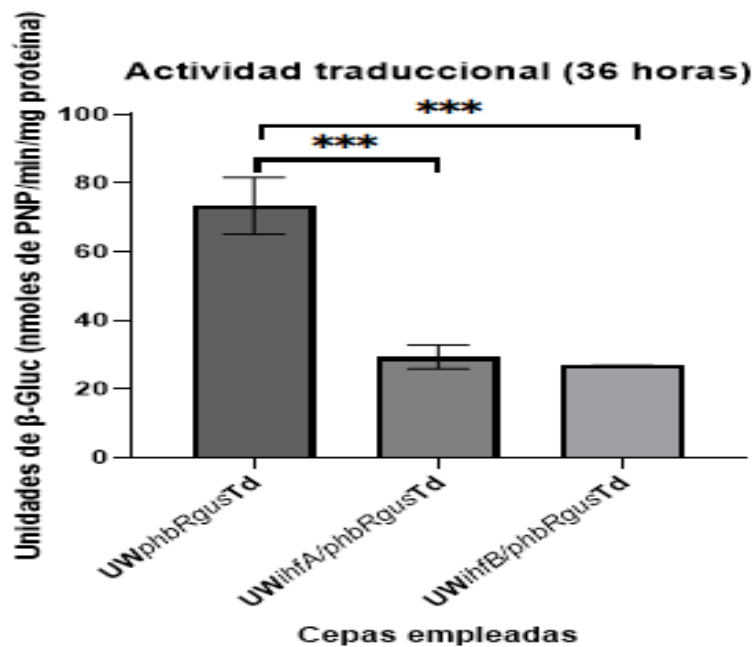


Figura 27. Cuantificación de la traducción de *phbR* en la cepa silvestre UW136 como control y en las mutantes UWihfA<sup>-</sup> y UWihfB<sup>-</sup>, a las 8 horas (panel A) y a las 36 horas (panel B). La incubación fue realizada a 30 °C en medio PY sacarosa 2%. Los datos representan promedio  $\pm$  desviación estándar obtenidos por triplicado biológico. \*\*\* $p < 0.05$  obtenida al realizar una prueba ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

Los resultados presentados en la figura 27 indican que en *A. vinelandii*, IHF actúa como un regulador positivo de la traducción de *phbR*, ya que se obtuvieron valores de 29.27 y 26.79 nmoles de PNP/min/mg de proteína en las cepas mutantes UWihfA<sup>-</sup> y UWihfB<sup>-</sup>, respectivamente, mientras que, para la cepa silvestre se obtuvo un valor de 73.37 nmoles de PNP/min/mg de proteína para la actividad traduccional de *phbR* a las 36 horas de cultivo. Este resultado corresponde con la disminución en la actividad transcripcional de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2* en las mutantes UWihfA<sup>-</sup> y UWihfB<sup>-</sup> (Fig. 22). Cabe destacar que la disminución en la traducción de *phbR* a las 36 horas en las mutantes en IHF comparadas con la cepa silvestre es ocasionada en parte por la reducción en la transcripción reportada en la figura 26. Sin embargo, la disminución en la traducción es mayor que la observada para la transcripción de *phbR*, donde la actividad en las cepas mutantes fue del 58% de la actividad observada en la cepa silvestre. En el caso de la traducción, la actividad en las cepas mutantes

fue del 40% de la actividad observada en la cepa silvestre. En conjunto, estos datos indican que, en *A. vinelandii*, el factor de integración al hospedero (IHF) es un regulador positivo de la transcripción de los RNAs pequeños *rsmZ1* y *rsmZ2* del sistema Rsm. Por lo tanto, IHF actúa también como regulador positivo de la traducción de transcritos que se encuentran bajo el control negativo de RsmA. Esto provoca que, en ausencia del heterodímero IHF, disminuya la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*, lo que a su vez tiene como resultado que aumente la concentración de RsmA libre, lo que disminuye la traducción de genes como *phbR*.

### 1.6. *IHF regula la síntesis de alquilresorcinoles (ARs) en A. vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria capaz de producir distintos polímeros de importancia industrial. Los alquilresorcinoles (ARs) son lípidos fenólicos que reemplazan la membrana de fosfolípidos durante el proceso de diferenciación celular. La síntesis de ARs depende de enzimas codificadas en el genoma de *A. vinelandii* en un operón denominado *arsABCD* (Funa et al., 2006; Segura et al., 2009). La expresión del operón *arsABCD* ocurre principalmente en condiciones de enquistamiento y depende del regulador transcripcional ArpR (Romero et al., 2013).

El sistema Gac/Rsm controla la síntesis de ARs en *A. vinelandii*, ya que se ha reportado que mutantes en el regulador de respuesta *gacA* presentan una disminución en la síntesis de ARs. Este efecto se debe a que RsmA tiene como blanco el transcrito de *arpR*, inhibiendo su traducción, por lo que los RNAs pequeños del sistema Rsm actúan como reguladores positivos de la síntesis de ARs al titular y antagonizar la función de RsmA (Romero et al., 2016).

Dado que en este trabajo se observó que las cepas mutantes en IHF presentan una disminución en la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*, se procedió a evaluar de manera cualitativa el fenotipo de producción de ARs con el método colorimétrico con sales de Azul Rápido B descrito en la sección de Materiales y métodos, con el fin de reforzar la idea de que IHF regula el sistema Rsm a través de *rsmZ1* y *rsmZ2* (Fig. 28).



Figura 28. Evaluación cualitativa de producción de ARs en la cepa silvestre UW136 y en las mutantes *UWihfA*<sup>-</sup>, *UWihfB*<sup>-</sup> y la doble mutante *UWihfA*<sup>-</sup>/*ihfB*<sup>-</sup> con el método colorimétrico con sales de Azul Rápido B. Las cepas fueron cultivadas en medio Burk-Butanol durante 120 horas a 30 °C.

En la evaluación cualitativa de producción de ARs presentada en la figura 28 se observa una drástica diferencia en la tinción que presenta la cepa silvestre UW136 con respecto de las cepas mutantes en IHF. En el caso de la cepa silvestre se observa una coloración roja intensa en toda el área que corresponde a dicha cepa, mientras que las cepas mutantes en IHF se mantuvieron sin adquirir la coloración rojiza observada en la cepa control. Este resultado coincide con la disminución en la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* en las mutantes en IHF, puesto que una disminución en la transcripción de dichos RNAs pequeños tiene como consecuencia un aumento en la concentración de RsmA libre, lo que a su vez provoca una disminución en la traducción de *arpR* (Romero et al., 2016).

Los resultados presentados en este trabajo permiten formular un modelo en el que, en *A. vinelandii*, el factor de integración al hospedero (IHF) es un regulador positivo de la expresión de los RNAs pequeños del sistema Rsm, *rsmZ1* y *rsmZ2*. Por lo tanto, al inactivar a cualquiera de los dos genes que codifican para los monómeros de IHF, *ihfA* o *ihfB*, se observa una disminución en la producción de polímeros como PHB y ARs que dependen para su síntesis de la actividad de *rsmZ1* y *rsmZ2* sobre RsmA (Fig. 29).

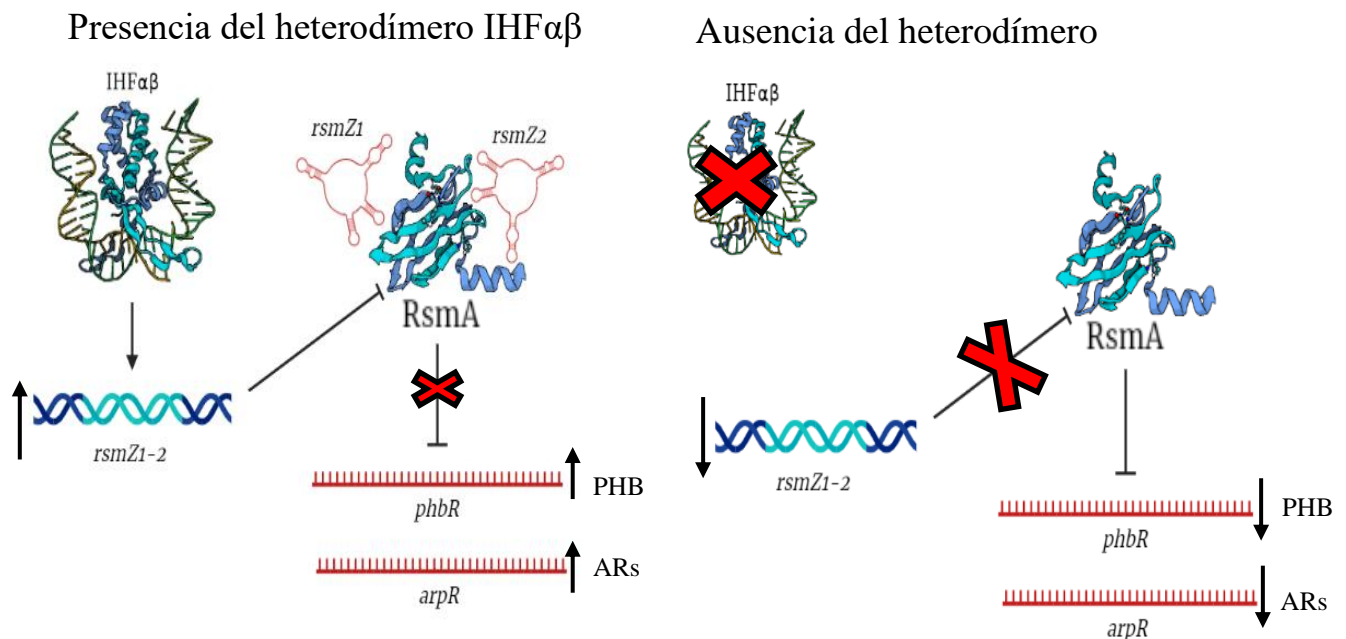


Figura 29. Representación esquemática de la regulación que ejerce el heterodímero IHF sobre los RNAs pequeños del sistema Rsm y su papel en el control de la síntesis de polímeros como PHB y ARs.

El modelo presentado en la figura 29 coincide con datos reportados en otros modelos como *P. fluorescens*, donde IHF presenta una alta afinidad por el promotor de *rsmZ*. Dado que el sitio de unión de GacA necesario para la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* se encuentra río arriba de los elementos -35 y -10 de su región promotora, es posible que el doblamiento del DNA provocado por IHF sea necesario para establecer interacciones entre GacA y el complejo de



la transcripción que son cruciales para la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* (Humair et al., 2010; Manzo et al., 2012a).

## 8. Conclusiones

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización de las mutaciones en los genes *ihfA* e *ihfB* que codifican para los monómeros que conforman al factor de integración al hospedero (IHF) en *A. vinelandii*, así como su papel en la regulación del sistema Rsm.

La presencia de un homodímero IHF $\alpha\alpha$  o IHF $\beta\beta$ , no es suficiente para compensar la ausencia del heterodímero  $\alpha\beta$ . Las mutaciones en cualquiera de los monómeros provocan un efecto negativo en distintos fenotipos de *A. vinelandii*, principalmente de las 8 a las 24 horas de crecimiento, es decir en la transición de fase exponencial a fase estacionaria.

La síntesis de PHB se encuentra disminuida en las mutantes IHF con respecto de la cepa silvestre a las 60 horas de crecimiento, por lo que se determinó que IHF actúa como un regulador positivo de la síntesis de PHB. Asimismo, la transcripción de los pequeños RNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* se encuentra disminuida a las 36 horas en las mutantes en IHF, por lo que se concluye que IHF actúa como un regulador positivo de la expresión de estos pequeños RNAs. Adicionalmente, se encontró que, a las 36 horas, tanto la transcripción como la traducción de *phbR* también se encuentran disminuidas en las mutantes en IHF.

La producción de alquilresorcinoles, que es otro fenotipo regulado por la vía Gac/Rsm en *A. vinelandii*, también se encuentra disminuida en mutantes en IHF.

En este trabajo se observó que la mutación en *clpP* tiene como resultado un aumento en la expresión de *rsmA* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria.

## 9. Anexos

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
<b>ihfAFwRc</b>	CACTCTTAACGATGATGAG
<b>ihfARvRc</b>	ATCTGAGGGAATTCCTGTT
<b>ihfBFwRc</b>	TTCTTTCCGCGTGCCC
<b>ihfBRvRc</b>	CGCTCTATCCGGACAACC
<b>FwphbRXbaI</b>	TCTAGAGGGCACGAGCCGAATTGATGA
<b>RvphbRgusA</b>	GGGGTTTCTACAGGACGTAAAAGCGTCTCCTCGACGAGCC
<b>FwgusAphbR</b>	GGCTCGTCGAGGAGACGCTTTTACGTCCTGTAGAAACCCC
<b>RvgusAPpuMI</b>	AGGACCTCTACCCGCGCATCC

Tabla 3. Cepas empleadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
<i>A. vinelandii</i>		
<b>UW136</b>	Mutación natural en <i>algU</i> , Nal <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	(Bishop and Brill, 1977; Martínez-Salazar <i>et al.</i> , 1996)
<b>SAWZ1</b>	UW136 con fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	(Hernández-Eligio <i>et al.</i> , 2012)
<b>SAWZ2</b>	UW136 con fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	(Hernández-Eligio <i>et al.</i> , 2012)
<b>LMW35</b>	UW136 con una mutación <i>clpP::Km</i>	(Muriel-Millán <i>et al.</i> , 2017)
<b>UWrsmA-T</b>	UW136 con una fusión transcripcional <i>rsmA-gusA</i>	(Bedoya-Pérez <i>et al.</i> , 2018)
<b>AHW5</b>	UW136 con una fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i>	(Hernández-Eligio <i>et al.</i> ; 2011)
<b>UWihfA<sup>-</sup></b>	UW136 con una mutación <i>ihfA::Gm</i>	Este trabajo
<b>UWihfB<sup>-</sup></b>	UW136 con una mutación <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/UW ihfB<sup>-</sup></b>	UW con mutaciones <i>ihfA::Gm</i> e <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/rsmZ1gusATp</b>	SAWZ1 con una mutación <i>ihfA::Gm</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/rsmZ2gusATp</b>	SAWZ2 con una mutación <i>ihfA::Gm</i>	Este trabajo
<b>UWihfB<sup>-</sup>/rsmZ1gusATp</b>	SAWZ1 con una mutación <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfB<sup>-</sup>/rsmZ2gusATp</b>	SAWZ2 con una mutación <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo

<b>UWihfA<sup>-</sup>/ihfB<sup>-</sup> /rsmZ1gusATp</b>	SAWZ1 con mutaciones <i>ihfA::Gm</i> e <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/ihfB<sup>-</sup> /rsmZ2gusATp</b>	SAWZ2 con mutaciones <i>ihfA::Gm</i> e <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/rsmAgusATp</b>	UWrsmA-T con una mutación <i>ihfA::Gm</i>	Este trabajo
<b>UWihfB<sup>-</sup>/rsmAgusATp</b>	UWrsmA-T con una mutación <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/ihfB<sup>-</sup> /rsmAgusATp</b>	UWrsmA-T con mutaciones <i>ihfA::Gm</i> e <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWihfA<sup>-</sup>/phbRgusATp</b>	AHW5 con una mutación <i>ihfA::Gm</i>	Este trabajo
<b>UWihfB<sup>-</sup>/phbRgusATp</b>	AHW5 con una mutación <i>ihfB::Km</i>	Este trabajo
<b>UWphbRgusATd</b>	UW136 con una fusión traduccional <i>phbR::gusA</i>	Este trabajo
<b><i>E. coli</i></b>		
<b>Top10</b>	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-$ <i>mcrBC)</i> $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galE15 galK16</i>	Invitrogen

Tabla 4. Plásmidos empleados en este estudio

Nombre	Descripción	Referencia
<b>pJET1.2-Blunt</b>	Vector de clonación	Thermo Scientific
<b>pUMAgusA</b>	Vector empleado para la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales. Posee la secuencia de <i>mela</i> como sitio de recombinación y la secuencia codificante de <i>gusA</i> , Tc <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>	(Muriel-Millán <i>et al</i> , 2015)

## 10. Referencias

- Azam, T. A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., & Ishihama, A. (1999). Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the Escherichia coli Nucleoid. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6361. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6361-6370.1999>
- Battesti, A., & Gottesman, S. (2013). Roles of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 140–147). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.002>
- Becking, J.-H. (1981). The Family Azotobacteraceae. In *The Prokaryotes* (pp. 795–817). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9\\_66](https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_66)
- Bedoya-Pérez, L. P., Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Quiroz-Rocha, E., Rivera-Gómez, N., & Espín, G. (2018). The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of RsmA/CsrA expression in Azotobacter vinelandii and Escherichia coli. *Microbiological Research*, 214(May), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.013>
- Byrne, B., & Swanson, M. S. (1998). Expression of Legionella pneumophila Virulence Traits in Response to Growth Conditions. *Infection and Immunity*, 66(7), 3029. <https://doi.org/10.1128/iai.66.7.3029-3034.1998>
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-β-hydroxybutyrate production in Azotobacter vinelandii. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2624–2628. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2624-2628.2000>
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate

- production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s002530051357>
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., & Espín, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 3), 479–487. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0>
- Delic-Attree, I., Toussaint, B., Froger, A., Willison, J. C., & Vignais, P. M. (1996). Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression. *Microbiology*, 142(10), 2785–2793. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2785/CITE/REFWORKS>
- Dillon, S. C., & Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:3, 8(3), 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
- Dorman, C. J. (2014). Function of nucleoid-associated proteins in chromosome structuring and transcriptional regulation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 24(5–6), 316–331. <https://doi.org/10.1159/000368850>
- Douillié, A., Toussaint, A., & Faelen, M. (1994). Identification of the integration host factor genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Biochimie*, 76(10–11), 1055–1062. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90030-2)
- Efuet, E. T., Pulakat, L., & Gavini, N. (1996). Investigations on the cell volumes of *Azotobacter vinelandii* by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, 36(4), 229–234. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620360404>
- Espín, G. (2001). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Biología de *Azotobacter Vinelandii*. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
- Ferreiro, M. D., & Gallegos, M. T. (2021). Distinctive features of the Gac-Rsm pathway in plant-associated *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 23(10), 5670–5689. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15558>
- Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 506. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A., & Tsui, P. (1992). The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 6(18), 2557–2563. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1992.TB01432.X>
- 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 United States of America*, 103(16), 6356–6361. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0511227103/SUPPL\\_FILE/11227FIG7.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0511227103/SUPPL_FILE/11227FIG7.PDF)
- Ge, Z. H., Long, Q. S., Yuan, P. B., Pan, X., Shen, D., & Lu, Y. J. (2019). The Temporal Expression of Global Regulator Protein CsrA Is Dually Regulated by ClpP During the

- Biphasic Life Cycle of *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02495>
- Goodman, S. D., Velten, N. J., Gao, Q., Robinson, S., & Segall, A. M. (1999). In Vitro Selection of Integration Host Factor Binding Sites. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3246. <https://doi.org/10.1128/jb.181.10.3246-3255.1999>
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Heeb, S., & Haas, D. (2001). *Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria* (Vol. 14, Issue 12).
- Hernandez-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiology*, 157(11), 3014–3023. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051649-0>
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(8), 1953–1963. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0>
- Hitchins, V. M., & Sadoff, H. L. (1973). Sequential Metabolic Events During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 113, Issue 3).
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00070-9)
- Humair, B., Wackwitz, B., & Haas, D. (2010). GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1497–1506. <https://doi.org/10.1128/AEM.02014-09>
- Krogh, T. J., Møller-Jensen, J., & Kaleta, C. (2018). Impact of chromosomal architecture on the function and evolution of bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02019/BIBTEX>
- LAW, J. H., & SLEPECKY, R. A. (1961). ASSAY OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRIC ACID. *Journal of Bacteriology*, 82(1), 33. <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961>
- Lee, J. H., & Zhao, Y. (2016). Integration host factor is required for RpoN-dependent hrpL gene expression and controls motility by positively regulating rsmB sRNA in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 106(1), 29–36. [https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0170-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-07-15-0170-R\\_F7.JPEG](https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0170-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-07-15-0170-R_F7.JPEG)
- Lemos, J. A. C., & Burne, R. A. (2002). Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 184(22), 6357–6366. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6357-6366.2002>
- López-Pliego, L. (2018). *Estudio del sistema Rsm en Azotobacter vinelandii*. Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla.

- López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., Núñez, C., & Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*, 60(9), 670–680. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Luijsterburg, M. S., Noom, M. C., Wuite, G. J. L., & Dame, R. T. (2006). The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: A molecular perspective. *Journal of Structural Biology*, 156(2), 262–272. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2006.05.006>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), gkac240–gkac240. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC240>
- Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2001). *Brock Biology of Mikroorganisms*. January 2010, 191–205, 508, 520–527.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53. <https://doi.org/10.1128/membr.63.1.21-53.1999>
- Maldonado, R., Jimenez, J., & Casadesus, J. (1994). Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 3911–3919. <https://doi.org/10.1128/jb.176.13.3911-3919.1994>
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. Ó., Hinton, J. C. D., & Dorman, C. J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 59(6), 1831–1847. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05062.X>
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G., & Castañeda, M. (2012a). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000334244>
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G., & Castañeda, M. (2012b). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3–4), 147–159.



<https://doi.org/10.1159/000334244>

- Martínez-Noël, G., Curatti, L., Hernandez, J. A., & Rubio, L. M. (n.d.). *NifB and NifEN protein levels are regulated by ClpX2 under nitrogen fixation conditions in Azotobacter vinelandii*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07540.x>
- Martínez-Ortiz, I. C., Ahumada-Manuel, C. L., Hsueh, B. Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Waters, C. M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G., & Núñez, C. (2020). Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Extracellular Mannuronan C-5 Epimerases Is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 202(24), 135–155. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-20>
- Martínez, L. C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides, J., & Bustamante, V. H. (2014). In silico identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the salmonella *csrB* and *csrC* genes. *Journal of Bacteriology*, 196(2), 325–336. <https://doi.org/10.1128/JB.00806-13>
- Molofsky, A. B., & Swanson, M. S. (2003). *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Molecular Microbiology*, 50(2), 445–461. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03706.X>
- Monteiro, L. M. O., Sanches-Medeiros, A., Westmann, C. A., & Silva-Rocha, R. (2019). Modulating Fis and IHF binding specificity, crosstalk and regulatory logic through the engineering of complex promoters. *BioRxiv*, 614396. <https://doi.org/10.1101/614396>
- Morash, M. G., Brassinga, A. K. C., Warthan, M., Gourabathini, P., Garduño, R. A., Goodman, S. D., & Hoffman, P. S. (2009). Reciprocal expression of integration host factor and HU in the developmental cycle and infectivity of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1826–1837. <https://doi.org/10.1128/AEM.02756-08>
- Morikawa, K., Ohniwa, R. L., Kim, J., Maruyama, A., Ohta, T., & Takeyasu, K. (2006). Bacterial nucleoid dynamics: oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. *Genes to Cells*, 11(4), 409–423. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2006.00949.X>
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Eisenstark, A., & Chatterjee, A. K. (1998). RpoS (Sigma-S) Controls Expression of *rsmA*, a Global Regulator of Secondary Metabolites, Harpin, and Extracellular Proteins in *Erwinia carotovora*. *Journal of Bacteriology*, 180(14), 3629. <https://doi.org/10.1128/jb.180.14.3629-3634.1998>
- Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., & Espín, G. (2017a). Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*, 104(2), 197–211. <https://doi.org/10.1111/mmi.13621>
- Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., & Espín, G. (2017b). Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*, 104(2), 197–211. <https://doi.org/10.1111/mmi.13621>

- Murphy, L. D., & Zimmerman, S. B. (1995). Condensation and cohesion of  $\lambda$  DNA in cell extracts and other media: Implications for the structure and function of DNA in prokaryotes. *Biophysical Chemistry*, 57(1), 71–92. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(95\)00047-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00047-2)
- Nash, H. A. (1996). The HU and IHF Proteins: Accessory Factors for Complex Protein-DNA Assemblies. *Regulation of Gene Expression in Escherichia Coli*, 149–179. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8601-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8601-8_8)
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(4), 244–254. <https://doi.org/10.1159/000108658>
- Oberto, J., Drlica, K., & Rouvière-Yaniv, J. (1994). Histones, HMG, HU, IHF: Mème combat. *Biochimie*, 76(10–11), 901–908. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90014-0)
- Oeding, V., & Schlegel, H. G. (1973). p-Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its Significance in the Regulation of Poly-p-hydroxybutyrate Metabolism. In *Biochem. J* (Vol. 134).
- Oliva, G., Sahr, T., & Buchrieser, C. (2018). The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00003>
- Pan, J., Zhao, M., Huang, Y., Li, J., Liu, X., Ren, Z., Kan, B., & Liang, W. (2018). Integration host factor modulates the expression and function of T6SS2 in *Vibrio fluvialis*. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 962. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00962/BIBTEX>
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly-Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 184(20), 5672–5677. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5672-5677.2002>
- Pflüger-Grau, K., & Görke, B. (2010). Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in Microbiology*, 18(5), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.003>
- Prieto, A. I., Kahramanoglou, C., Ali, R. M., Fraser, G. M., Seshasayee, A. S. N., & Luscombe, N. M. (2012). Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Research*, 40(8), 3524–3537. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1236>
- Quiroz-Rocha, E., Bonilla-Badía, F., García-Aguilar, V., López-Pliego, L., Serrano-Román, J., Cocotl-Yañez, M., Guzmán, J., Ahumada-Manuel, C. L., Muriel-Millán, L. F., Castañeda, M., Espín, G., & Nuñez, C. (2017a). Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(7), 1105–1115.

<https://doi.org/10.1099/MIC.0.000457/CITE/REFWORKS>

- Quiroz-Rocha, E., Bonilla-Badía, F., García-Aguilar, V., López-Pliego, L., Serrano-Román, J., Cocotl-Yañez, M., Guzmán, J., Ahumada-Manuel, C. L., Muriel-Millán, L. F., Castañeda, M., Espín, G., & Nuñez, C. (2017b). Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (United Kingdom)*, *163*(7), 1105–1115. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000457/CITE/REFWORKS>
- Reverchon, S., Meyer, S., Forquet, R., Hommais, F., Muskhelishvili, G., & Nasser, W. (2021). The nucleoid-associated protein IHF acts as a ‘transcriptional domainin’ protein coordinating the bacterial virulence traits with global transcription. *Nucleic Acids Research*, *49*(2), 776–790. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1227>
- Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M. Á., Castañeda, M., Espín, G., & Segura, D. (2016). The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE*, *11*(4), e0153266. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153266>
- Romero, Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G., & Segura, D. (2013). Sigma Factor RpoS Controls Alkylresorcinol Synthesis through ArpR, a LysR-Type Regulatory Protein, during Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *195*(8), 1834. <https://doi.org/10.1128/JB.01946-12>
- Sadoff, H. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, *39*(4), 516–539. <https://doi.org/10.1128/mmbr.39.4.516-539.1975>
- Salmeron, V., Martinez-Toledo, M. V., & Gonzalez-Lopez, J. (1990). Nitrogen fixation and production of auxins, gibberellins and cytokinins by an *Azotobacter chroococcum* strain isolated from the root of *Zea mays* in the presence of insoluble phosphate. *Chemosphere*, *20*(3–4), 417–422. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(90\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(90)90072-2)
- Sampietro, D. A., Belizán, M. M. E., Apud, G. R., Juarez, J. H., Vattuone, M. A., & Catalán, C. A. N. (2021). Alkylresorcinols: chemical properties, methods of analysis and potential uses in food, industry and plant protection. *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants*, 148–166. <https://doi.org/10.1079/9781780642338.0148>
- Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology*, *179*(6), 437–443. <https://doi.org/10.1007/S00203-003-0553-4/FIGURES/2>
- Segura, D., Núñez, C., & Espín, G. (2020). A zotobacter Cysts . *ELS*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000295.pub3>
- Segura, D., Vargas, E., & Espín, G. (2000).  $\beta$ -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene*, *260*(1–2), 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00462-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00462-5)
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M., & Espín, G. (2009). Isolation and Characterization of *Azotobacter vinelandii* Mutants Impaired in Alkylresorcinol

- Synthesis: Alkylresorcinols Are Not Essential for Cyst Desiccation Resistance. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 3142. <https://doi.org/10.1128/JB.01575-08>
- Senior, P. J., & Dawes, E. A. (1973). *The Regulation of Poly-P-hydroxybutyrate Metabolism in Azotobacter beijerinckii* (Vol. 134).
- Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., ... Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534–4545. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-09>
- Spira, B., & Yagil, E. (1999). The Integration Host Factor (IHF) Affects the Expression of the Phosphate-Binding Protein and of Alkaline Phosphatase in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 1999 38:2, 38(2), 80–85. <https://doi.org/10.1007/S002849900407>
- Stonehouse, E., Kovacikova, G., Taylor, R. K., & Skorupski, K. (2008). Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4736–4748. <https://doi.org/10.1128/JB.00089-08/ASSET/90318915-714F-4FD6-A01C-820CBB51F913/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0130879180008.JPEG>
- Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., & Espín, G. (2017a). GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(2), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw278>
- Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., & Espín, G. (2017b). GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw278>
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of Bacterial Virulence by Csr (Rsm) Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(2), 193–224. <https://doi.org/10.1128/membr.00052-14>
- Workentine, M. L., Chang, L., Ceri, H., & Turner, R. J. (2009). The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: A bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 292(1), 50–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01445.x>
- Yoshua, S. B., Watson, G. D., Howard, J. A. L., Velasco-Berrelleza, V., Leake, M. C., & Noy, A. (2021). Integration host factor bends and bridges DNA in a multiplicity of binding modes with varying specificity. *Nucleic Acids Research*, 49(15), 8684–8698. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB641>