

## ESTUDIO DEL PEQUEÑO RNA REGULADOR (sRNA) *ErsA* involucrado en la síntesis de alginatos en *Azotobacter vinelandii*

Miguel Castañeda-Vaquera<sup>2</sup>, Juan Carlos de Lima-Mar<sup>2</sup>, Itzel Rodríguez-Guerra<sup>1</sup>, Miguel Castañeda-Lucio<sup>1</sup>, Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas BUAP<sup>1</sup>, Facultad de Ciencias Biológicas, Licenciatura en Biotecnología BUAP, Puebla Puebla CP 72570, miguel.castaneda@correo.buap.mx.

*Palabras clave: alginatos regulación sRNA*

**Introducción.** *ErsA* es un pequeño RNA regulador (sRNA) reportado en *Pseudomonas aeruginosa* homólogo al sRNA Spot 42 de *E. coli* (1), al que se le ha relacionado con el control de la represión catabólica. Originalmente a *ErsA*, el cual fue encontrado bioinformáticamente, se le conoció como Pseudomon-1. Posteriormente, Pseudomon-1 fue renombrado como *ErsA* y se reportó que regulaba, a nivel post-transcripcional, y de forma negativa la expresión del gen *algC*. En *P. aeruginosa* *algC* es un gen esencial para la síntesis de alginatos y es controlado transcripcionalmente por el factor sigma 22 (AlgU) (2). En *Azotobacter vinelandii*, una bacteria GRAS relacionada filogenéticamente con *P. aeruginosa*, se encontró un homólogo del gen *ersA* (Castañeda et al., 2016). De forma interesante la región reguladora del gen *ersA* de *A. vinelandii* contiene una región promotora putativa dependiente del factor sigma 22. En *A. vinelandii* la transcripción de *algC* es controlada por el factor sigma 22, y también es esencial para la síntesis de alginatos (3) estableciendo un circuito regulador de la síntesis de alginatos entre *algC* y AlgU. Por lo anterior, postulamos la hipótesis de que en *A. vinelandii* el homólogo de *ersA* controla negativamente, a nivel post-transcripcional, la expresión del gen *algC* y por ende la síntesis de alginatos, estableciendo una vía alterna de control que usa el factor sigma 22 para regular la síntesis de alginatos.

**Metodología.** Para generar la mutación del gen *ersA* se utilizaron técnicas moleculares básicas. La generación de la mutante *EersA* se realizó por intercambio alélico. La medición de producción de alginatos se realizó por el método del carbazol.

**Resultados.** Biotecnológicamente es interesante generar una mutante *ersA* que podría presentar capacidades mejoradas en la producción del polímero. Para generar la mutación del gen *ersA* se amplificó por PCR un fragmento de 1.5 kb, que contiene a *ersA*, usando como molde DNA total de la cepa E de *A. vinelandii*. El locus *ersA* se clonó en el vector pJET1.2 generando el plásmido pJET*ErsA*1.5. Usando como molde el pJET*ErsA*1.5 se realizó una

PCR inversa con la finalidad de remover los 120 nucleótidos correspondientes al gen *ersA*, el producto de la PCR se recircularizó generando un sitio único corte *KpnI*. En el sitio *KpnI* se ligó un casete que confiere resistencia a gentamicina. El plásmido generado (pJETΔ*ersA*Gm) se transformó en la cepa silvestre E de *A. vinelandii*, seleccionándose presuntas mutantes resistentes a gentamicina. El intercambio alélico en las presuntas mutantes se verificó por análisis de PCR. Una vez verificada la recombinación en las mutantes se determinó el efecto de la mutación sobre la producción de alginatos. La mutante *EersA* presenta un fenotipo hipermucoide como reflejo de la producción aumentada de los alginatos. Lo anterior se verificó cuantificando la producción de alginatos y la expresión del gen *algC* como posible blanco de regulación.



Fig. 1. Fenotipo de la mutante *EersA*

**Conclusiones.** El sRNA *ErsA* regula la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*.

**Agradecimiento.** El trabajo fue financiado por el programa VIEP-BUAP 2022-2023.

### Bibliografía.

1. Beisel, C.L., & Storz, G. (2011). The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Molecular cell*, 41(3), 286–297.
2. Ferrara, S., Carloni, S., Fulco, R., Falcone, M., Macchi, R., & Bertoni, G. (2015). Post-transcriptional regulation of the virulence-associated enzyme AlgC by the  $\sigma(22)$ -dependent small RNA *ErsA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology*, 17(1), 199–214.
3. Castañeda M., López-Pliego L., & G., Espín (2016) *Azotobacter vinelandii* small RNAs: their roles in the formation of cysts and other processes. In Non-coding RNAs and inter-kingdom communication. Leitão A. L., Enguita F. J. (Eds.) Springer International Publishing.
4. Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. S., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS microbiology letters*, 238(1), 199–206.