

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

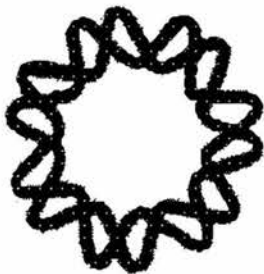
Control Transcripcional del Operón Divergente
phbBAC, de Polihidroxiбутирато, Mediado por los
Reguladores GacA, RpoS y PhbR en *Azotobacter*
vinelandii.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

MARTIN PERALTA GIL



Cuernavaca Morelos

Septiembre del 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de este trabajo de tesis.

NOMBRE: Martin Pereda

FECHA: 27 Ene. 2019

FIRMA: [Firma]

ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. GUADALUPE ESPÍN OCAMPO, EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA U.N.A.M. Y, SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Deceo expresar mis agradecimientos más sinceros a cada uno de los miembros del jurado, por la revisión de este manuscrito, así como por sus valiosos comentarios y sugerencias. También a los miembros del comité tutorial: a los Drs. Jose Luis Puente García y a la Dra. Susana Broom por su valiosa aportación en el desarrollo del proyecto.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Guadalupe Espín Ocampo por darme ésta oportunidad, por su apoyo, confianza, atención y paciencia.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín que con su trabajo de todos los días nos ayudan a salir adelante y a alcanzar nuestras metas.

A todos mis compañeros de laboratorio, de estudio y los que forman parte del Instituto de Biotecnología, por que de alguna forma he aprendido algo de cada uno de ellos. Un agradecimiento muy especial a mis amigos con quienes compartí momentos de tristeza, dolor y alegría, mismos que pasaran a ser inolvidables en mi vida.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre.

Gracias a mi madre, María de la Luz Gil Licad, por su cariño y confianza, y por llenarme siempre de energía y esperanzas y por ser un gran ejemplo de fortaleza.

A Juanita y Samuel por caminar siempre a mi lado, brindándome su apoyo y cariño incondicional.

Agradezco a mi hermano Pepe, por ser un gran ejemplo de perseverancia, y por enseñarme a defender la dignidad de los seres humanos.

A toda mi familia por sus consejos cariño y comprensión, en especial dedico este trabajo a todos mis sobrinos.

A la familia Linares, Eligio (Pica) y Emma por permitirme ser parte de su familia, a Jessie, Eliem y Elvis por brindarme su cariño, por darme nuevas esperanzas en un país que no era el mío.

A Betty y Alonso por mostrarme que siempre existe una esperanza.

A la M. C. Josefina Guzmán Aparicio por su ayuda y apoyo incondicional.

Y por su puesto Marianne y Anita por ser un motivo de perseverancia, por llenarme de ilusión y esperanza.

Índice general.....	v
Índice de figuras.....	ix
Resumenxi
Abstractxii

Capítulo 1.

1. Introducción.....	1
1.1. Polihidroxicanoatos (PHAs).....	1
1.2. Terminología de los PHAs.....	2
1.3. Poli- β -hidroxibutirato (PHB).	2
1.4. Microorganismos productores de PHAs.	3
1.5. Estructura de los gránulos de PHAs.	4
1.6. Biología molecular de los PHAs.....	5
1.6.1. Operones biosintéticos de PHAs.	6
1.6.2. Rutas biosintéticas.	8
1.7. Significado fisiológico de los PHAs.	10
1.8. Mecanismos de regulación.....	14
1.8.1. Regulación a nivel enzimático.	14
1.8.2. Regulación a nivel transcripcional.....	15
1.8.2.1. Análisis de las regiones promotoras.	15
1.8.2.2. Papel de proteínas reguladoras.	16
1.8.2.3. Sistemas de dos componentes.....	17
1.8.2.4. Función reguladora de las fasinas.....	17
1.8.2.5. Sistemas PTS.....	18

1.8.3. Regulación de la biodegradación de los PHA.	18
1.9. <i>Azotobacter vinelandii</i> , como microorganismo	
hiperproductor de PHB.....	19
1.9.1. Características generales de <i>A. vinelandii</i>	19
1.9.1.1. Células de <i>A. vinelandii</i>	19
1.9.1.2. Cepa UWD de <i>A. vinelandii</i>	20
1.9.2. Papel fisiológico de PHB en <i>A. vinelandii</i>	20
1.9.2.1. Fijación de nitrógeno.	21
1.9.2.2. Regulación de equivalentes de reductores.	21
1.9.2.3. Diferenciación.	22
1.9.2.4. Otros.	22

Capítulo 2.

2. Antecedentes.....	23
2.1. Posible papel del activador PhbR, sobre la transcripción del operón <i>phbBAC</i> de <i>A. vinelandii</i>	23
2.2 Sistema de dos componentes GacS/GacA.....	24
2.2.1. Cinasas Histidínicas (GacS).....	24
2.2.2. Regulador de Respuesta GacA.....	26
2.2.3. Homólogos del sistema GacS-GacA y función.....	26

Capítulo 3.

3. Objetivos.....	28
Objetivos generales.	28
Objetivos particulares.....	28

Capítulo 4.

4. Resultados.....	29
4.1. Cinética de la producción de PHB en cepas con mutaciones en los genes <i>gacA</i> , <i>rpoS</i> y <i>phbR</i>	30
4.2. Efecto de los reguladores GacA, RpoS y PhbR sobre la transcripción del operón <i>phbBAC</i>	32
4.3. Efecto de los reguladores GacA y PhbR sobre la transcripción de <i>phbR</i>	33
4.4. Mapeo de los inicios de transcripción del operón <i>phbBAC</i>	34
4.5. Mapeo de los inicios de transcripción de <i>phbR</i>	37
4.6. Posibles sitios de unión de PhbR.	39
4.7. Comparación de la estructura primaria de las proteínas RpoD y RpoS de <i>E. coli</i> y <i>A. vinelandii</i>	41
4.8. Alineamiento de los posibles promotores identificados en <i>A. vinelandii</i>	43

Capítulo 5.

5. Discusión.....	46
5.1. Análisis de los promotores.....	48
5.1.1 Posibles secuencias promotoras pB1 y pB2.....	48
5.1.2. Posibles secuencias promotoras pR1 y pR2.....	49
5.2. Posible mecanismo de acción de PhbR.....	50
5.3. Posibles organización de la región intergénica, <i>phbR-phbBAC</i> , en <i>A. vinelandii</i>	54
5.4. Posibles cascada de regulación del operón divergente <i>phbBAC-phbR</i> en <i>A. vinelandii</i>	56

Capítulo 6.

6. Conclusiones.....	58
----------------------	----

Capítulo 7.

7. Perspectivas.....	59
----------------------	----

Capítulo 8.

8. Artículo Publicado.....	60
----------------------------	----

Capítulo 9.

9. Bibliografía.....	66
----------------------	----

Índice de figuras.

Figura 1. Fórmula general de los polihidroxicanoatos (PHAs).....	1
Figura 2. Productos elaborados a partir de PHAs.....	3
Figura 3. Representación esquemática de un gránulo de PHA.	4
Figura 4. Organización molecular de diversos operones biosintéticos de PHAs.....	7
Figura 5. Ruta biosintética de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en <i>A. vinelandii</i>	9
Figura 6. Vías metabólicas involucradas en la oxidación de los azúcares y la biosíntesis de PHB.	13
Figura 7. Células vegetativas de <i>A. vinelandii</i>	19
Figura 8. Modelo de transducción de señales mediada por el sistema de dos componentes GacS/GacA.....	25
Figura 9. Acumulación de PHB (opacidad) en las cepas UW136, JGW-G (<i>gacA</i>), JGW-R (<i>phbR</i>) y JGW-S (<i>rpoS</i>).....	29
Figura 10. Efecto de las mutaciones <i>gacA</i> , <i>phbR</i> y <i>rpoS</i> , sobre la producción de PHB.	30
Figura 11. Actividad β -galactosidasa en las cepas AJ2, JG-G, JG-S y AJ2R.....	33

Figura 12. Efecto de las mutaciones <i>gacA</i> y <i>rpoS</i> sobre la transcripción de <i>phbR</i>	34
Figura 13. Mapeo de los inicios de transcripción del operón <i>phbBAC</i>	35
Figura 14. Inicios de transcripción del operón <i>phbBAC</i>	36
Figura 15. Inicios de transcripción del gene <i>phbR</i>	38
Figura 16. Región intergénica <i>phbR-phbB</i>	40
Figura 17. Comparación de las subregiones, 2.4, 2.5, 4.1 y 4.2, de los factores σ^{70} y σ^S de <i>Escherichia coli</i> y <i>A. vinelandii</i>	42
Figura 18. Comparación de los posibles promotores, pB1, pB2, pR1 y pR2, contra las secuencias consenso, σ^{70} y σ^S de <i>Escherichia coli</i> y algunos promotores comprobados.	44
Figura 19. Alineamientos entre los posibles promotores, pB1, pB2, pR1 y pR2, de <i>Azotobacter</i> FA8, <i>A. vinelandii</i> y <i>Pseudomonas</i> 61-3.	45
Figura 20. Modelo de regulación de los promotores tipo II.	52
Figura 21. Modelo de regulación del operón divergente <i>phbBAC-phbR</i>	55
Figura 22. Posible cascada de regulación del operón biosintético <i>phbBAC</i>	57

Tablas

Tabla I. Cepas y plásmidos.	31
---	----

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa capaz de producir polihidroxibutirato (PHB). Este polímero es importante en la producción de plásticos biodegradables y es sintetizado a partir de dos moléculas de acetil-CoA mediante tres reacciones, catalizadas por 3- β -cetotiolasa, acetoacetyl CoA reductasa y poli(3-hidroxibutirato) cintasa, las cuales son codificadas por el operón *phbBAC*. *phbR* es un gene que transcribe un regulador transcripcional del operón *phbBAC*. Este gene se encuentra río arriba y en dirección opuesta a *phbBAC*. A pesar de la importancia biológica, bioquímica y molecular, no se conoce mucho sobre la regulación a nivel de transcripción de este operón, en este trabajo nosotros encontramos que:

- a) La transcripción del operón *phbBAC* inicia a partir de dos promotores sobrelapados (pB1 y pB2). *phbR* también se transcribe a partir de dos promotores (pR1 y pR2).
- b) GacA, un regulador de respuesta muy conservado, que posiblemente activa indirectamente la transcripción del promotor pB2 (dependiente de sigma S) y es esencial en la producción de PHB.
- c) *phbR* activa la transcripción de pB1 y parcialmente reprime pB2. Una mutación en *phbR* reduce un 50% la producción de PHB.
- d) PhbR muestra alto grado de identidad con la familia de activadores transcripcionales AraC. Similar a ésta familia de activadores transcripcionales, *phbR* parece reconocer seis posibles motivos repetidos de 18pb (5'-TGTCACCAAnnnnCANTA-3').
- e) El efecto en la mutación en cualquiera de los genes *gacA* y *rpoS* disminuye la transcripción de pB1 y pB2.
- f) La mutación en *rpoS* reduce 40% la acumulación de PHB.

Estos resultados soportan el modelo en el cual GacA y RpoS esta involucrado en la cascada de regulación del operón *phbBAC*.

ABSTRACT

Azotobacter vinelandii is a Gram-negative bacteria that produces poly- β -hydroxybutyrate (PHB). This polymer is industrially important for the production of biodegradable plastics. PHB is synthesized from acetyl-CoA by three reactions catalyzed by 3- β -ketothiolases, acetoacetyl-CoA reductase and poly (3-hydroxybutyrate) synthase which are codified by *phbBAC* operon. *phbR* is a gene that produces a transcriptional regulator of *phbBAC*. This gene is upstream from and in the opposite direction of *phbBAC*. In spite of this biotechnological importance and the biochemical and molecular knowledge, almost nothing is known about the genetic regulation of this operon, in this work we found that:

- a) Transcription of the *phbBAC* initiates from two overlapping promoters (pB1 and pB2). *phbR* also is transcribed from two promoters (pR1 and pR2).
- b) GacA, a highly conserved response regulator, activates the transcription of RpoS-dependent promoter pB2 probably in an indirect form and is essential for PHB production.
- c) PhbR activates transcription from pB1 and partially represses pB2. A mutation in *phbR* was shown to reduce the PHB production by 50%.
- d) PhbR shares a high degree of identity with the transcriptional activator family AraC. Similarly to this activator family, PhbR could recognize 6 putative repeated motifs of 18 bp (5'-TGTCACCAAnnnnCANtA-3').
- e) The effects of mutation in either the *gacA* or the *rpoS* genes abrogate transcription from pB1 and pB2.
- f) A mutation in *rpoS* reduces PHB accumulation by 40%.

Taking together, these results support a model in which GacA and RpoS are involved in the regulation cascade of *phbBAC*.

Capítulo 1

Introducción

Los plásticos son poliésteres producidos a partir de fuentes no renovables, como el petróleo, formados por reacciones de adición o condensación de monómeros para formar polímeros. A pesar de su importancia presentan grandes desventajas en el medio ambiente: son polímeros sintéticos de alto peso molecular, lo que les confiere durabilidad y resistencia a la biodegradación. Una de las grandes alternativas a los graves problemas ocasionados por los plásticos sintéticos, radica en el uso de biopolímeros degradables.

1.1. Polihidroxialcanoatos (PHAs).

Entre los biopolímeros mejor caracterizados se encuentra la familia de los polihidroxialcanoatos (PHAs); poliésteres de varios hidroxialcanoatos, sintetizados en exceso de carbono y limitación de nutrientes, acumulados en forma de gránulos intracelulares y utilizados como material de reserva por una amplia gama de microorganismos [4, 14, 91, 137, 195]. Su longitud se lleva a cabo mediante la formación de grupos éster, a partir de la unión entre el grupo carbonil de un monómero y el grupo hidroxilo del monómero vecino. Su complejidad depende del grupo alquilo que se une al carbono 3 (C3) o β , ya que un grupo alquilo puede variar de metil a tridecil (R) (Figura 1) [14, 91, 178]. Estos compuestos son hidrofóbicos, tienen la característica de ser completamente metabolizados y degradados hasta dióxido de carbono y agua, por una amplia variedad de hongos, algas y bacterias.

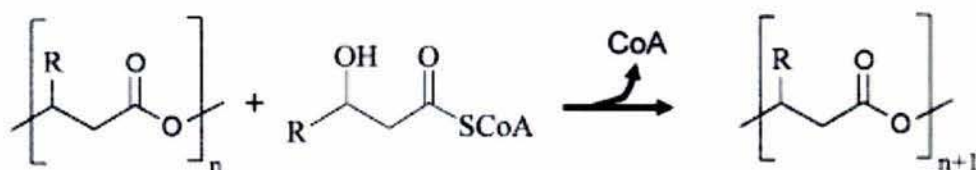


Figura 1. Fórmula general de los polihidroxialcanoatos (PHAs). El poliéster se forma a partir de la unión de un grupo carbonil más un grupo hidroxilo de monómeros vecinos. Donde “n” varía de 100 a 30000 y R varía de metil (C1) a tridecil (C13).

1.2. Terminología de los PHAs.

La familia de PHAs se divide en dos grandes grupos, dependiendo del número de átomos de carbono por monómero. Los de longitud de cadena corta (LCC), constituidos por unidades de 3 a 5 átomos de carbono, presentan un elevado grado de cristabilidad, son brillosos y rígidos. Y los constituidos por unidades de longitud de cadena media (LCM), de 6 a 14 átomos de carbono, cuentan con baja cristabilidad y baja temperatura de transición [14, 91, 178]. En muchas bacterias estos polímeros están compuestos por más de un tipo de monómeros (copolímeros), a pesar de su gran variedad, solamente algunos han sido aprovechados a nivel comercial [P (3HB-co-3HV)] [14, 47, 178].

1.3. Poli- β -hidroxibutirato (PHB).

El poli- β -hidroxibutirato (PHB), el biopolímero mejor caracterizado de la familia de PHAs de cadena corta, consiste de monómeros repetidos (CH-(CH₃)-CH₂-CO-O); es insoluble en agua, altamente cristalino y brillante con propiedades similares al polipropileno. Fue aislado a partir de *Bacillus megaterium* en 1926, por M. Lemoigne del Instituto Luis Pasteur en París, y patentado en 1962 [4]. En Inglaterra en 1975, por el aumento en el precio del petróleo, este polímero fue aprovechado a nivel industrial por la compañía Industria Química Imperial (ICI). Ésta, en 1982, lanza por primera vez al mercado un producto comercial (Biopol®), elaborado a partir de copolímeros de poli- β -hidroxibutirato y poli- β -hidroxivalerato [P(β HB-co- β HV)] sintetizados por la bacteria *Ralstonia eutropha* (formalmente *Alcaligenes eutrophus*) [4, 47].

Los copolímeros de PHB son biodegradables, biocompatibles y no causan toxicidad; por estas propiedades se han generado gran cantidad de productos (“DegraPol”) de uso médico [146, 195]. Se aplican en suturas de cirugías, implantes, elaboración de material quirúrgico, liberación controlada de medicamentos (drogas y hormonas), ingeniería de tejidos e injertos vasculares (reparación de vasos sanguíneos, arterias y sistemas venosos) [136, 187, 195]. Estudios recientes han demostrado la presencia de un precursor de PHB (β -hidroxibutirato (BHB)) en el plasma humano, principalmente en los enfermos de diabetes mellitus, lo que sugiere la asimilación del PHB por el organismo humano [136].

Es utilizado a nivel industrial en la elaboración de envases para cosméticos, aceite de motores, productos para el cuidado del cabello (Wella), rastrillos desechables y plásticos para la envoltura de alimentos (carne y queso) [91, 178]. En la agricultura se utiliza para encapsular fertilizantes, herbicidas, insecticidas o fungicidas, de liberación controlada (Figura 2) [136].



Figura 2. Productos elaborados a partir de PHAs. Por sus formidables características, se han utilizado en el campo de la medicina, en la industria alimenticia y de los cosméticos.

1.4. Microorganismos productores de PHAs.

El almacenamiento de estos polímeros se origina como una respuesta al incremento de metabolitos internos, que funcionan como sustrato o inductores de la síntesis de PHAs. Además, son utilizados como reserva de carbono y energía, y favorecen la supervivencia de los microorganismos en condiciones de estrés. Posiblemente, éstas sean algunas de las razones por las que existen muchos microorganismos que sintetizan este tipo de compuestos.

A la fecha, cerca de noventa géneros bacterianos almacenan gránulos de PHA. Estos microorganismos productores pertenecen a diferentes grupos taxonómicos [14], incluyendo las utilizadas como fuente de genes en biotecnología, entre otros: *Ralstonia eutropha* [70], diversas especies del género *Pseudomonas* [62, 177]; géneros de bacterias Gram-negativas aerobias y anaerobias (algunos como *Azotobacter* [119, 127], *Methylobacterium* [77], *Rhizobium* [19, 91], *Zooglea* [91] y *Syntrophomonas*, *Legionella pneumophila* [66]; muchos metilótrofos [84] y fotótrofos aeróbicos y anaerobios (como *Chlorogloea fritschii* [14], *Rhodobacter capsulatus* [78], *Rhodospirillum rubrum* [14] ó *Chromatium vinosum* [88]); y arqueobacterias.

Es importante señalar que las enterobacterias se encuentran entre los microorganismos que no producen gránulos de PHB. Dadas las características metabólicas de *E. coli*, varios grupos de investigación están interesados en producir PHAs, ya que es un microorganismo que puede utilizar varias fuentes de carbono, crece rápidamente y puede acumular grandes cantidades del polímero, carece de enzimas que degradan los polímeros sintetizados y además los gránulos de PHAs son fáciles de purificar [60, 72, 84]. Por otro lado, también, se ha estudiado el efecto de la producción de PHB en el flujo metabólico intracelular de *Escherichia coli* recombinantes.

1.5. Estructura de los gránulos de PHAs.

Los PHAs son sintetizados durante un exceso de carbono y limitación de nutrientes, como: nitrógeno, azufre, fosfato, hierro, manganeso, magnesio, potasio y oxígeno [14, 65]. Muchos de estos microorganismos son capaces de acumular entre 8 y 12 gránulos de PHA que pueden ocupar de 30% a 80% de su peso seco sin afectar la presión osmótica [4]. La estructura de los gránulos de PHA, consta de un corazón hidrofóbico, donde las cadenas móviles de los poliésteres se encuentran en estado amorfo (Figura 3).

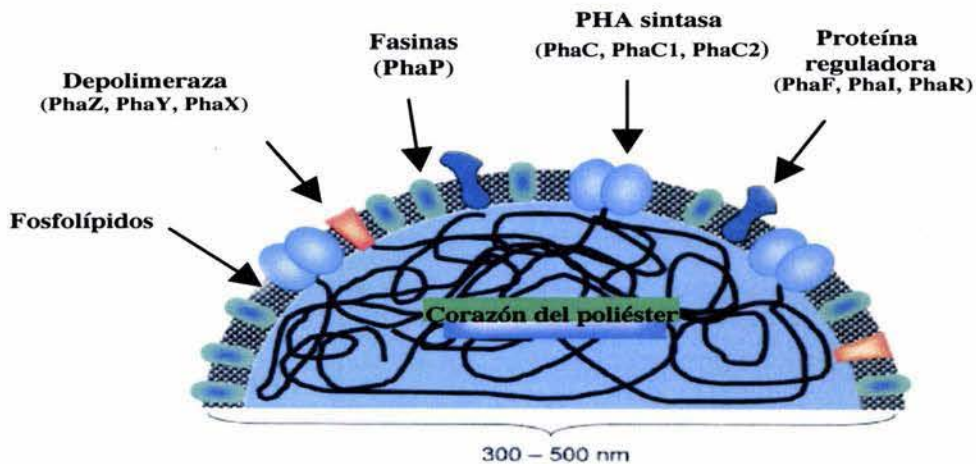


Figura 3. Representación esquemática de un gránulo de PHA. La capa superficial se encuentra formada por una monocapa de fosfolípidos y diferentes tipos de proteínas (depolimerasas, proteínas estructurales y PHA sintasas). En el interior del gránulo se encuentra el núcleo conformado por las cadenas de poliésteres amorfas y móviles.

Los gránulos de PHA están rodeados por una membrana de fosfolípidos con proteínas embebidas, ó ancladas [139, 195], que consisten de PHA sintasas [138, 139], depolimerasas intracelulares [67], proteínas amfifílicas (fasinas) [71, 92, 102, 135], proteínas reguladoras específicas de PHA [77, 93, 94, 132], y proteínas adicionales con

función desconocida (Figura 3) [139]. Estudios realizados en *Bacillus megaterium* y *Rhodococcus ruber* mostraron que los gránulos están constituidos, aproximadamente, de un 97.7% del polímero (PHA), 1.87% de proteínas y una mínima cantidad de fosfolípidos 0.46% [43, 129].

El tamaño de los gránulos incrementa continuamente conforme la PHA sintasa incorpora precursores, del citosol a la cadena de poliéster en crecimiento. Las depolimerasas son requeridas para la movilización de los poliésteres. Las fasinas, en particular, son proteínas que se encuentran embebidas o asociadas a la monocapa de fosfolípidos que rodea a los gránulos. Están constituidas de polipéptidos anfifílicos que tienen función estructural al encontrarse entre los polímeros insolubles y el citoplasma hidrófilico, aunque existe información de su posible participación en la regulación de la síntesis de PHAs. Algunos genes estructurales de las fasinas, como *phaP*, se han identificado en *Rhodococcus ruber* [129, 130], *Ralstonia eutropha* [132, 193], *Aeromonas caviae* [34] *Acinetobacter* spp. [152], *Chromatium vinosum* [88], *Paracoccus denitrificans* [92], *Azotobacter* [128, 160], y *Bacillus megaterium* [37]. En otras especies del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida* y *P. oleovorans*, entre otras), se han identificado dos tipos de fasinas, PhaF y PhaI [135]. En bacterias como *Paracoccus denitrificans* [93, 94] y *R. eutropha* [94, 132], PhaR es otra fasina que se encuentra asociada a los gránulos de PHA y reprime la expresión de los genes *phaP* y *phaR*. Se ha sugerido que algunas fasinas, además de estabilizar las inclusiones de PHA, también están involucradas en la regulación de los genes estructurales o biosintéticos [135, 166, 193, 194]. Adicionalmente, en *Pseudomonas*, se han identificado proteínas estructurales (PhaI, PhaD, PhaS) que posiblemente estén involucradas en la biosíntesis y la movilización [139].

1.6. Biología molecular de los PHAs.

La designación de los genes involucrados en la síntesis, depolimerización y estructuración de los gránulos de PHAs, son denominados: *pha* (polihidroxialcanoatos) o *phb* (polihidroxibutirato), aunque en algunos casos el uso es indistinto.

Los genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de PHA se nombran por orden alfabético y a menudo se encuentran agrupados en operones: *phaA* (β -cetotiolasa), *phaB* (acetoacetyl-CoA reductasa), *phaC* (PHA sintasa), *phaD* (regulador involucrado en la síntesis de PHA), *phaE* (subunidad de la PHA sintasa), *phaG* (transferasa), *phaJ* (enoil-CoA hidratasa), etc. (Figura 4) [91, 138].

Los genes que participan en la estructuración de los gránulos son identificados como *phaF*, *phaI*, y *phaP* y codifican proteínas denominadas fasinas, cuyo tamaño oscila entre 14 a 28 kDa, su posición dentro del genoma varía de acuerdo al microorganismo (Figura 4) [94, 138]. Los genes involucrados en la degradación de PHA se definen de manera opuesta al orden alfabético: *phaZ*, *phaY*, *phaX* (Figura 4) [67, 138].

Por el gran número de microorganismos productores de PHAs, se ha sugerido indicar el origen de un gen o proteína mediante la primera letra del género y de la especie: por ejemplo, la Phb sintasa (PhbC) de *Azotobacter vinelandii* (PhbC_{AV}).

1.6.1. Operones biosintéticos de PHAs.

A menudo los genes relacionados con la biosíntesis y estructuración de los gránulos de PHA se encuentran agrupados en los genomas de las bacterias. En algunos microorganismos, como *Pseudomonas* sp. 61-3 [103], *Azotobacter* FA8 [127, 128] y *A. vinelandii* [160] los genes biosintéticos se encuentran formando el operón *phbBAC*. La organización es diferente en *R. eutropha*, *A. latus*, *B. cepacia*, y *Acinetobacter* sp., (Figura 4a) [91, 94, 138].

Las proteínas codificadas por estos operones tienen funciones diferentes en la acumulación de los polímeros. La velocidad biosintética del compuesto es controlada por la β -cetotiolasa (PhbA) y la acetoacetyl-CoA reductas (PhbB), mientras que la acumulación del polímero es dependiente de la PHA sintasa o polimerasa (PhaC). Llama la atención que en muchos microorganismos la polimerasa (PhaC) se encuentra separada de los demás genes biosintéticos (*Z. ramigera*, *M. extorquens*, *S. meliloti*, *N. carollina*, *R. ruber*, *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *R. rubrum*, *R. capsulatus*, y *A. caviae*) [91, 94]. En algunas especies del género *Pseudomonas* (*P. oleovorans*, *Pseudomonas* sp. 61-3 y *P. aeurogenosa*), se ha determinado la existencia de dos sintasas (*phaC1* y *phaC2*), las cuales están separadas por un gen estructural (*phaZ*) que sintetiza una depolimerasa intracelular (Figura 4b) [91, 103, 135, 177]. *Pseudomonas* sp. 61-3 es el único caso, hasta el momento, en donde se ha determinado la presencia de tres PHA sintasas (PhbC, PhaC1 y PhaC2) [102, 103]. En otras bacterias, como *C. vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa pfennigii* y *Synechocystis* sp. PCC6803, la PHA sintasa posee dos componentes, PhaC y PhaE, que actúan conjuntamente (Figura 4c) [45, 53, 88].

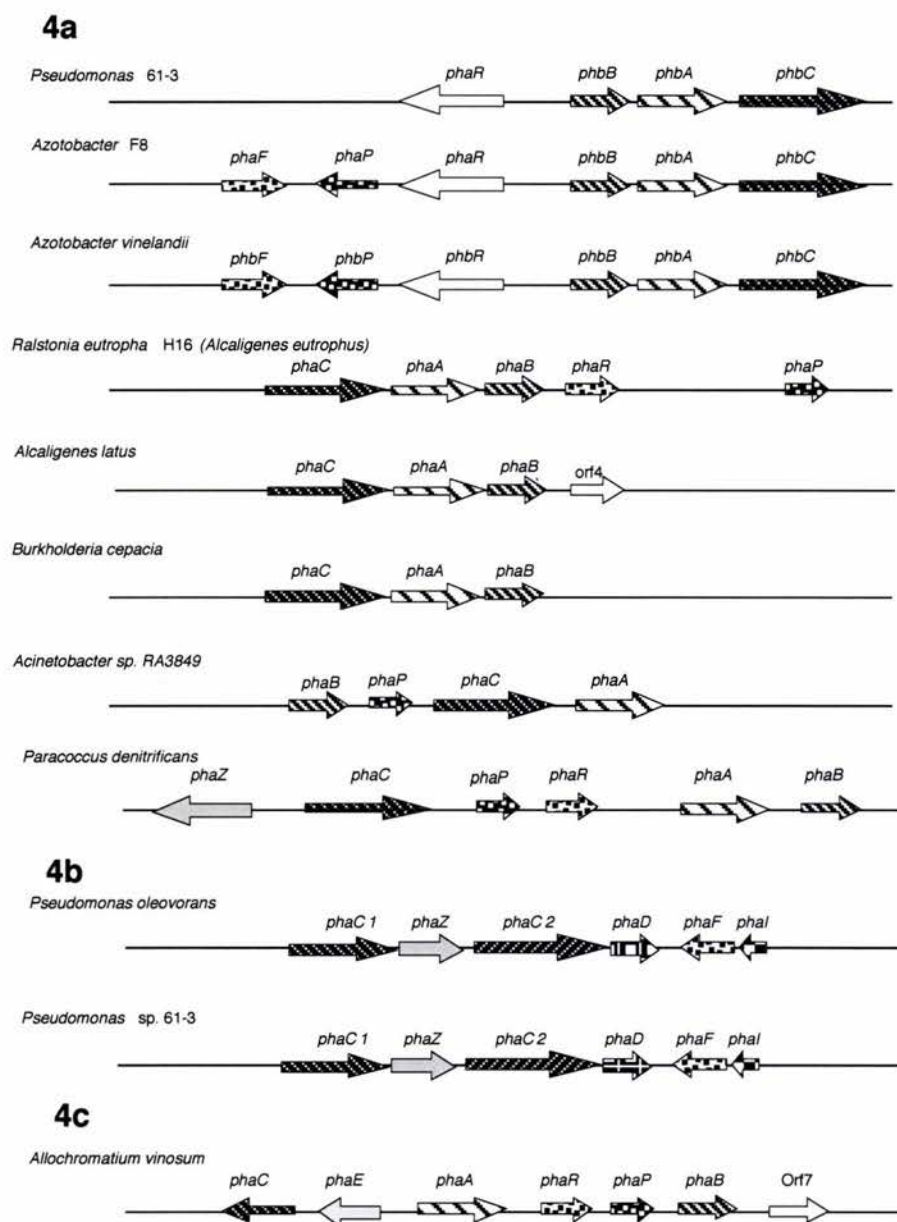


Figura 4. Organización molecular de diversos operones biosintéticos de PHAs. a) Operones biosintéticos de microorganismos productores de PHAs de cadena corta: β -cetotiolasa (*phbA*); acetoacetyl CoA reductasa (*phbB*) y PHA sintasa del tipo I (*phaC*). b) Operones involucrados en la biosíntesis de PHAs de cadena media, a diferencia del panel a, este grupo de microorganismos conservan dos PHA sintasas específicas del tipo II (*phaC1* y *phaC2*), separadas por una depolimeraza (*phaZ*). c) Grupo caracterizado por presentar PHA sintasas del tipo III, conformadas por dos tipos de subunidades (PhaC y PhaE).

1.6.2. Rutas biosintéticas.

Debido a la amplia gama de microorganismos productores de PHA y a la diversidad de los genes biosintéticos, se ha descubierto que existen diferentes rutas mediante las cuales se sintetizan los polímeros.

En microorganismos que acumulan PHAs de cadena corta (PHB), como *R. eutropha* y *Azotobacter* sp, la síntesis del polímero se realiza como una desviación del metabolismo central, ligado a acetil coenzima A (Ac-CoA), que en lugar de catalizarse en el ciclo de Krebs se utiliza en la síntesis de PHB. La biosíntesis de PHB se lleva a cabo por tres reacciones: la primera consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, para producir acetoacetil-CoA mediante la enzima β -cetotilasa (*phbA*). En la segunda, se reduce la acetoacetil-CoA a R(-)- β -hidroxibutiril-CoA, mediante la enzima acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (*phbB*). Por último, los monómeros de R- β -hidroxibutiril-CoA son polimerizados por la PHB sintasa (*phbC*) (Figura 5) [50, 65, 70, 96].

En *Chromatium vinosum*, la formación de R(-)- β -hidroxibutiril-CoA se origina mediante la intervención de la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADH. Otra variante, de esta ruta, se encuentra en *Rhodospirillum rubrum*, donde la formación de R(-)- β -hidroxibutiril-CoA se lleva a cabo vía L(+)- β -hidroxibutiril-CoA, empleando dos enoil-CoA hidratasa [169].

La composición de los PHAs de cadena media dependen de varios factores, como la fuente de carbón, la vía metabólica involucrada en la síntesis de los precursores [(tioesteres de β -hidroxiacil-CoA (HA-CoA)] y el tipo de PHA sintasa utilizada. Diversas especies del género *Pseudomonas* y *Aeromonas caviae*, utilizan alcanos y alcanosatos como fuente de carbono, y mediante la β -oxidación, la enoil hidratasa (PhaJ) acumula los precursores de β -hidroxiacil-CoA (HA-CoA) que serán utilizados por la PHA sintasa en la formación de los gránulos de PHA [91, 169]. Cuando es utilizada esta vía metabólica, no se requiere de ninguna β -cetotilasa (PhbA) o acetoacetil-CoA reductasa específica (PhbB) para la síntesis del precursor HA-CoA, el cual es un sustrato para muchas PHA sintasas.

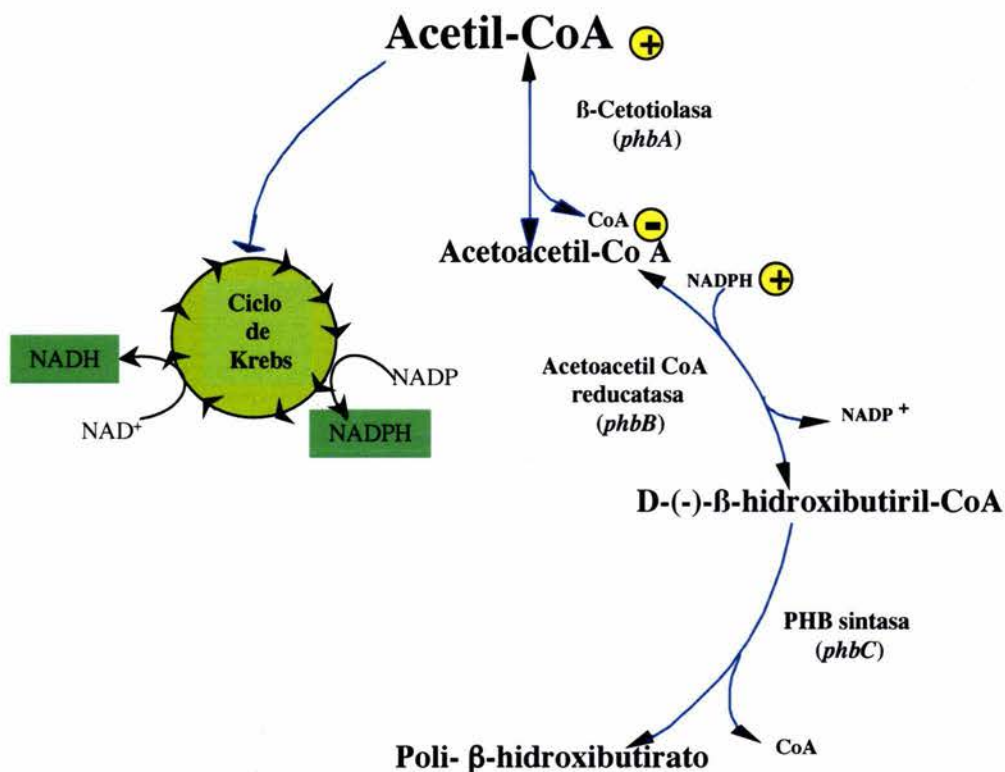


Figura 5. Ruta biosintética de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*. El incremento de poder reductor (NADH y NDHP) bloquea el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs, inhibiendo las tres primeras enzimas de éste ciclo, e incrementa los niveles de acetil CoA y la biosíntesis de PHB. La acetil CoA y el poder reductor (NADH y NDHP) son activadores alostéricos de la β-cetotiolasa (PhbA) y acetoacetyl-CoA reductasa (PhbB) respectivamente. El incremento de CoA inhibe alostéricamente a la β-cetotiolasa (PhbA).

Por otro lado, algunas especies como *P. putida*, *P. oleovorans*, *P. fragi* y *P. aeruginosa*, que utilizan gluconato, acetato o etanol como fuente de carbono, sintetizan PHAs de longitud de cadena media a partir de acetyl-CoA. Este grupo de bacterias utilizan la biosíntesis de ácidos grasos *de novo*, para la generación de los precursores (HA-CoA) del polímero. PhaG (*phaG*) es una transacetilasa cuya función es unir la biosíntesis de ácidos grasos *de novo* con la biosíntesis de los PHAs, al proveer el principal sustrato de la PHA sintasa [91, 169]. La transacetilasa de *P. putida* fue la primer enzima caracterizada que convierte el tioester HA-ACP al tioester HA-CoA, catalizando la transferencia del grupo ACP por el grupo CoA de los intermediarios correspondientes. En adición a estas vías, el ciclo del ácido cítrico y el metabolismo de aminoácidos también provee precursores importantes para la biosíntesis de PHAs [169].

Respecto a las PHA sintasas se han distinguido tres tipos, de acuerdo a su especificidad [138, 139]: las de tipo I son relativamente grandes y su peso molecular oscila entre 61 y 68 kDa (*R. eutropha*), catalizan preferencialmente la polimerización de tioesteres de β -hidroxiacil-CoA (HA-CoA) constituidos de tres a cinco átomos de carbono, y solamente actúa un tipo de subunidad (Figura 4a) [68]. El tipo II (*P. aeruginosa*) cataliza la polimerización de tioesteres de HA-CoA compuestos de 6 a 14 átomos de carbono (Figura 4b) [33]. Y el tipo III (*C. vinosum*) comprende un heterodímero, conformado por dos subunidades (PhaC y PhaE) de aproximadamente 40 kDa cada una; estas PHA sintasas catalizan tioesteres de HA-CoA de cadena corta (3C-5C) (Figura 4c) [45]. Un caso nuevo se presenta en *B. megaterium*, donde la actividad de la PHA sintasa también requiere de dos subunidades (PhaC y PhaR): posiblemente, PhaR_{Bm} sea un ortólogo que reemplaza a PhaE_{Cv} [139].

1.7. Significado fisiológico de los PHAs.

La biosíntesis de PHAs en algunos microorganismos (*R. eutropha*, *A. vinelandii*) está relacionada con gluconato como fuente de carbono, el cual es metabolizado mediante la vía Entner-Doudoroff (ED) y de las Pentosas [65, 83, 163]. Estas dos vías generan poder reductor (NADPH) y Ac-CoA. Estos metabolitos son indispensables en la formación de PHAs, ya que se requiere de grandes cantidades de Ac-CoA y equivalentes reductores (NADH y NADPH) [50, 81, 163, 165]. En los recientes años se ha demostrado, en cepas de *E. coli* recombinantes, la importancia que tienen las vías de Entner-Doudoroff (ED) y de las Pentosas en la eficiente producción de PHAs [60, 72, 150]. La Ac-CoA, un compuesto de dos carbonos, es fundamental en el funcionamiento

del ciclo de Krebs. Este ciclo provee los intermediarios necesarios para las funciones biosintéticas, genera poder reductor (NADH y NADPH) que, acoplado a la cadena respiratoria, genera el ATP necesario para el crecimiento bacteriano (Figura 6).

Durante las condiciones de limitación de oxígeno, el crecimiento de los microorganismos decrece a causa de la disminución de la velocidad de oxidación de los azúcares, y del decremento en la actividad del ciclo de Krebs. Este fenómeno se debe al efecto inhibitorio del citrato y de los cofactores acumulados (NADH y NADPH) sobre las rutas de oxidación de los azúcares [81, 163, 164]. La liberación del efecto inhibitorio es mediado por la acumulación del carbón, en forma de PHA, utilizando energía y poder reductor. De esta forma, la disminución de NADH y NADPH libera la inhibición de la oxidación de los azúcares y del metabolismo del citrato, en un fenómeno parecido al fermentativo.

En *R. etli* el metabolismo fermentativo se caracteriza por la reducción de la velocidad de crecimiento, excreción de ácidos orgánicos y aminoácidos, disminución en las actividades de la piruvato carboxilasa, piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y acumulación de PHB [31]. Cevallos, en 1996, demostró, en *R. etli*, que la acumulación de monómeros de β -hidroxibutiril CoA, ocasionada por una mutación en la PHA sintasa (PhaC), provoca la excreción de compuestos como: glucógeno, formato, piruvato, acetato, malato, lactato; y disminuye en la bacteria, la capacidad de crecer en fuentes de carbono glucolíticos, como piruvato y glucosa [19]. Una mutación del mismo tipo en *Azospirillum*, incrementa los exopolisacáridos, la motilidad, adhesión, quimiotaxis y disminuye la sobrevivencia [73]. *R. eutropha*, una cepa carente de PHB, excreta compuestos como piruvato, malato y acetato [24].

Estos antecedentes confirman la importancia fisiológica de la acumulación de PHB en los microorganismos: de esta forma, las bacterias acumulan el carbono y evitan la excreción de compuestos orgánicos.

En *A. vinelandii* una mutación en el gene de la piruvato carboxilasa (*pycA*), disminuye el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs, incrementando los niveles de Ac-CoA para la síntesis de PHB [162]. En *P. putida*, una mutación en la isocitrato liasa (*aceA*) decrece, significativamente, la actividad de la isocitrato deshidrogenasa y no es capaz de crecer en acetato como fuente de carbono, favoreciendo la acumulación de PHA [76]. La Ac-CoA es el principal sustrato en la ruta biosintética de PHB en *A. vinelandii*; además,

existe la posibilidad de que se encuentre involucrada en mecanismos de regulación que se desconocen, por ser una proteína poco estudiada en este microorganismo. En *R. eutropha* el incremento de Ac-CoA inhibe a la piruvato deshidrogenasa (PDH); en *Sinorhizobium meliloti* inhibe a la acetoacetyl CoA (*acsA*); y en *E. coli* impide la fosforilación del sensor PhoQ [87].

En 2001, Page demostró en *A. vinelandii* UWD, que la degradación de PHB comienza al disminuir la fuente de carbono, incrementando la síntesis de alquilresorcinoles y de alginato [120]. Los monómeros de β -hidroxibutiril CoA, liberados, son utilizados para la formación de Ac-CoA. Posteriormente, este metabolito es utilizado como sustrato para la formación de alginato mediante gluconeogénesis.

Una mutación en el gen *cydR* de *A. vinelandii*, provoca el incremento, durante la fase exponencial de los citocromos *bd* y de dos enzimas: PhaA (β -cetotiolasa), y PhaB (acetoacetyl-CoA reductasa), involucradas en la síntesis de PHB [191]. Posiblemente, el efecto de esta mutación sobre la expresión de las dos enzimas biosintéticas, PhbA y PhbB, sea indirecto, a través de la desestabilización de la cadena respiratoria.

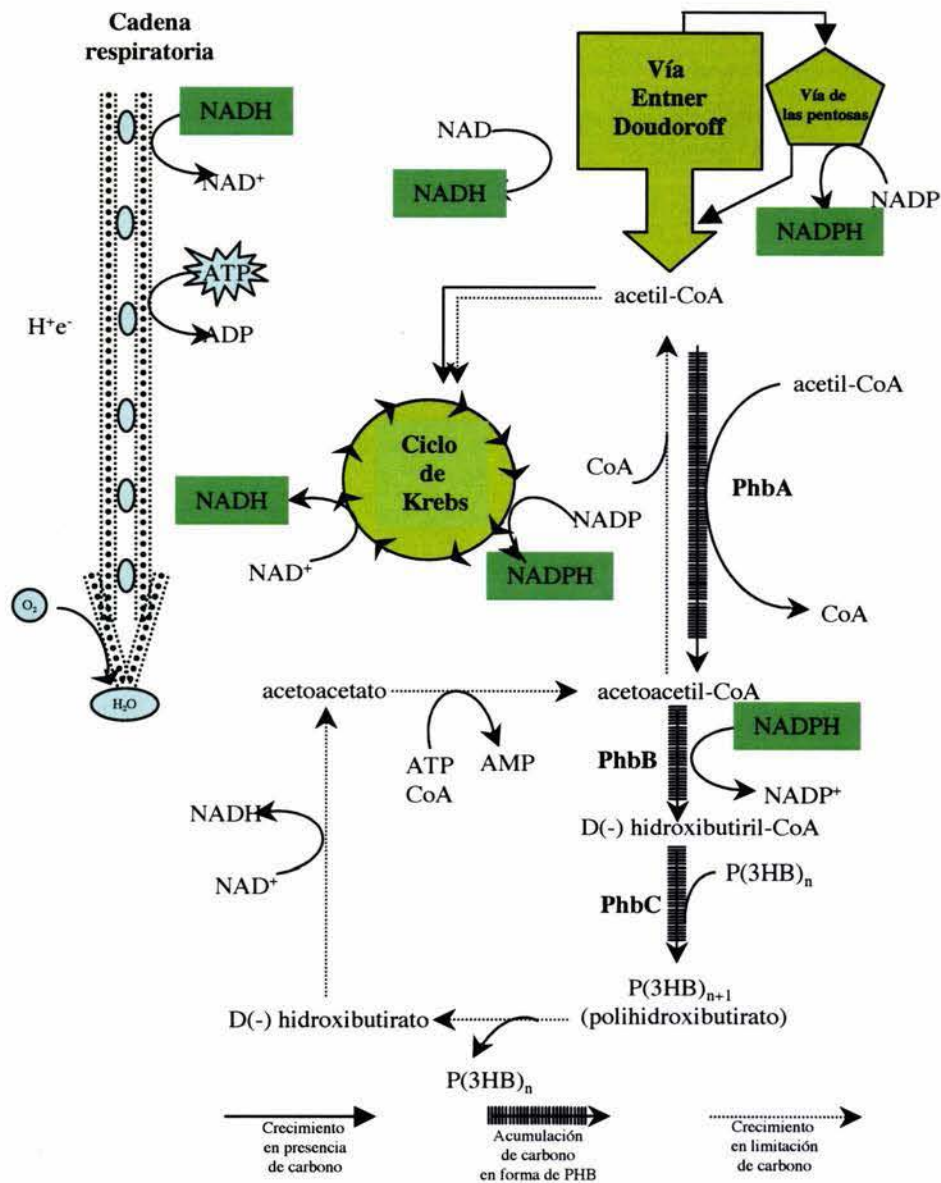


Figura 6. Vías metabólicas involucradas en la oxidación de los azúcares y la biosíntesis de PHB. Las principales vías metabólicas que generan poder reductor para la síntesis de PHB son: Entner-Doudoroff, vía de las pentosas y Ciclo de Krebs. La cadena respiratoria es el principal donador de electrones para la generación de energía en forma de ATP. Al disminuir los niveles de O_2 , el flujo de electrones disminuye a través de la cadena respiratoria, ocasionando la acumulación de poder reductor (NADH, NADPH) y Ac-CoA, para la síntesis de PHB. La degradación de PHB ocurre durante limitaciones de carbono.

1.8. Mecanismos de Regulación.

Las condiciones medioambientales juegan un papel importante en la fisiología de los microorganismos, desencadenando cascadas de regulación involucradas en la expresión de un gran número de genes. La síntesis de PHAs en los organismos productores es favorecida por la disminución en la concentración de algunos nutrientes y exceso de carbón [14, 80, 85, 164, 174, 183]. En el género *Pseudomonas*, la deficiencia de sulfatos, fosfatos, magnesio, hierro, manganeso y amonio estimulan la formación del polyester mientras que, las limitaciones de calcio, cobalto, cobre, molibdeno, sodio y zinc, no parecen alterar la formación de PHAs [80, 85, 174]. En otros géneros, como *Bacillus* [182] y *Azotobacter*, la carencia de algunos nutrientes (potasio, fósforo, oxígeno y nitrógeno) incrementan la acumulación de PHAs [164, 183]. La función biológica de PHA en estos microorganismos es importante durante la esporulación, y enquistamiento y sirven como marcador del estatus nutricional de la población bacteriana al percibir la carencia de nutrientes. En la actualidad, se sabe que la regulación del metabolismo de los polihidroxialcanoatos se lleva a cabo en diferentes niveles: regulación de proteínas a nivel enzimático, regulación a nivel transcripcional y regulación de la biodegradación de PHA.

1.8.1. Regulación a nivel enzimático

En algunos microorganismos como *R. eutropha* y *Azotobacter* sp., la disminución de oxígeno provoca el incremento de los cofactores NADPH y NADH que inhiben, respectivamente, la actividad de la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa, ocasionando la disminución del flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs, incrementando, en consecuencia, los niveles de Ac-CoA (Figura 5 y 6) [50, 55, 96, 163, 164, 165]. Esto sugiere que la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa son puntos de control importantes en el proceso de síntesis de PHB, con base a su habilidad para controlar la disponibilidad de Ac-CoA.

En la biosíntesis de PHB, la β -cetotiolasa (PhbA) utiliza Ac-CoA como sustrato, y es inhibida alostéricamente por el incremento de los niveles de CoA [50, 163]. La acetoacetil-CoA reductasa (PhbB) es regulada positivamente por el aumento de los cofactores reducidos NADPH ó NADH [50, 81, 96, 163, 165] (Figura 5). Otros trabajos

con PHB, en cepas recombinantes, demuestran que la velocidad de biosíntesis es controlada por β -cetotiolasa y acetoacetyl-CoA reductasa y que la acumulación de los gránulos depende de la PHB sintasa [70].

En la cianobacteria *Synechococcus* sp. MA19 la fosfotransacetilasa convierte acetyl CoA a acetyl fosfato y éste, a su vez, activa postraduccionalmente a la PHA sintasa. La fosfotransacetilasa es regulada por las concentraciones de acetyl CoA y de las relaciones de carbón y nitrógeno (C/N) en la célula. Así, el acetyl fosfato puede actuar como una señal de desbalance de C/N afectando el metabolismo de PHB [110].

En *Synechocystis* sp. PCC6803, la acumulación de PHAs requiere necesariamente de una polimerasa constituida de dos subunidades, sintetizadas por los genes *phaC* y *phaE*. La coexpresión de los dos genes es necesaria para obtener una PHA sintasa; activa, la inactivación de una de ellas (*PhaE*), provoca la disminución drástica de la síntesis de PHA [53]. Un caso similar se observa en *B. megaterium*, que requiere de dos subunidades (*PhaC* y *PhaR*) para obtener actividad sintasa *in vivo* e *in vitro* [105]. Aunque *PhaR* de *B. megaterium* no es un homólogo de *PhaE* en *Synechocystis* sp, se piensa que puede tener una función directa o indirecta sobre la activación de la subunidad *PhaC*.

1.8.2. Regulación a nivel transcripcional.

1.8.2.1. Análisis de las regiones promotoras.

Diversas investigaciones realizadas en microorganismos productores de PHAs se han enfocado en el análisis de los promotores involucrados en la transcripción de genes biosintéticos y reguladores de PHA. Algunos estudios, en este sentido, se basan en predicciones computacionales; en otros, los promotores son descubiertos experimentalmente.

En *P. aeruginosa* PAO1, la transcripción de la PHA sintasa 1 (*phaC1*) es a partir de dos promotores que presentan consensos con los factores sigma σ^{70} y σ^{54} , el segundo de estos factores es requerido cuando se usa gluconato como fuente de carbono [177]. En *P. oleovorans*, se ha identificado un posible promotor reconocido por σ^{54} ; en el gen *phaC1* [62]. La expresión de *phaC* en *R. eutropha* al parecer es constitutiva, pues uno de los dos promotores identificados es dependiente de σ^{70} (TTGACA-AACAAT) [156]. Posteriormente, mediante análisis computacional, se logró identificar un segundo

promotor dependiente de σ^{54} .

En *Bacillus megaterium* la expresión del operón *phaRBC* y el gen *phaQ* es constitutiva dependiente de σ^A (σ^{70}), mientras que *phaP* es reconocido por σ^D (σ^S), el cual controla un regulón asociado con genes de ensamble flagelar, quimiotaxis y motilidad [104]. En *Pseudomonas* 61-3, utilizando métodos computacionales, se encontraron dos secuencias consenso con σ^{70} y σ^{54} para el gene *phbC*, sin llegar a estudiar su funcionalidad [103]. En *Acinetobacter* sp., se ha encontrado que uno de los promotores identificados experimentalmente (P3), en el gen *phbB*, es inducido por limitación de fosfato, y parece estar bajo el control del regulón *pho* [153]. Se ha demostrado que una secuencia consenso con las cajas *pho*, está sobrepuesta con la región-35 de este promotor (CTGCGATCTGTTTGCAAT). No obstante, se carece de información que involucre proteínas reguladoras específicas sobre la expresión de los genes *pha*.

Como hemos demostrado, existen estudios muy limitados sobre los promotores de los genes involucrados en la síntesis de PHAs, a pesar de la existencia de gran variedad de microorganismos productores. Otro enfoque sobre la regulación transcripcional de PHAs se basa en los estudios realizados con activadores transcripcionales.

1.8.2.2. *Papel de proteínas reguladoras.*

En 1998 Miyamoto mostró que, en *Vibrio harveyi*, una mutación en la proteína reguladora LuxR abate la producción de PHB [111]. LuxR es un activador transcripcional requerido en altas concentraciones celulares para la acumulación y excreción del autoinductor N-acil homoserin lactona. El incremento de este inductor correlaciona con el aumento de PHB en fase estacionaria.

Otra proteína involucrada en el mecanismo de regulación transcripcional se ha descrito en el género *Pseudomonas*. PhbR es un activador transcripcional divergente al operón biosintético *phbBAC*, en la cepa *Pseudomonas* sp. 61-3 [103]. Esta proteína reguladora pertenece a la familia de activadores transcripcional AraC/XylS, y está involucrada en la expresión del homopolímero PHB. La inactivación de PhbR disminuye hasta un 50% la producción de PHB en *Pseudomonas* sp. 61-3 y en *A. vinelandii* [103, 122]. Otro análisis realizado en *R. eutropha*, demuestra que la transcripción de sus genes *phb* son independientes de la presencia del activador PhbR_{P61-3}, sugiriendo que los mecanismos de regulación para las dos especies son diferentes [103]. Recientemente, Lee demuestra que *phaQ* codifica para un nuevo regulador transcripcional que controla

negativamente la expresión de *phaQ* y *phaP* en *Bacillus megaterium* [86]. Provee evidencia que PhaQ puede percibir la presencia de PHB *in vivo* y que los gránulos de PHB artificiales pueden inhibir la formación del complejo PhaQ-ADN.

1.8.2.3. *Sistemas de dos componentes.*

En *Pseudomonas putida* KT2442, se ha identificado un gen que codifica para una proteína reguladora denominada PhaS. Su estructura primaria muestra homología con un sensor perteneciente al sistema general de dos componentes y se presume está involucrada en la expresión de PHAs. De acuerdo con esta información, en *Azotobacter vinelandii* también se ha descrito un sistema homólogo de dos componentes denominado GacS/GacA que regula la producción de PHB [17].

1.8.2.4. *Función reguladora de las fasinias.*

Es importante mencionar, que algunas proteínas estructurales de los gránulos de PHAs (fasinas), tienen función reguladora sobre sus genes biosintéticos y estructurales. Recientemente, se ha demostrado en *P. oleovorans* Gpo1, que la proteína PhaF cumple con dos funciones: una reguladora y otra estructural. En la primera se une a regiones específicas del ADN, reprimiendo la transcripción de los genes *phaC1* y *phaI*; y en la segunda deja de reprimir a los genes para formar parte de los gránulos de PHA (Figura 6) [135]. PhaF pertenece al grupo de proteínas parecidas a histonas, que poseen nueve motivos repetidos AAKP en su carboxilo terminal [135, 107]. Un caso similar se encuentra en *R. eutropha* y *P. denitrificans*, en donde un homólogo de PhaF, denominado PhaR, se une al ADN en regiones específicas, reprimiendo la expresión de los genes *phaR* y *phaP* [93, 95, 132, 194]. Aunque PhaR no presenta los motivos AAKP como los de PhaF, se especula un posible mecanismo parecido al propuesto, previamente, por Prieto *et al.* en *P. oleovorans* Gpo1 [135]. En este caso, el regulador negativo (PhaR) podría unirse a los gránulos de PHB durante su síntesis, liberando la represión de los genes *phaP* y *PhaR*; el caso contrario se presenta durante la degradación del PHB [194]. Una evidencia que apoya esta información se encuentra en *R. eutropha*, en donde una mutación en la PHB sintasa (*phaC*) no produce gránulos ni se transcribe *phaP*, lo que sugiere la presencia de los gránulos para que *phaP* se exprese [185, 193, 194]. Ultimamente, se ha demostrado en *Escherichia coli* recombinante, que tanto PhaP como PhaR proporcionan estabilidad a los gránulos de PHB incrementando su acumulación [166].

1.8.2.5. *Sistemas PTS.*

Otro sistema involucrado en la síntesis de PHB es el de fosfotransferasa relacionada con nitrógeno PTS^{Ntr}. Este sistema consiste de las enzimas EI^{Ntr} (*ptsP*), Npr (*ptsN*) y IIA^{Ntr} (*ptsO*) que son homólogas de las enzimas EI, Hpr y IIA^{Glu} del sistema de fosfotransferasa (PTS), involucrado en la fosforilación de muchos carbohidratos en un gran número de bacterias [176]. En *Azotobacter vinelandii* se ha reportado que una mutación en el gen homólogo a *ptsP*, que codifica para la enzima I^{Ntr}, disminuye la acumulación de PHB [158]. Estudios recientes demuestran que una mutación en *ptsN*, que codifica para la enzima IIA^{Ntr}, suprime el efecto negativo de *ptsP* y aumenta la transcripción del activador PhbR y del operón *phbBAC*. Esto sugiere que la presencia de una proteína IIA de nitrógeno, no fosforilada, tiene un efecto negativo sobre la síntesis de PHB [114]. Se ha reportado, en *A. eutrophus*, que mutaciones en los genes *phbH* y *phbI*, que codifican para los homólogos de las proteínas Hpr y la enzima I (EI), del sistema de fosfotransferasa de azúcares dependientes de fosfoenolpiruvato (PEP-PTS), provocan la disminución de PHB durante la fase estacionaria, después de que la fuente de carbono se ha agotado. Esto sugiere que la degradación de PHB es controlada por el sistema PTS [134].

1.8.3. Regulación de la biodegradación de los PHAs.

La degradación de PHAs se lleva a cabo durante limitaciones de carbono y en presencia de enzimas denominadas depolimerasas; posteriormente, los monómeros liberados favorecen la sobrevivencia. A pesar de la importancia de este tema, se conoce poco sobre la regulación de las depolimerasas. Se piensa que muchas de las bacterias que degradan PHA reprimen la expresión de los genes que codifican depolimerasas, y que al decaer los nutrientes, incrementa la transcripción de dichos genes [67]. En *R. eutropha*, se ha sugerido que las depolimerasas de PHA siempre están presentes, en forma activa, y que los PHA son sintetizados y degradados simultáneamente.

La diversidad de grupos taxonómicos productores PHAs, es un indicativo para pensar en la gran variabilidad de mecanismos reguladores existentes, incluyendo sistemas reguladores globales, requeridos para una eficiente acumulación de PHA en respuesta a señales intracelulares o medioambientales específicas. A pesar de esta información, se requieren de más estudios para aclarar y entender los procesos de síntesis, acumulación y movilización de PHA presentes en las diferentes especies.

1.9. *Azotobacter vinelandii*, como microorganismo hiperproductor de PHB.

1.9.1. Características generales de *A. vinelandii*.

La bacteria *Azotobacter vinelandii* que pertenece a la familia *Azotobacteraceae*, es una de las bacterias más estudiadas para la producción comercial de PHB. Esta bacteria Gram-negativa habita en el suelo, es aerobia estricta, fija nitrógeno y puede llegar a tener múltiples copias de cromosomas [116]. Tiene la capacidad de producir polímeros de importancia médica e industrial como el alginato y el PHB, exopolisacáridos, y también lípidos fenólicos que no son comunes en bacterias (alquilresorcinoles) [160, 179].

1.9.1.1. Células de *A. vinelandii*.

Las células vegetativas deste microorganismo son polimórficas y móviles por la presencia de flagelos peritricos cuando sufren division: presentan una forma típica de “cacahuete” (Figura 7). En microscopía de contraste de fase, las células miden de 1-2µm de ancho por 2-10 µm de largo; aproximadamente 10 veces el tamaño de *E. coli*. Si las condiciones externas son desfavorables, *A. vinelandii* es capaz de formar quistes inmóviles resistentes a la desecación [148, 168, 170]. La producción del alginato juega un papel fundamental en la estructura de las cubiertas externas de los quistes.



Figura 7. Células vegetativas de *Azotobacter vinelandii*.

1.9.1.2. Cepa UWD de *A. vinelandii*.

A lo largo de la historia, por el interés comercial de *A. vinelandii* en la producción de PHB, se han construido diferentes cepas hiperproductoras de este polímero. La cepa denominada *A. vinelandii* 113 produce grandes cantidades de alginato. En 1989 Page transformó la cepa *A. vinelandii* UW, que no produce alginato, con ADN de *Azotobacter vinelandii* 113 [118]. Como resultado, creó la cepa UWD afectada en la oxidación respiratoria de NADH: esta mutación permite la acumulación del cofactor (NADPH) fundamental en la síntesis de PHB [65, 119, 120]. Esto resulta en un fenotipo constitutivo e hiperproductor de PHB, llegando a niveles de 75% de su peso seco durante la fase exponencial. Recientemente, se ha reportado que la cepa *A. vinelandii* UW136 tiene un elemento de inserción en el gen *algU*, lo que puede explicar el fenotipo alginato menos en la cepa UW [100].

A. vinelandii puede crecer en una amplia variedad de carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos, y fuentes de carbono complejas no refinadas, como el jarabe de maíz [118]. Se ha reportado que este microorganismo puede utilizar otros sustratos no purificados o desechos agroindustriales y de procesadoras de alimentos, que disminuyen los costos de producción del PHB [133, 136].

A. vinelandii es capaz de formar un copolímero de importancia a nivel industrial, denominado poli (β -hidroxi-butirato-*co*- β -hidroxi-valerato) [P (β HB-*co*- β HV)], que se obtiene al suministrar valerato al medio de cultivo [133]. Tres β -cetotilasas han sido identificadas en *A. vinelandii*: únicamente PhbA y BktA han sido caracterizadas [159]. PhbA se encuentra involucrada en la síntesis de PHB y, posiblemente, BktA en la síntesis de precursores necesarios (β -cetovaleril-CoA) para la formación de polihidroxivalerato [P (β HV)], tal y como sucede en *R. eutropha* [167].

1.9.2. Papel fisiológico de PHB en *A. vinelandii*.

Avielandii acumula PHB de manera natural durante condiciones de limitación de nutrientes y, cuando disminuye la fuente de carbon, este polímero es degradado o movilizado por depolimerasas. Los monómeros liberados son utilizados como reserva de carbono y energía, favoreciendo la sobrevivencia de los microorganismos. Este polímero, aparte de ser un importante reservorio de carbón, cumple con otras funciones fisiológicas, entre otras: fijación de nitrógeno, regulación de equivalentes reductores, y diferenciación.

1.9.2.1. Fijación de nitrógeno.

A. vinelandii es una bacteria con capacidad de fijar nitrógeno, en presencia de oxígeno, sin formar asociaciones simbióticas con las plantas. Este proceso de fijación es sensible a oxígeno en condiciones de crecimiento aerobias, que puede llevarse a cabo gracias a la existencia de dos mecanismos que permiten proteger a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno [147]. El primer mecanismo es el denominado protección respiratoria, y el segundo protección conformacional [112, 164]. En este fenómeno, el PHB provee a la célula de una fuente de energía y de carbono rápidamente oxidable, facilitando el mantenimiento de una tasa respiratoria adecuada en la disminución de la concentración de oxígeno, contribuyendo a la protección de la nitrogenasa [147, 164].

1.9.2.2. Regulación de equivalentes de reductores.

Se ha propuesto que el PHB sea el regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. La acumulación de agentes reductores (NADH y NADPH) es favorecida en presencia de fuente de carbono y concentraciones bajas de oxígeno (Figura 6). Estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs en *A. vinelandii* y estimulan la síntesis del polímero [96, 163, 165]. La biosíntesis de PHB puede regular, de esta forma, la concentración de los equivalentes de reducción, almacenando electrones y evitando la acumulación de NADPH. Esto favorece el funcionamiento de las vías metabólicas oxidativas, aún en concentración de oxígeno intracelular bajas [163, 164].

1.9.2.3. *Diferenciación.*

Stevenson y Socolofsky, en 1966, propusieron que el PHB sintetizado en *A. vinelandii* estaba involucrado en la diferenciación de quistes, y observaron una correlación directa entre la cantidad de polímero acumulado en etapas previas al enquistamiento y el porcentaje de quistes formados en un cultivo [170]. En esta etapa del cultivo, el contenido de PHB disminuye, gradualmente, al avanzar la maduración de los quistes formándose las cubiertas del mismo. Pero en el año 2003, Segura y colaboradores demuestran que una mutación en *phbB* y *phbC* no impide la capacidad de formar quistes maduros [160]. Proponiendo que el incremento de Acetil-CoA y poder reductor, en esas mutantes, inducen la síntesis de alquilresorcinoles y la formación de quistes. En el caso de algunas especies del género *Bacillus*, el PHB sirve como fuente de carbono y energía para la formación de esporas [4].

1.9.2.4. *Otros.*

Se ha demostrado, en otras bacterias, que el PHB acumulado puede retardar la degradación de algunos componentes celulares, como RNA y proteínas, y aumentar la sobrevivencia del microorganismo bajo condiciones adversas [4]. Por último, este polímero también se ha encontrado formando complejos helicoidales con iones calcio y moléculas de polifosfato en las membranas bacterianas, aunque, cabe aclarar, que se trata de un PHB de menor peso molecular (14,000) [91, 141]. Se propone que esos complejos transmembranales sirven para transportar calcio, fosfato y ADN.

Capítulo 2.

Antecedentes

2.1. Posible papel del activador PhbR, sobre la transcripción del operón *phbBAC* de *A. vinelandii*.

Por el interés particular de nuestro laboratorio en el estudio de la regulación genética de la síntesis de PHB, en *A. vinelandii*, se logró caracterizar el operón biosintético *phbBAC*, constituido por la β -cetotilasa (PhbA), acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhbB), y PHB sintasa (PhbC) [160]. Separado por 512 pares de bases, en dirección divergente a este operón, se encuentra *phbR*, que codifica para un activador transcripcional (Figura 4a). En esa misma dirección se encuentra *phaP*, cuyo producto tiene identidad con proteínas asociadas a los gránulos de PHB, denominadas fasinas. En dirección contraria, a este gen, se encuentra *phaF*, homólogo a *phaR* de *P. denitrificans* y *R. eutropha* que codifican un represor de los genes *pha* [160] (Figura 4a). El orden genético del operón *phbBAC*, es el mismo que se ha encontrado en las cepas de *Azotobacter* FA8 y *Pseudomonas* 61-3 [103, 127]; a diferencia del operón biosintético de *R. eutropha*, *A. latus*, *B. cepacia* y *Acinetobacter* sp. RA3839 (Figura 4).

PhbR_{AV} pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, y solamente se han logrado identificar algunos homólogos en las cepas de *Azotobacter*. FA8 y *Pseudomonas* 61-3, con una identidad de 83% y 45%, respectivamente [103, 128]. Matsusaki en 1988 propuso el carácter regulador del activador PhbR, sobre la transcripción del operón *phbBAC* de *Pseudomonas* 61-3 [103], en este sentido una mutación en el gen *phbR* de *A. vinelandii* reduce de manera significativa la producción de PHB [122]. Muchos miembros de la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS se unen a secuencias específicas de 18 a 20 pares de bases [30, 35, 37], pueden formar dímeros y algunos activan la transcripción al sobreponerse en la región -35 de los promotores [11, 13, 36]. El dominio carboxilo terminal consta aproximadamente, de 100 aminoácidos, y se ha predicho que tiene dos motivos hélice-vuelta-hélice de reconocimiento al ADN. Otros activadores, de esta familia, como AraC y MelR, se transcriben en forma divergente al operón biosintético correspondiente, *araBAD* y *melAB*, reconociendo cinco sitios de unión en el ADN, y dependiendo de los sitios a los que se unan activan la transcripción o la reprimen mediante la formación de un asa [61, 69, 90]. Podemos mencionar el modelo de arabinosa y melobiosa como ejemplo de este sistema de activación-represión.

2.2. Sistema de dos componentes GacS/GacA.

Las bacterias perciben las condiciones medioambientales usando una gran variedad de sistemas. Entre los más comunes, se encuentran los sistemas de dos componentes, correspondientes a la transducción de señales [10, 54, 171]. En nuestro laboratorio se ha demostrado la relación entre el sistema global de dos componentes GacS/GacA, con la acumulación de polímeros como el PHB y alginato en *A. vinelandii* [135]. Este sistema de regulación global está formado por una proteína detectora transmembranal (GacS), que pertenece a la familia de las cinasas-histidínicas [124, 149, 196], y el regulador de respuesta citoplasmático (GacA), que por lo general, es un activador transcripcional que pertenece a la familia FixJ [92, 110, 135].

2.2.1. *Cinasa Histidínica (GacS).*

GacS pertenece a la clase de cinasas-histidínicas no ortodoxas, que incluye detectores como el factor de virulencia BvgS (*Bordetella pertussis*), y ArcB que controla el metabolismo aeróbico (*E. coli*). Alineamientos realizados con homólogos del detector GacS, demuestran que en el amino terminal, se localizan dos segmentos transmembranales (cajas negras) separados por una asa periplásmica. Esta región se conoce como dominio de entrada y está involucrada en la detección de señales medioambientales (Figura 8). En la región citoplasmática adyacente al segundo segmento transmembranal, se localizan dos secuencias anfipáticas (cajas blancas), encargadas de unir al dominio de entrada con la región transmisora. En la región transmisora, una histidina autofosforilable (H1) transfiere el grupo fosforil (P) a un residuo aspártico (D); éste a su vez fosforila a una segunda histidina (H2). Posteriormente, este sistema de fosfotransferencia (H1-D-H2) transporta el grupo fosforil a un residuo aspártico del regulador de respuesta GacA (Figura 8) [44, 51, 124].

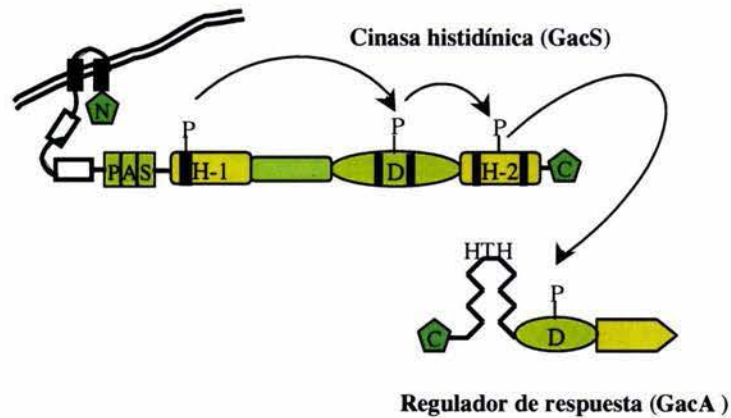


Figura 8. Modelo de transducción de señales mediada por el sistema de dos componentes GacS/GacA. Al autofosforilarse el sensor GacS, transfiere un grupo fosforilado de alta energía, mediante el sistema de fosfotransferencia H1-D-H2, al dominio receptor del regulador de respuesta GacA. N y C se refieren al amino y carboxilo terminal, respectivamente; HTH, representa el motivo hélice-vuelta-hélice del regulador de respuesta. Un posible dominio PAS se encuentra representado en la figura.

Sahu y colaboradores demostraron en *E. coli* que BarA, un homólogo de GacS, presenta un dominio denominado PAS; el cual también se sabe que los detectores BvgS y ArcB lo conservan [149]. Los dominios PAS (Per-Arnt-Sim) son intracelulares y de suma importancia pueden monitorear señales externas e internas, funcionan como módulos de entrada en proteínas que perciben oxígeno, potenciales redox, luz y algunos otros estímulos [149, 175]. Los estímulos medioambientales modulan el flujo de equivalentes reductores a través del sistema transportador de electrones. Los dominios PAS se encuentran casi exclusivamente en el dominio de entrada de la proteína detectora de los sistemas de dos componentes, como ArcB (*E. coli*), BvgS (*Bordetella*), NilfL (*A. vinelandii*), etc. [175].

2.2.2. Regulador de respuesta (*GacA*).

En los reguladores de respuesta o segundos componentes (*GacA*), el dominio de fosforilación se encuentra en un residuo aspártico (D) del extremo amino terminal (N). En el carboxilo terminal (C) se encuentra el dominio de salida, al igual que otros reguladores de respuesta, presentan un motivo hélice-vuelta-hélice involucrado en la unión a ADN. Como se puede observar en la figura 8, la defosforilación e inactivación del sistema *GacS/GacA* va acompañada de una vía similar pero inversa, terminando en la liberación de fosfato inorgánico en el citoplasma, tal y como se presenta en sistemas homólogos *ArcAB* y *BvgAS* [38, 44, 51, 101, 124].

2.2.3. Homólogos del sistema *GacS-GacA* y función.

En general este sistema de dos componentes está distribuido ampliamente en bacterias Gram-negativas. Se encuentra involucrado en la adaptación de los microorganismos para colonizar nichos ecológicos específicos, en respuesta a diversas señales medioambientales. Actualmente se han logrado identificar más de 20 homólogos del sistema *GacS/GacA*, en bacterias patógenas de plantas y animales, en bacterias entéricas y de vida libre, entre otras: *P. aureofaciens* (*LemA/GacA*) [20], *P. fluorescens* (*GacS/GacA*) [29], *P. tolaasii* (*PheN*) [42], *P. syringae* (*LemA/GacA*) [143], *Erwinia carotovora* (*ExpS/ExpA*) [32], *Pseudomonas aeruginosa* (*GacS/GacA*) [121], *Vibrio cholerae* (*VarA*) [188], *Salmonella thyphimurium* (*BarA/SirA*) [100], *Escherichia coli* (*BarA/UvrY*) [124, 149], *Legionella pneumophila* (*LetA/LetS*) [46], *A. vinelandii* (*GacA/GacS*) [17, 18], etc.

Las señales que detectan estos sistemas pueden ser abióticas (pH, temperatura, osmolaridad) o bióticas, algunas de ellas, son producidas por el hospedero, y otras son sintetizadas por las mismas poblaciones de bacterias [149]. Se ha encontrado que mutaciones en este sistema afectan la expresión de múltiples factores de virulencia [121] y factores secundarios, entre las que se encuentran: una amplia variedad de exoproteasas [27, 51, 143], polímeros [17, 18], antibióticos [51], homoserín lactonas [20, 140], movilidad [21, 39, 75, 125, 149], niveles del factor σ^S (*RpoS*) de fase estacionaria [18, 21, 113, 149, 184], amplia variedad de metabolitos [25, 51, 126, 154] y controla además, sistemas de regulación globales postraduccionales (*rsmB-rsmA*) que afectan la expresión de genes en fase estacionaria [1, 21, 27, 52, 63].

No se conocen secuencias de unión al ADN en los genes que son regulados por GacA, a pesar de ser un sistema de regulación global: esto asume el posible efecto indirecto del sistema GacS/GacA sobre los genes. Se ha propuesto que el factor σ^S de fase estacionaria sea uno de los intermediarios entre el sistema de dos componentes y los genes de virulencia, pues se conoce que σ^S controla la expresión de múltiples genes de virulencia en fase estacionaria en diversos microorganismos [6, 151, 173].

Por otro lado, se ha demostrado que mutaciones en el sistema GacS/GacA disminuyen la expresión de *rpoS* en organismos como *E. coli* [12, 113, 172, 180], *Legionella pneumophila* [46], *P. chloraphis* [74, 155], *P. fluorescens* Pf-5 [180], y *A. vinelandii* [18]. RpoS o σ^S , aumenta su expresión durante la fase estacionaria y es una subunidad de la ARN polimerasa que puede reemplazar, parcialmente, el factor vegetativo σ^{70} , bajo condiciones de limitación de carbono, nitrógeno, fosfatos, osmolaridad, temperatura, pH, alta densidad celular, etc. [56].

Capítulo 3

En la actualidad, el PHB es un polímero de gran importancia para la elaboración de compuestos biodegradables a nivel industrial. Por esta razón, deseamos conocer más acerca de la regulación genética y la biosíntesis del polihidroxiбутirato en *A. vinelandii*. Creemos que es fundamental determinar la relación existente entre el regulador global de respuesta GacA y los genes biosintéticos de polihidroxiбутirato, sin descartar posibles genes intermediarios; así como esclarecer el papel regulador del activador PhbR sobre la transcripción del operón *phbBAC*. Por esta razón, proponemos los siguientes objetivos:

Objetivos generales.

Estudiar el efecto del regulador global de respuesta GacA, sobre la transcripción de la región intergénica *phbR-phbBAC* en *A. vinelandii*.

Estudiar el mecanismo de acción del activador transcripcional PhbR sobre el operón biosintético *phbBAC* en *A. vinelandii*.

Objetivos particulares.

Para la realización de los objetivos generales, se definieron los siguientes objetivos particulares.

1. Introducir las mutaciones *phbR*, *rpoS* y *gacA* en la cepa hiperproductora de PHB, UW136, y analizar su efecto sobre la transcripción del locus *phbR* y *phbBAC*, así como sobre la acumulación de PHB.
2. Caracterizar los posibles promotores del operón biosintético *phbBAC* y del activador transcripcional divergente *phbR*.
3. Determinar el efecto de las mutaciones *phbR*, *rpoS* y *gacA* sobre los inicios de transcripción y la actividad de sus promotores.

Capítulo 4

Resultados

Trabajos previos en nuestro laboratorio, en la cepa hiperproductora de alginato ATCC9046, indican que mutaciones en los genes reguladores *gacS*, *gacA* [17, 19], afectan de manera negativa la síntesis de PHB y la transcripción del gene *rpoS* que codifica para la subunidad sigma S de la RNA polimerasa (σ^S). También, la mutación del gen *phbR* reduce la producción de PHB [26]. Con la finalidad de estudiar el efecto de los reguladores codificados por los genes *gacA*, *rpoS* y *phbR* sobre la síntesis de PHB y sobre la transcripción del operón biosintético, se construyó por genética reversa una colección de mutantes derivadas de la cepa UW136, que se enlista en la Tabla I. Los detalles de la construcción de estas mutantes se describen en la sección de materiales y métodos del artículo. En la tabla I también se enlistan cepas que se utilizaron en este trabajo, previamente construidas en el laboratorio.

La acumulación de PHB, en la cepa silvestre UW136 de *A. vinelandii*, produce un fenotipo blanco opaco, cuando se crece en placas con medio rico PY suplementado con 2% de sacarosa. Las mutaciones que disminuyen la síntesis de PHB producen un fenotipo menos opaco [158]. Como se esperaba, las derivadas de la cepa UW136 con mutaciones en los genes *gacA*, *rpoS* y *phbR*, muestran un fenotipo menos opaco que la cepa parental UW136 (Figura 9). Este fenómeno de opacidad no se observa en la cepa hiperproductora de alginato ATCC9046.



Figura 9. Acumulación de PHB (opacidad) en las cepas UW136, JGW-G (*gacA*), JGW-R (*phbR*) y JGW-S (*rpoS*).

4.1. Cinética de la producción de PHB en cepas con mutaciones en los genes *gacA*, *rpoS* y *phbR*.

En la figura 10 se ilustran los resultados de la acumulación de PHB de las cepas con mutaciones en los genes *gacA*, *rpoS* y *phbR* comparadas con la cepa parental UW136 durante el crecimiento en medio líquido PY suplementado con 2% de sacarosa.

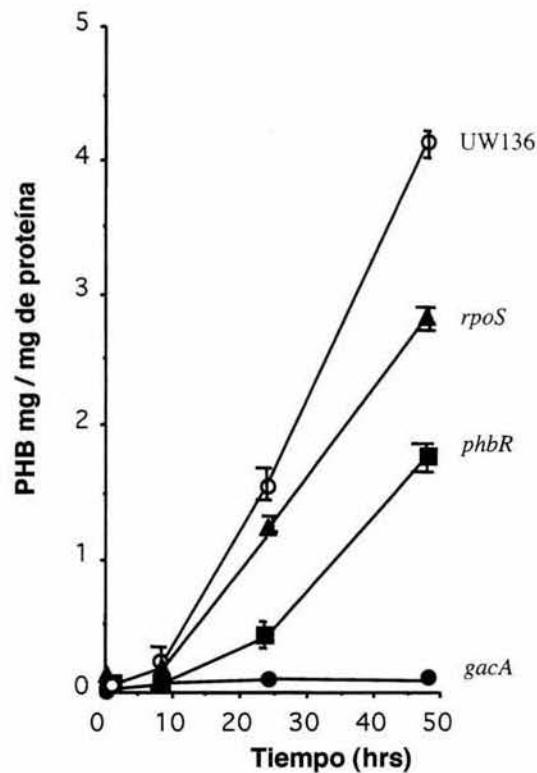


Figura 10. Efecto de las mutaciones *gacA* (JGW-G), *phbR* (JGW-R) y *rpoS* (JGW-S), sobre la producción de PHB ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína), bajo el fondo genético de la cepa hiperproductora UW136 de *Azotobacter vinelandii*, crecida en medio rico PY suplementado con 2% sacarosa.

Los resultados confirman que las tres mutaciones analizadas (*gacA*, *rpoS* y *phbR*), afectan de manera negativa la acumulación de PHB. La mutación en el gen *phbR*, muestra una disminución de alrededor del 50% en la producción del polímero. El efecto más drástico se observó al mutar el gen que codifica para el regulador global de respuesta GacA, ya que abate casi en su totalidad la producción de PHB. Resulta interesante, observar, que la mutación en *rpoS* sólo disminuye la producción de PHB en aproximadamente 30%. Como se mencionó en la introducción, la transcripción

Las cepas y plásmidos usados en este trabajo se describen en la tabla I.

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>A. vinelandii.</i>		
UW136	Silvestre, hiperproductora de PHB	
DS268	UW136 con <i>phbR::mini-Tn5</i>	Este trabajo
AJ2	UW136 con <i>phbB'-lacZ</i>	26
AJ2-R	<i>phbR'-gusA::Gm, phbB'-lacZ</i>	Este trabajo
JG-S	<i>rpoS::Sp, phbB'-lacZ</i>	Este trabajo
JG-G	<i>gacA::ΩGm, phbB'-lacZ</i>	Este trabajo
JGW-R	<i>phbR'-gusA::Gm</i>	Este trabajo
JGW-RS	<i>rpoS::Sp, phbR'-gusA::Gm</i>	Este trabajo
JGW-RG	<i>gacA::Km, phbR'-gusA::Gm</i>	Este trabajo
JGW-G	<i>gacA::ΩGm</i>	Este trabajo
JGW-S	<i>rpoS::Sp</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>SupE44, lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, rel1</i>	Gibco BRL
Plásmidos		
pBluescript KS (+)	Vector de clonación	Stratagene
pUT/miniTn5lacZ2Km	Plásmido con miniTn5lacZ	28
pBSL97	Derivado de sBSL97 con Km	3
pBSL98	Derivado de sBSL98 con Km	3
pCAM140		186
pMP01	Derivado de pBSL97 con <i>Sp-gusA</i>	Este trabajo
pSM-Gus-Gm	Derivado de pMP01 con <i>gusA::Gm</i>	Este trabajo
pTC2P	Derivado de pBluescript KS (+) con <i>phbR</i>	Este trabajo
pSMR4	Derivado de pTC2P con <i>phbR'-gusA::Gm</i>	Este trabajo
pSMR7	Derivado de pCNS59 con <i>rpoS::Sp</i>	18
pSAFA3	Derivado del pKT230, contiene el gen <i>gacA</i> y su posible región promotora	18
pJOG	Derivado de pSAFA3 con <i>gacA::Km</i>	Este trabajo

del gene *rpoS* no se detecta en cepas *gacA*⁻, este resultado sugiere que el control de GacA sobre la síntesis de PHB se da mayoritariamente por una vía diferente a σ^S .

4.2. Efecto de los reguladores GacA, RpoS y PhbR sobre la transcripción del operón *phbBAC*.

Con el objeto de estudiar la transcripción del operón biosintético *phbBAC*, se determinó la actividad de β -galactosidasa durante el crecimiento en PY sacarosa de la cepa AJ2, (derivada de la cepa UW136 que contiene una fusión transcripcional *phbB'*-*lacZ*) [26]. Estos resultados muestran que la expresión de *phbB* incrementa durante la fase exponencial y llega a su máximo nivel en la fase estacionaria (Figura 11).

Para determinar el efecto de los reguladores GacA, RpoS y PhbR, sobre la transcripción del operón *phbBAC* se construyeron mutantes dobles, que llevan la fusión transcripcional *phbB'*-*lacZ* más la mutación en cada uno de estos reguladores. La actividad de β -galactosidasa de estas cepas JG-G (*gacA*:: Ω Gm, *phbB'*-*lacZ*), AJ2-R (*phbR'*-*gusA*::Gm, *phbB'*-*lacZ*) y JG-S (*rpoS*::Sp, *phbB'*-*lacZ*) se muestra en la figura 11b, y como se puede observar, se afecta la transcripción del operón *phbBAC*. El efecto de la mutación en el regulador global GacA (JG-G) abate casi en su totalidad la actividad de β -galactosidasa, mientras que la mutación sobre el activador transcripcional PhbR (AJ2-R) reduce, significativamente, la actividad. Finalmente, el efecto de una mutación sobre el factor alternativo σ^S (JG-S) disminuye considerablemente la actividad de β -galactosidasa. La reducción de la transcripción de *phbBAC* así como la acumulación de PHB observadas en las tres mutantes, fundamentan la hipótesis del papel que juegan los reguladores analizados sobre la transcripción del operón. Estos resultados muestran una correlación, aunque no cuantitativa, sí cualitativa entre el efecto de las mutaciones y la transcripción de *phbBCA*.

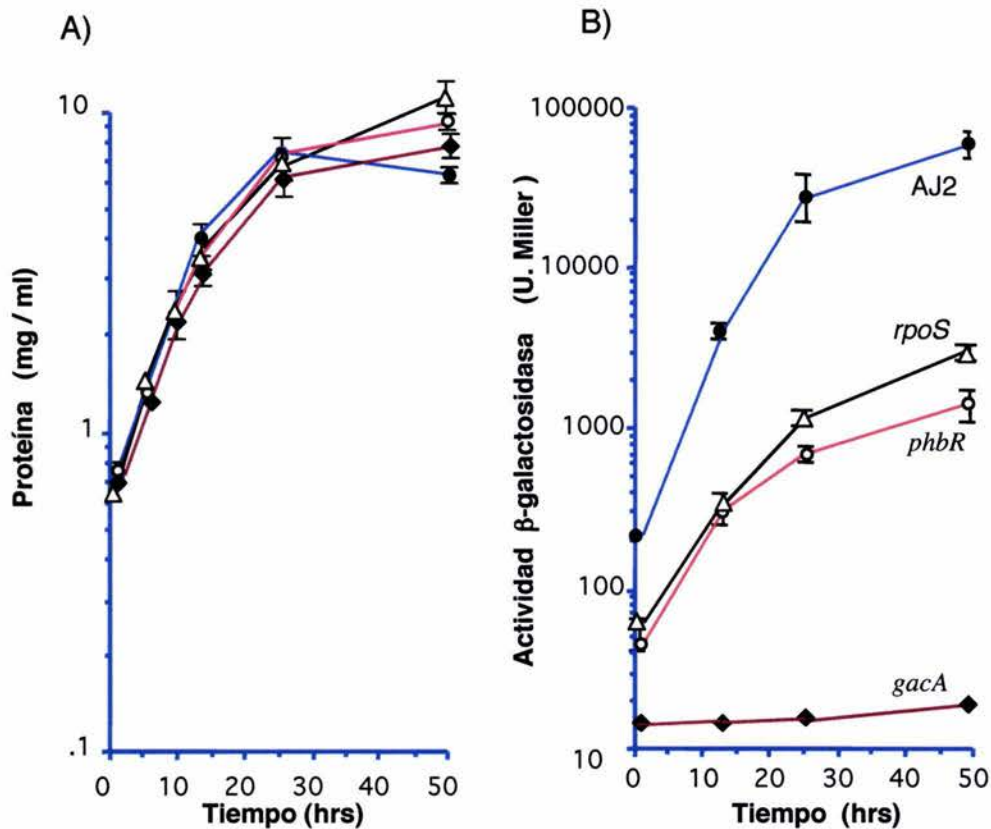


Figura 11. a) Curva de crecimiento. b) Actividad β -galactosidasa (U. Miller) en las cepas AJ2 (*phbB'*-*lacZ*, ●), JG-G (*gacA*:: Ω Gm, *phbB'*-*lacZ*, ◆), JG-S (*rpoS*::Sp, *phbB'*-*lacZ*, ρ) y AJ2R (*phbR'*-*gusA*: :Gm, *phbB'*-*lacZ*, ○).

4.3. Efecto de los reguladores GacA y PhbR sobre la transcripción de *phbR*.

Se estudió también en este trabajo, la transcripción del gen *phbR*. Para lo cual se construyó una fusión transcripcional *phbR'*-*gusA*, como se describe en la sección de materiales y métodos del artículo. En la figura 12b se muestra la cinética de actividad de β -glucuronidasa en la cepa JGW-R, una derivada de la cepa UW136 que lleva fusión transcripcional *phbR'*-*gusA*::Gm. Similar a los resultados de *phbB*, la transcripción de *phbR* inicia durante la fase exponencial y e incrementa en fase estacionaria. Se analizó también el efecto de las mutaciones en *gacA* y en *rpoS* sobre la cinética de transcripción de *phbR*, observándose que la actividad de β -glucuronidasa disminuye de manera similar en las mutantes *rpoS* (JGW-RS) y *gacA* (JG-RG) (Figura 12b).

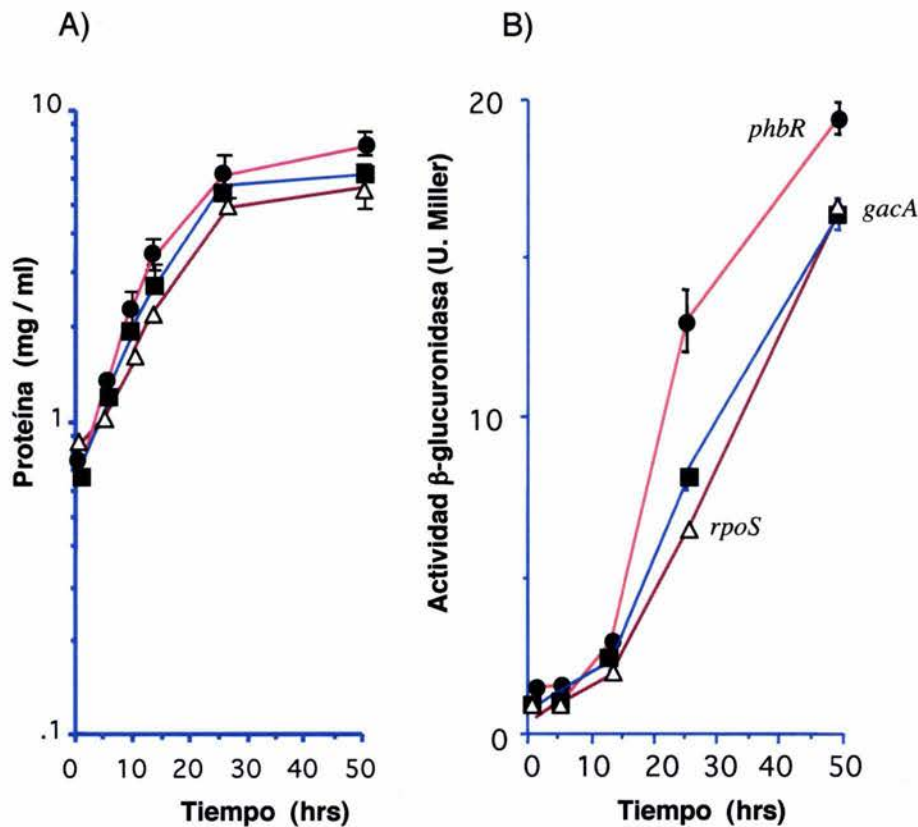


Figura 12. Efecto de las mutaciones *gacA* y *rpoS*, sobre la transcripción de *phbR* utilizando una fusión génica *phbR*'-'*gusA*::Gm. JGW-R (*phbR*'-'*gusA*::Gm, ●), JGW-RG (*gacA*::Km, *phbR*'-'*gusA*::Gm ■), y JGW-RS (*rpoS*::Sp, *phbR*'-'*gusA*::Gm, Δ). Actividad de β -glucuronidasa (Unidades Miller).

4.4. Mapeo de los inicios de transcripción del operón *phbBAC*.

Para identificar él o los sitios de inicio de la transcripción del operón *phbBAC*, se realizaron experimentos de mapeo con nucleasa S1. Se aisló RNA total de células de la cepa silvestre UW136 en fase de crecimiento exponencial (8 h), al inicio de la fase estacionaria (24 hrs) y fase estacionaria (48, 62 hrs) (Figura 13). Para identificar el sitio de inicio de la transcripción, se diseñó una sonda y se amplificó un PCR como se describe en materiales y métodos.

Como se aprecia en la figura 13, se identificaron dos inicios de transcripción (pB1 y pB2), los cuales se localizan a 92 y 115 nucleótidos, respectivamente, del codón de inicio de *phbBAC*. Las intensidades de las señales correspondientes a los inicios detectados, pB1 y pB2, indican que su expresión incrementa durante la fase estacionaria (48 y 62 hrs). También muestran que pB1 es más fuerte, en comparación a pB2, a lo largo de la cinética de crecimiento. El efecto de las mutaciones *phbR*, *gacA* y *rpoS* sobre la transcripción, a partir de estos sitios, se indica en la figura 14.

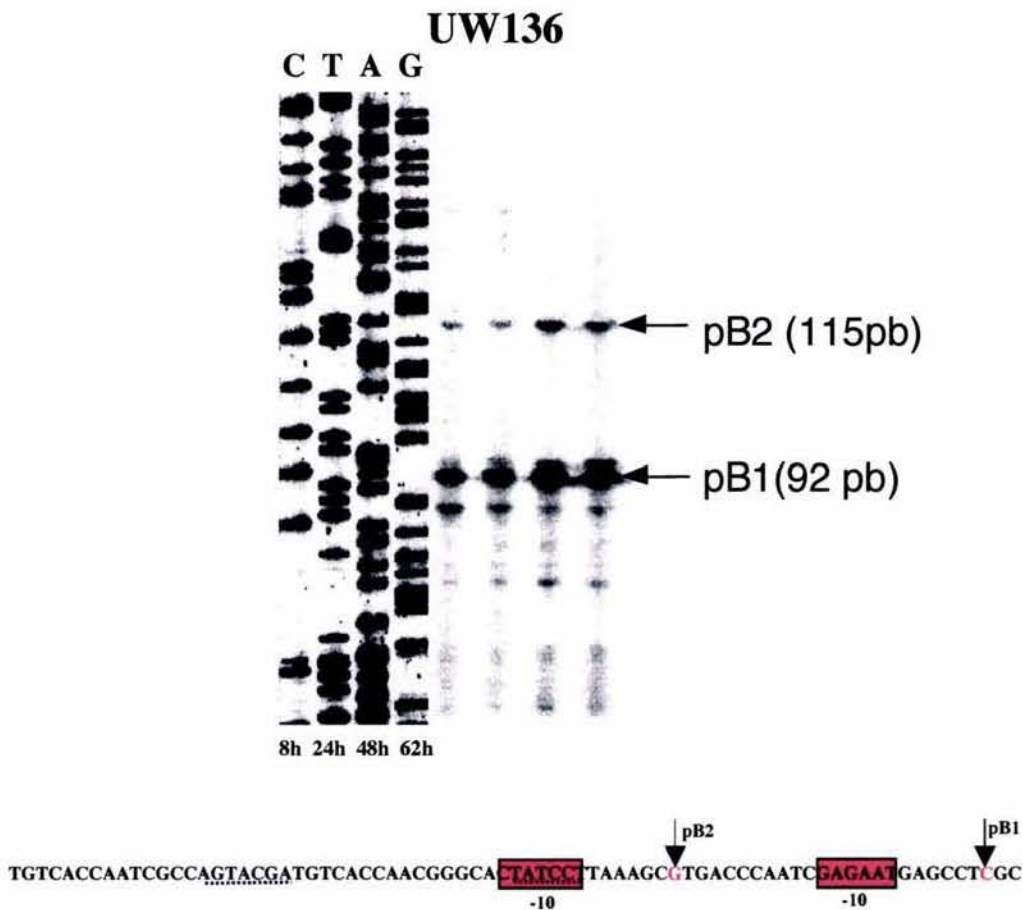


Figura 13. Mapeo de los inicios de transcripción del operón *phbBAC*. Los ensayos de mapeo con nucleasa S1 se realizaron con muestras de ARN tomadas de la cepa UW136 y la cinética se llevo a cabo con muestras de ARN tomadas durante la fase exponencial (8hrs y 24hrs) y la fase estacionaria (48 hrs y 62hrs). Los inicios de transcripción identificados, pB1 y pB2, se localizan a una distancia de 92 y 115 nucleótidos del ATG, respectivamente. En la secuencia nucleotídica se encuentran representados los hexámeros -10 (cajas) y -35 (líneas punteadas) de los promotores pB1 y pB2 (flechas verticales).

PhbR es un activador transcripcional aparentemente involucrado en la regulación de la producción de PHB en *A. vinelandii*. En la figura 14 analizamos el efecto de una mutación *phbR*'-'*gusA*::Gm (JGW-R) sobre la transcripción del operón *phbBAC* a partir de sus dos promotores. Los transcritos correspondientes a los promotores pB1 y pB2 fueron claramente detectados en la mutante JGW-R. El nivel de transcripción de pB1 fue significativamente reducido mientras que el nivel del transcrito de pB2 se incrementó en fase estacionaria, indicando que PhbR posiblemente activa la transcripción de pB1 y reprime de manera parcial el promotor pB2. Es posible que en la mutante JGW-R, la RNA polimerasa exhiba una mayor eficiencia en la iniciación de pB2 al no estar presente el activador PhbR. De acuerdo con el fenotipo *phbR* sobre la producción de PHB, la transcripción de *phbBAC* no es totalmente dependiente de PhbR.

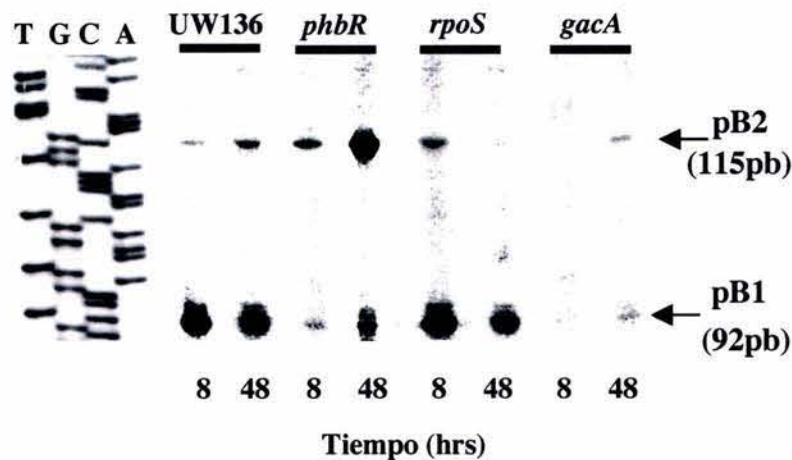


Figura 14. Análisis por mapeo con exonucleasa S1, de los inicios de transcripción del operón *phbBAC*, en las cepas UW136 (cepa silvestre), JGW-R (*phbR*), JGW-S (*rpoS*) y JGW-G (*gacA*). Las muestras de ARN analizadas corresponden a la fase exponencial (8hrs) y la fase estacionaria (48 hrs). Los inicios de transcripción, pB1 y pB2, se localizan a una distancia de 92 y 115 nucleótidos del codón de inicio, respectivamente. En la secuencia nucleotídica se encuentran representados los hexámeros -10 (cajas) y -35 (líneas punteadas) de los promotores pB1, pB2 (flechas verticales) y los posibles sitios de unión al activador transcripcional PhbR (óvalos).

El efecto de una mutante *rpoS* (JGW-S) sobre la transcripción de *phbBAC*, muestra que el transcrito correspondiente a pB2 esta muy disminuido durante la fase estacionaria (48hrs), en contraste a la cepa silvestre (UW136). Sin embargo, en la fase de crecimiento exponencial (8hrs), se detecta transcripción a partir de los dos promotores. El aumento en la transcripción a partir de pB2 durante la fase exponencial en la mutante *rpoS* es difícil de explicar: podría deberse a una disminución en la transcripción del gen *phbR* en la cepa JGW-R, provocando un efecto positivo sobre pB2 (Figura 14). En ésta se puede observar que una mutante *gacA* (JGW-G) abate casi por completo la transcripción a partir de pB1 y pB2.

4.5. Mapeo de los inicios de transcripción de *phbR*.

Mediante experimentos de mapeo con nucleasa S1, en las cepas UW136, JGW-R (*phbR*'-'*gusA*::Gm), JG-RG (*phbR*'-'*gusA*::Gm, *gacA*::km) y JGW-SR (*rpoS*::Sp, *phbR*'-'*gusA*::Gm) identificamos también los sitios de inicio de transcripción del gen *phbR*. En la cepa silvestre UW136, un solo inicio de transcripción se observó en la fase exponencial (8 hrs) y, durante la fase estacionaria, dos inicios de transcripción fueron revelados, localizados a 61 (pR1) y 139 (pR2) nucleótidos del codón de inicio ATG, respectivamente, mostrando que la mayor expresión de *phbR* se da en la fase estacionaria y posiblemente en condiciones de estrés (Figura 15).

En las mutantes *rpoS* y *gacA* no se detecta transcripción a partir del promotor pR2 en la fase estacionaria (48hrs), lo que indica que está regulado de manera positiva por RpoS y GacA. En el análisis de los promotores correspondientes, no se encontró ninguna secuencia consenso en la region -10 de pR2 que sea reconocida por σ^S (CTACT), sugiriendo que la transcripción de pR2 pudiera estar bajo el control de σ^S de manera indirecta (Figura 15).

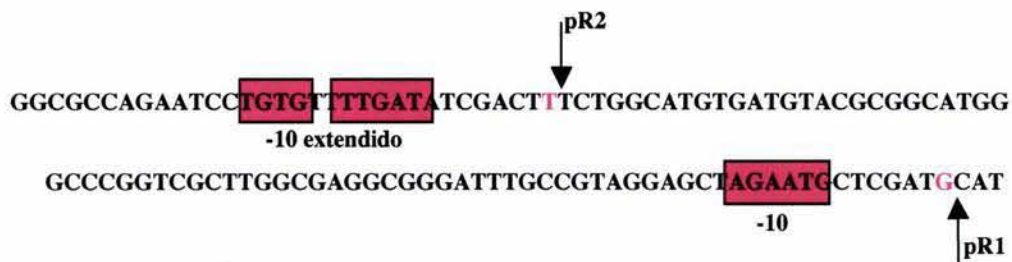
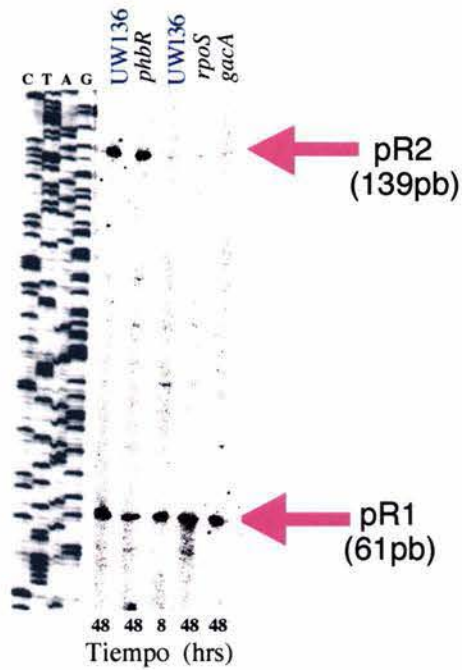
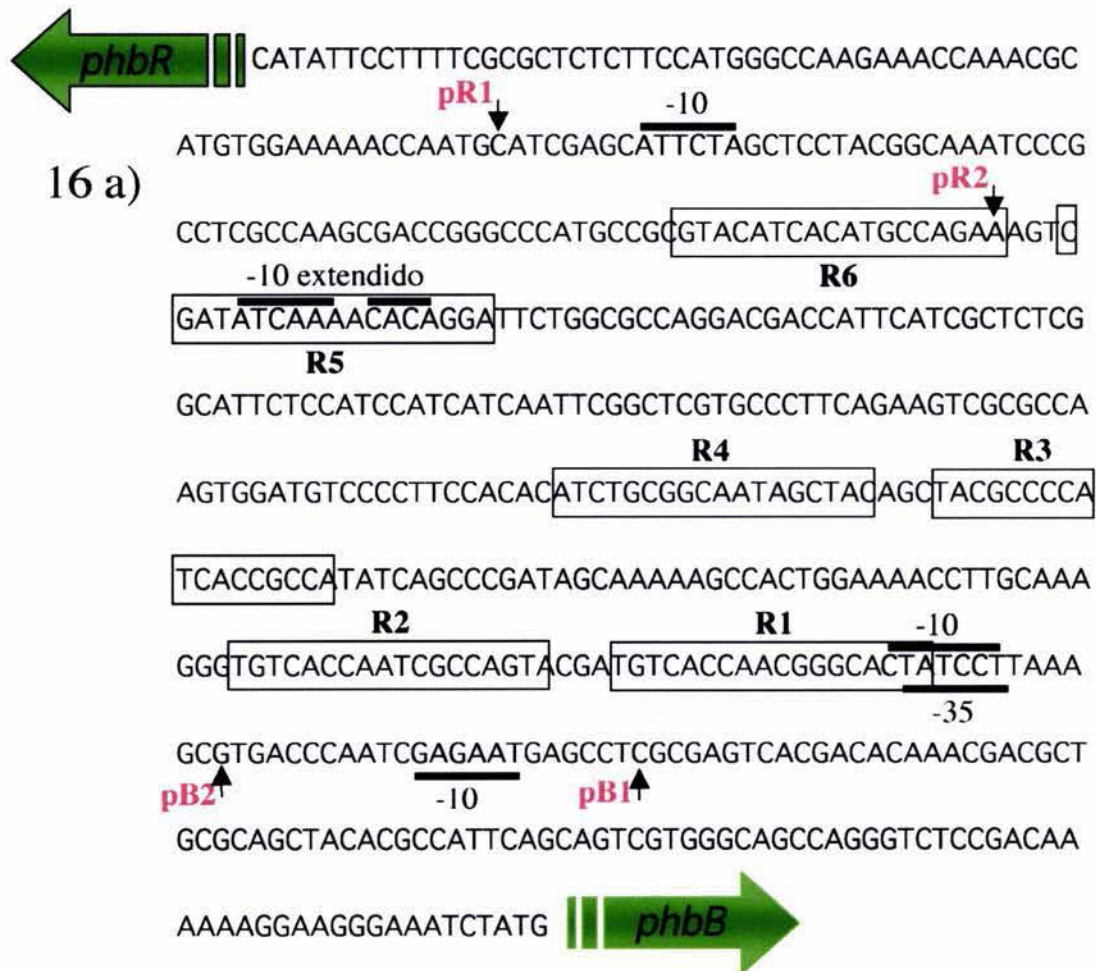


Figura 15. Análisis mediante mapeo con nucleasa S1 de la región 5' del gene *phbR* en las cepas UW136 (cepa silvestre), JGW-R (*phbR*), JGW-S (*rpoS*) y JGW-G (*gacA*). Las muestras de ARN analizadas corresponden a la fase exponencial (8hrs) y la fase estacionaria (48 hrs). Los inicios de transcripción, pR1 y pR2, se localizan a una distancia de 61 y 139 nucleótidos del codón de inicio, respectivamente. En la secuencia nucleotídica se encuentran representados los hexámeros -10 (cajas) de los promotores pR1, pR2 (flechas verticales).

4.6. Posibles sitios de unión de PhbR.

El análisis de la región intergénica *phbR-phbB* revela dos secuencias idénticas de 18 pares de bases, centradas en las posiciones -42.5pb y -63.5pb hacia arriba del promotor pB1 (5'TGTCACCAAnnnnCANTA 3'). Dado que estos sitios de unión presentan características similares a las regiones reconocidas de los activadores transcripcionales de la familia AraC, es probable que sean sitios de unión a PhbR, designados como R1 y R2 (Figura 16a). Sitios similares están presentes en la región intergénica *phbR-phbB* de *Pseudomonas* sp. 61-3 (número de acceso AB014757) y de *Azotobacter* FA8 (Figura 16b). Un escrutinio sobre esta región intergénica en *A. vinelandii* revela otros cuatro posibles sitios de 18 pares de bases, menos conservados, los cuales nombramos R3 (-126.5), R4 (-146.5), R5 (-269.5) y R6 (-290.5) (Figura 16a).

De acuerdo a la posición de los posibles sitios de unión a PhbR este activador podría estar controlando la expresión de los promotores del operón *phbBAC*. Los sitios R1 y R2 se encuentran separados entre sí por 3 nucleótidos el sitio R1 robrepone la región -35 de pB1, mientras que R1 y R2 robrepone completamente el promotor pB2 (Figura 16a). Esta robreposición puede explicar porqué la expresión de pB2 es menor que pB1 en la cepa silvestre UW136 (Figura 13, 14) y se podría inferir que PhbR incrementa la transcripción de pB1 al robrepone la región -35 del promotor y al hacer contactos con el factor sigma correspondiente (Figura 16a). Con estas evidencias se explica, también, que la expresión de los promotores pB1 y pB2 se inviertan en la mutante *phbR* (Figura 14). Otro posible sitio de unión a PhbR menos conservado (R5), robrepone la región -10 del promotor pR2; esto puede sugerir la posibilidad que PhbR se autorregule.



16 b)

TGTCACCgAGGGCACTA	R1	<i>Azotobacter</i> FA8	(84%)

TGTCACCAACGGGCACTA	R1	<i>A. vinelandii</i>	(100%)
***** * * * * *			
TGTCACCgATGGACACgA	R1	<i>Pseudomonas</i> 61-3	(74%)
cGTCACCgATAGCCAGcA	R2	<i>Azotobacter</i> FA8	(74%)
***** * * * * *			
TGTCACCAATCGCCAGTA	R2	<i>A. vinelandii</i>	(100%)
***** * * * *			
cGTCACCtACAAACACTt	R2	<i>Pseudomonas</i> 61-3	(53%)

Figura 16. a) Región intergénica *phbR-phbB*. Los inicios de transcripción están representados por flechas verticales (pB1, pB2, pR1, pR2) y los posibles hexámeros -10 y -35 están subrayados. Seis posibles sitios de unión al activador transcripcional PhbR se encuentran representados por rectángulos. b) Comparación entre las posibles regiones R1 y R2 de *A. vinelandii*, *Azotobacter* FA8 y *Pseudomonas* 61-3. Los parentesis de la derecha representan los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas, tomando como base las secuencias de *A. vinelandii*.

4.7. Comparación de la estructura primaria de las proteínas RpoD y RpoS de *E. coli* y *A. vinelandii*.

Como se sabe, en *E. coli*, σ^{70} (RpoD) y σ^S (RpoS) están considerados como los principales factores sigma involucrados, respectivamente, en la expresión de muchos genes durante la fase exponencial y fase estacionaria [64, 79, 190]. RpoD y RpoS exhiben la misma organización modular en su secuencia de aminoácidos y se ha demostrado que algunas subregiones, de estas proteínas, cumplen un papel muy importante en el reconocimiento del ADN: la subregión 2.4 se une al héxamero -10 [23], la subregión 2.5 reconoce los motivos extendidos de las cajas -10 (TGTG para σ^{70} y TC para σ^S) [7, 9] y la subregión 4.2 interactúa con la caja -35 del promotor [108].

En la actualidad, en *A. vinelandii* no se han realizado estudios que permitan definir secuencias consenso para sus promotores, ni cuáles sean las subregiones de los factores sigma que están involucradas en el reconocimiento de las regiones promotoras. En este trabajo, se llevó a cabo una serie de alineamientos entre las proteínas RpoD y RpoS de *E. coli* vs *A. vinelandii*, y la comparación de algunos promotores reportados en *A. vinelandii* con las secuencias consenso de los promotores de *E. coli*, σ^{70} (TTGACA N17 TATAAT) [48, 49, 89] ó σ^S (CTACT) [82].

El alineamiento de las subregiones 2.4, 2.5 y 4.2 de la proteína RpoD_{Av} (σ^{70}) muestran que son 100% idénticas a sus correspondientes en *E. coli*. Esto nos sugiere que el factor σ^{70} de *A. vinelandii* puede ser capaz de reconocer dos regiones en el ADN (-10 y -35) (Figura 17a). Una evidencia a la interpretación anterior, se encuentra en el promotor *fprp* (TTAACA N17 TAGAAT), cuyo gen codifica para una ferredoxín dependiente de NDPH de fase exponencial [188]. Dicho promotor conserva un espaciamiento perfecto de 17 nucleótidos y los hexámeros -10 y -35 difieren solamente un nucleótido con respecto al consenso del factor σ^{70} de *E. coli* (TTGACA N17 TATAAT) (Figura 17a).

En cuanto al alineamiento de RpoS_{Av}, solamente se conservan las subregiones 2.4 y 2.5: esto nos sugiere que el factor σ^S de *A. vinelandii* reconoce secuencias -10 similares a las secuencias consenso de *E. coli*. Además, se ha demostrado que los promotores dependientes de σ^S en *E. coli* no requieren de un hexámero -35 . Posiblemente, esta sea la razón por la cual la subregión 4.2 no se conserva en *A. vinelandii* y *E. coli*, lo que hace suponer que los motivos de reconocimiento en el ADN sean iguales o que las secuencias consenso para los promotores sean parecidas (Figura 17b). En *A. vinelandii*, se ha demostrado que el promotor P1 del gen *algD* depende del factor σ^S [17]. El hexámero -10 del promotor P1 (13-

CTATAAT-7) conserva cinco nucleótidos de la secuencia consenso propuesta por Lee (CTACACT) y cinco nucleótidos de la caja -10 de pB2 (13-CTATCCT-7) (Figura 17b). [79]. La mayor parte de las investigaciones sobre el análisis de promotores, en muchos microorganismos, se han realizado tomando en cuenta las secuencias consenso identificadas en *E. coli*. En este caso, *A. vinelandii* no ha sido la excepción, y se observa que a pesar de ser un microorganismo con alto número de GCs puede conservar secuencias promotoras cercanas a las de *E. coli*.

Alineamiento de las subregiones de σ^{70} que reconocen héxmeros en el ADN.

17a)

	héxmero -10	motivo TGTG
	2.4	2.5

```

A.vinelandii  $\sigma^{70}$  IRQAITRSIADQARTIRIPVHMIETINKLNRISRQMLQEM
E.coli  $\sigma^{70}$  IRQAITRSIADQARTIRIPVHMIETINKLNRISRQMLQEM
*****

```

	4.1	héxmero -35	4.2
--	-----	-------------	-----

```

A.vinelandii  $\sigma^{70}$  KEATREVLAGLTAREAKVLRMRFGIDMNTDHTLEEVGKQFDVTRERIRQIEAKALRKL RH
E.coli  $\sigma^{70}$  RAATHDVLAGLTAREAKVLRMRFGIDMNTDHTLEEVGKQFDVTRERIRQIEAKALRKL RH
: *: : ***** : ***** : *****

```

17b) **Alineamiento de las subregiones de σ^S que reconocen héxmeros en el ADN.**

	héxmero -10	motivo TC
	2.4	2.5

```

A.vinelandii  $\sigma^S$  IRQTIERAIMNQTRTIRLPIHVVKELNVYLRAARELTQKL
E.coli  $\sigma^S$  IRQTIERAIMNQTRTIRLPIHIVKELNVYLRTARELSHKL
***** : ***** : ***** : *****

```

Figura 17. a) Comparación de las subregiones, 2.4, 2.5, 4.1 y 4.2, del factor σ^{70} en *E. coli* y *A. vinelandii*. b) Comparación de las subregiones 2.4, 2.5 del factor σ^S , en *E. coli* y *A. vinelandii*.

4.8. Alineamiento de los posibles promotores identificados en *A. vinelandii*.

La comparación entre los posibles promotores identificados en *A. vinelandii*, contra las secuencias consenso de *E. coli*, muestra que los hexámeros -10 de pB1 y pB2, presentan secuencias cercanas a los consensos de σ^{70} y σ^S respectivamente, mostrando que las cajas -35 están poco conservadas. Se encontró que el hexámero -10 de pR1 (TAGAAT) está muy conservado en una gran cantidad de genes dependientes de σ^{70} en *E. coli* [117]. Por último, al parecer, pR2 conserva un promotor -10 extendido, cuya característica principal es el motivo TGTG en las posiciones -15 a -18. Cabe mencionar que los promotores *fprp* y *algDp* de *A. vinelandii*, también presentan secuencias conservadas a σ^{70} y σ^S . Adicionalmente, *fprp* conserva algunos nucleótidos localizados entre el +1 y el -10 y el motivo TTTGCCG localizado entre la caja -10 y la -35 (Figura 18).

De acuerdo al análisis de los posibles promotores identificados en *A. vinelandii*, la transcripción del operón biosintético *phbBAC* puede ser constitutiva a partir de pB1 (σ^{70}) e incrementar en fase estacionaria, a partir de pB2 (σ^S). Mientras, que por otro lado, el activador transcripcional PhbR al parecer se expresa en un nivel basal, dependiente de pR1 (σ^{70}), y se mantiene en fase estacionaria por medio de un promotor -10 extendido (pR2).

El alineamiento múltiple entre las regiones intergénicas *phbR-phbB*, de *A. vinelandii*, *Azotobacter* FA8 y *Pseudomonas* 61-3, demuestra que solamente los promotores pB1 y pB2 se conservan, mientras que los promotores correspondientes a pR1 y pR2 solamente se identificaron en *A. vinelandii*, y *Azotobacter* FA8 (Figura 19).

Promotores pB1

-35	-10	
TTGACA	TATAAT	+1 consenso <i>E. coli</i> σ^{70}
GCA CTATCC TTAAAGCGTGACCCAAT TCGAGAAT GAGCCTC		<i>phbBp1 A.vinelandii</i>
TGG CTATCT CTAGAAAGGCCTACCCCT TAGGCT		<i>xylEPm P.putida</i> $\sigma^{70/S}$

Promotores pB2

	-10	
	CTACACT	+1 <i>E. coli</i> σ^S (Lee, 2001)
GCCAGTACGATGTCACCAACGGGCA CTATCCT TAAAGCG		<i>phbB p2 A. vinelandii</i>
	CTATAAT	<i>algD p3 A. vinelandii</i>

Promotores pR1

-35	-10	
TTGACA	TATAAT	+1 consenso <i>E. coli</i> σ^{70}
GCGAGGCGGATTT GCCG TAGGAGC TAGAATGCTCGATG		<i>phbRp1 A.vinelandii</i>
TTAACAGATAGTTTGCCGGCTCCTAGAATGCACGACA		<i>fpr A.vinelandii</i> σ^{70}
CAACTGTTAATTTTTTATTTCCACGGG TAGAATGCTCGCCG		<i>pyrF E. coli</i> σ^{70}
TCGAAGTGT TTGCGG AGTAGATGT TAGAATACTA-ACA		<i>deop2 E. coli</i> σ^{70}
CAACTGTTAATTTTTTATTTCCACGGG TAGAATGCTCGCCG		<i>pyrF E. coli</i> σ^{70}
TATTCGAACATCGATCTCGTCTTGTGT TAGAATCTA-ACA		<i>deop1 E. coli</i> σ^{70}
AGG TTGATG CGGTGCTTTCTGGCTGT TAGAATACGC-CCC		<i>prs E. coli</i> σ^{70}
CCCTACGCAAACGTTTTCTTTTTCTGT TAGAATGCGC-CCC		<i>purFp1 E. coli</i> σ^{70}

Promotores pR2

	-10 extendido	
	TGTGnTATAAT	+1 <i>E. coli</i> σ^{70} consenso
TGGTCGTCTGGCGCCAGAATCCTTGTGTTTTGATATCGACTT		<i>phbRp2 A. vinelandii</i>

Figura 18. Comparación de los posibles promotores, pB1, pB2, pR1 y pR2, contra las secuencias consenso, σ^{70} y σ^S , de *E. coli* y algunos promotores comprobados. Las regiones subrayadas representan los héxmeros -10 y -35 y el +1 representa los inicios de transcripción.

Promotores pB1

GCACTATCCTAAAGCGTGACCCAATCGAGAATGAGCCTC *phbB* pB1 *A.vinelandii*
GCACTACCCTAAAATCTCCGCCTCCCCGAGAATCAATCCC *phbB* pB1 *Azotobacter* FA8
ACACTTCCGCACGGCCCGTCGATA-TCGAACAATCTTCTC *phbB* pB1 *Pseudomonas* 61-3

Promotores pB2

GCCA-GTACGATGTCACC-AACGGGCACTATCCTAAAGCG *phbB* pB2 *A.vinelandii*
GCCA-GCACGATGTCACC-GCAGGGCACTACCCTAAAATCT *phbB* pB2 *A.vinelandii*FA8
GACACG-AAAACGTCACCACAAA-CACTTCCGCACGGCCC *phbB* pB2 *Pseudomonas*61-3

Promotores pR1

GCGAGGCGGATTTGCCGTAGGAGCTAGAATGCTCGATT *phbR* pR1 *A.vinelandii*
GTGGGGCAAATTTGCTGTAGGAACTAGAATGCTCTATG *phbR* pR1 *Azotobacter* FA8

Promotores pR2

TGGTCGTCCTGGCGCCAGAATCCTTGTGTTTTGATATCG-ACTT *phbR* pR2 *A. vinelandii*
TGGTCATCCAGTCGTCGGAG-CCATGTGTTTTGATGGTGTCACTT *phbRpR2**Azotobacter* FA8

Figura 19. Alineamiento entre los posibles promotores, pB1, pB2, pR1 y pR2, de *A. vinelandii*, *Azotobacter* FA8 y *Pseudomonas* 61-3. Las regiones subrayadas representan los héxmeros -10 y -35 y el +1 representa los inicios de transcripción.

5. Discusión

La adaptación de *A. vinelandii* a su medio ambiente involucra la interacción de complejas redes metabólicas y regulatorias que le permiten sintetizar compuestos como alginato y polihidroxibutirato (PHB) y diferenciarse para formar quistes. Entre los sistemas involucrados en percibir y reconocer señales medioambientales se encuentran los sistemas de dos componentes, los cuales transducen la información a factores transcripcionales que pueden activar la transcripción de uno o varios genes, cuyos productos rápidamente provocan el reajuste metabólico a las condiciones medioambientales. En este sentido, pocos son los reguladores globales caracterizados en este microorganismo, a pesar de la liberación del genoma de la cepa UW136 de *A. vinelandii* (<http://ava.biosci.arizona.edu/>).

En los últimos años, se ha demostrado que el sistema de dos componentes GacS/GacA se encuentra involucrado en la regulación de la síntesis de alginato y PHB [17, 18]. En otras bacterias, este sistema global participa en la regulación de múltiples metabolitos secundarios y enzimas extracelulares de fase estacionaria, así como en su relación con diversos fenotipos. A pesar de haber sido identificado en una amplia gama de bacterias, solamente en algunos casos como *E. coli* [113, 172, 180], *P. fluorescens* [180], *P. chloraphis* [74, 155], *Legionella pneumophila* [46] y *A. vinelandii* [18], se ha demostrado que el regulador de respuesta GacA controla positivamente la transcripción del factor σ^S de fase estacionaria.

Puesto que el PHB es un poliéster que incrementa su síntesis durante la fase estacionaria, y que la síntesis del mismo se ve afectada de manera negativa en cepas con mutaciones en los genes *gacA* y *gacS* [17,18], en este proyecto tratamos de mostrar una posible cascada de regulación en la que se encuentra involucrado un sistema de dos componentes (GacS/GacA), el factor σ^S alternativo de fase estacionaria y el activador transcripcional PhbR. Por esta razón, nos enfocamos a estudiar el efecto de estos reguladores sobre la transcripción y acumulación del polímero, así como la posible relación entre ellos.

El análisis sobre la acumulación de PHB se realizó bajo el fondo genético de una cepa hiperproductora del polímero no mucoide (UW136) en la que es posible, en placas, evaluar de manera cualitativa la producción de PHB (fenotipo de opacidad), en *A. vinelandii*. En esta cepa y sus derivadas, también se efectuó la cuantificación de la transcripción de los genes *phbR* y *phbB*, a través del uso de fusiones génicas y de ensayos de mapeo con exonuclease S1.

Al evaluar el efecto sobre la síntesis del polímero, en las mutantes *gacA*, *rpoS* y *phbR*, se observó que los tres reguladores ejercen un efecto positivo sobre la acumulación de PHB y sobre la transcripción de *phbB'-lacZ*.

La inactivación de *rpoS* y *phbR* disminuyen la acumulación de PHB. El efecto es aún mayor en la cepa isogénica *gacA* ya que afecta drásticamente la acumulación del polímero como se observa en la figura 10. Esto se debe a un efecto directo sobre la transcripción del operón biosintético *phbBAC* (Figura 11). Estos resultados demuestran que el regulador global de respuesta GacA, además de controlar la expresión de múltiples metabolitos de fase estacionaria, controla, también, positivamente, a nivel de transcripción el almacenamiento de carbón y poder reductor que implica la acumulación de PHB. Se puede notar que el abatimiento de la síntesis de PHB, en la mutante *gacA*, puede ser mediada en parte y de manera indirecta a través de σ^S . Es oportuno señalar que los niveles de transcripción del operón *phbBAC*, en las mutantes *phbR* y *rpoS*, no corresponden cuantitativamente a los porcentajes de PHB acumulados, pero sí hay una correlación cualitativa (Figura 10 y 11). Una posible explicación es que el ARN mensajero del operón sea muy estable y permita la traducción suficiente de las enzimas biosintéticas (PhbA, PhbB y PhbC). Aunque es importante, también, la acumulación de Ac-CoA y cofactores como NADPH y NADH que inducen la biosíntesis de PHB.

Se observa, en la figura 12 que la transcripción de *phbR* incrementa gradualmente durante la fase exponencial y es controlada positivamente en fase estacionaria (48 hrs), por GacA y RpoS. Esto implica que la síntesis óptima de PHB requiere de la expresión del activador PhbR a partir de sus dos promotores, en la fase estacionaria, para incrementar los niveles de transcripción en el operón *phbBAC*.

5.1. Análisis de los posibles promotores.

El análisis de la región intergénica, localizada entre los genes divergentes *phbBAC* y *phbR*, reveló que ambos se transcriben a partir de dos inicios de transcripción. Los promotores correspondientes al operón *phbBAC*, son denominados pB1 y pB2 (Figura 13), y los promotores pR1 y pR2 corresponden a *phbR* (Figura 15).

5.1.1. Posibles secuencias promotoras de pB1 y pB2.

Al analizar su posible región promotora de pB1, encontramos que el posible hexámero -10 (14-TC GAGAAT-7) conserva cuatro nucleótidos de acuerdo a la secuencia consenso de σ^{70} [48, 49, 89] (Figura 14). Además conserva en la posición -13 y -14 el motivo TC que corresponde a un promotor -10 extendido de σ^S [9]. El hexamero -35 de pB1 es poco conservado (CTATCCT), no obstante su secuencia se parece bastante a la región -35 (CTATCTC) del promotor dual Pm controlado por XylS en *Pseudomonas putida* (Figura 18) [36]. En los ensayos con exonucleasa S1, se observa que la expresión de pB1 en la cepa *rpoS* (JGW-S), no parece afectarse durante la fase estacionaria (48 hrs). Este resultado, más la secuencia de los posibles hexámeros de pB1, nos sugiere que este promotor puede ser reconocido por σ^{70} y en menor grado por σ^S .

El análisis del promotor pB2, muestra que la caja -10 (13-CTATCCT-7) conserva cinco nucleótidos de la secuencia consenso de σ^S , propuesta por Lee en 2001 (CTACACT) [82]. Además, mantiene dos citocinas en la posición -8 y -13, que son fundamentales en el reconocimiento de σ^S , más la timina en posición -7, responsable de la isomerización de la enzima (Figura 14, 18) [82]. En *A. vinelandii*, la mutación del gene *rpoS*, provoca un drástico decremento de pB2 durante la fase estacionaria (48 hrs). Este resultado sugiere que pB2 posiblemente sea un promotor reconocido por σ^S durante la fase estacionaria y en menor grado por σ^{70} durante la fase exponencial (8 hrs) (Figura 14). En el 2001, Castañeda *et al.* demostraron, en *A. vinelandii*, que la expresión del promotor P1 del gene *algD* es dependiente de σ^S ya que disminuye drásticamente en las mutantes *rpoS* y *gacA* [18]; observándose que la caja -10 del promotor P1 (13-CTATAAT-7), conserva 5 nucleótidos de la secuencia consenso para un σ^S propuesta por Lee (CTACACT) y 5 nucleótidos con la caja -10 de pB2 (13-CTATCCT-7).

En este estudio, se encontró, también, que los promotores pB1 y pB2 están robrepuestos: se puede observar que la región -35 de pB1 sobrepone la región -10 de pB2, sugiriendo que una fuerte transcripción de pB1 pudiera afectar negativamente la transcripción de pB2 (Figura 14). Otro caso similar de sobreposición de promotores en *A. vinelandii*, se encuentra entre los promotores P1 y P3 del gen *algD* [18]. En *E. coli*, son muy comunes los ejemplos de operones que se expresan a partir de dos promotores robrepuestos, uno de los cuales es constitutivo y dependiente de σ^{70} , mientras que el otro es inducido en fase estacionaria y dependiente de σ^S , aunque también existen algunos promotores duales que son reconocidos por los dos factores sigma. De la misma forma, los dos promotores pB1 y pB2 en *A. vinelandii*, tienen elementos que sugieren una dualidad.

El efecto tan drástico, ejercido por la mutación *gacA*, sobre la transcripción del operón biosintético, se ve reflejado en el abatimiento de la transcripción a niveles casi indetectables de los promotores pB1 y pB2 (Figura 14). Como se mencionó en la introducción, en *A. vinelandii*, el regulador de respuesta GacA controla la transcripción de *rpoS*, este mismo mecanismo se ha reportado en otras bacterias como *P. fluorescens*, *E. coli*, etc. Esta es una razón más para pensar que parte de el efecto de GacA sobre la expresión de pB2 esté mediada por σ^S , y posiblemente la reducción de la expresión de pB1 en la mutante *gacA* sea indirecta, con la participación de uno u otros intermediarios.

5.1.2. Posibles secuencias promotoras de pR1 y pR2.

La secuencia del hexámero -10 (TAGAAT) de pR1 es muy conservada en una gran cantidad de promotores σ^{70} (no canónicos) de *E. coli* [117], los cuales carecen de una región -35 conservada (Figura 18). En *A. vinelandii* el gene *fpr*, que codifica para una ferredoxín reductasa-NAPDH, conserva un promotor (*fprp*) reconocido por σ^{70} [192]. La caja -10 de este promotor está separada siete pb del inicio de transcripción, y presenta un espaciamiento típico de 17pb entre la caja -10 (TAGAAT) y la -35 (TTAACA). Aunque pR1 carece de un hexámero -35, conserva ciertos nucleótidos con la región promotora de *fprp*, lo que hace suponer el reconocimiento de un factor σ^{70} (Figura 18). Además, los experimentos con exonucleasa S1 sugieren que la expresión de pR1 es constitutiva (Figura 15).

Una de las particularidades que encontramos en el héxamero -10 de pR2 (18-TGTG T TTTGAT-8) es la conservación de un motivo denominado -10 extendido, cuya principal característica es poseer un motivo TGTG en la posición -15 a -18 (Figura 18 y 19). Este tipo de promotores proporcionan mayor estabilidad al factor sigma σ^{70} , carecen de una secuencia -35 conservada y se han descrito en bacterias como *E. coli* [15, 109], *Bacillus subtilis* [16, 181], *Mycobacterium smegmatis* [8], *Mycobacterium tuberculosis* [2] y *Lactobacillus* [106]. Los ensayos con exonucleasa S1 muestran que mutaciones en los genes *gacA* y *rpoS* afectan drásticamente la expresión de pR2 en fase estacionaria, y aunque su secuencia no corresponde a una factor σ^S se podría pensar que su regulación es indirecta (Figura 15).

A pesar de que existe una gran variedad de bacterias productoras de PHAs, solamente *Pseudomonas* 61-3 [103] y *Azotobacter* FA8 [127] conservan el mismo orden del operón biosintético de *A. vinelandii* [160]. Tomando como base las posibles secuencias promotoras identificadas en *A. vinelandii*, realizamos alineamientos múltiples entre las regiones intergénicas de *Pseudomonas* 61-3 y *Azotobacter* FA8, y encontramos que solamente los promotores pB1 y pB2 se conservan (Figura 19). Por esta razón, es posible que la regulación del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*, *Pseudomonas* 61-3 y *Azotobacter* FA8, sea regulada de la misma manera. Por otro lado, los alineamientos correspondientes a la región promotora del activador transcripcional *phbR*, demuestran que los promotores pR1 y pR2 solamente se conservan en las cepas de *Azotobacter*.

5.2. Posible mecanismo de acción de PhbR.

PhbR es un activador transcripcional divergente al operón *phbBAC*, involucrado en la acumulación de PHB y pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS (<http://www.eez.csic.es/arac-xyls/>). En este sentido, en *A. vinelandii* se conocen pocos casos de reguladores divergentes, contrario a *E. coli*, en donde, aproximadamente, un 40% de los genes u operones son regulados por activadores transcripcionales codificados por genes divergentes [115].

Aunque la familia de activadores AraC/XylS es muy grande, un subgrupo activa principalmente promotores de clase II, al sobreponer a la región -35 del promotor. Además, en presencia de inductores, pueden formar dímeros, que reconocen regiones de 18 a 20 pb para activar la transcripción [37]. El dominio de unión a ADN es el carboxilo terminal (~100pb), muy conservado y que se caracteriza por tener dos posibles motivos hélice-vuelta-hélice [37]. La comparación de la secuencia carboxilo terminal de PhbR, revela una notable identidad con algunos reguladores de la familia y la presencia de dos posibles motivos

hélice-vuelta-hélice (186-206raa/233-256raa), lo que sugiere motivos potenciales de unión a ADN.

Al analizar la región promotora del operón *phbBAC*, encontramos dos secuencias repetidas indirectas de 18 pb (R1 y R2) cercanas al promotor pB1 (5'-TGTCACCAA N4 CANTA-3'), las cuales proponemos como los sitios de unión del activador PhbR. Los sitios R1 y R2 se localizan a una distancia de -42.5pb y -63.5pb, relativas al inicio de transcripción pB1. Cabe señalar que las las posiciones centrales mencionadas (-42.5pb y -63.5pb) son muy conservadas en miembros de la misma familia, como AraC, MelR, XylS, ChbR. Otra característica encontrada, es la sobreposición, parcial, del sitio R1 sobre la caja -35, tal y como sucede en AraC, MelR y RhaS de *E. coli* [11, 13, 59, 84] y XylS de *P. putida* [36], por citar algunos ejemplos. Por las características mencionadas, sugerimos que PhbR podría actuar como activador del promotor pB1 al interactuar con la región -35, y como represor al sobreponerse completamente al promotor de pB2 (Figura 16a). Esta hipótesis está sustentada en el hecho de que la expresión de pB1 en la mutante *phbR* disminuye drásticamente y la transcripción de pB2 se incrementa (Figura 14). El mecanismo general de acción de los activadores transcripcionales de la familia AraC/XylS, consiste en la unión de dos sitios repetidos indirectos con afinidades diferentes, siendo el de menor afinidad el que sobrepone la región -35 del promotor. En estos casos, es necesario e indispensable la presencia de un agente inductor que favorezca la formación de un dímero estable para fijarse a los dos sitios. Sin la presencia del inductor, solamente un monómero se unirá al sitio de mayor afinidad y no podrá activar la transcripción.

Dentro de la familia AraC, solamente dos proteínas (XylS y ChbR) se unen a sitios repetidos indirectos iguales. XylS se une a dos sitios contiguos de 16pb (TGCAN N6 GGNTA). Esta característica facilita la formación de un dímero (sin inductor) para activar la transcripción de un promotor dual ($E\sigma^S \sigma^{70}$) en *P. putida* [97]. Pero cuando XylS no es sobreexpresado, se requiere de un inductor para formar los dímeros [36]. Plumbridge y Pellegrini demostraron, en este año, que la proteína ChbR se une a dos sitios repetidos indirectos de 19pb (AGGTCAANG N4 ACNATT), separados por 4 pb, con 15/19 posiciones idénticas en los dos sitios. Y mediante ensayos de retardamiento, observaron que ambos sitios son protegidos simultáneamente, sin observar preferencia por alguno en especial. El sitio proximal de ChbR sobrelapa la región -35 del promotor *chbBp*, tal y como sucede en las proteínas activadoras de clase II de la familia AraC/XylS [131]. Posiblemente, en el caso de PhbR, el mecanismo de regulación sea parecido, debido a que los posibles sitios de unión están representados por dos repetidos indirectos de 18 pb (5'-TGTCACCAA N4 CANTA-3'). Dada la semejanza de los dos sitios de unión R1 y R2, podemos pensar que

sus afinidades serían parecidas y que, posiblemente, no se requiera la presencia de un inductor para formar un dímero estable.

En general, se sabe que los activadores transcripcionales reconocen promotores de clase I y clase II [98, 157, 189]. Los activadores transcripcionales que actúan con promotores típicos de la clase II, interactúan directamente con la RNA polimerasa, para reemplazar eficientemente la falta de un hexámero -35 conservado. Adicionalmente, estudios previos muestran que la subunidad α de la RNA polimerasa interactúa con regiones del carboxilo terminal en activadores transcripcionales [22, 142, 157], incluyendo los activadores de la familia AraC/XylS: AraC, MelR [40, 41], XylS [144], MarA, SoxS, Rob, AlkA y RhaS [59, 189] (Figura 20).

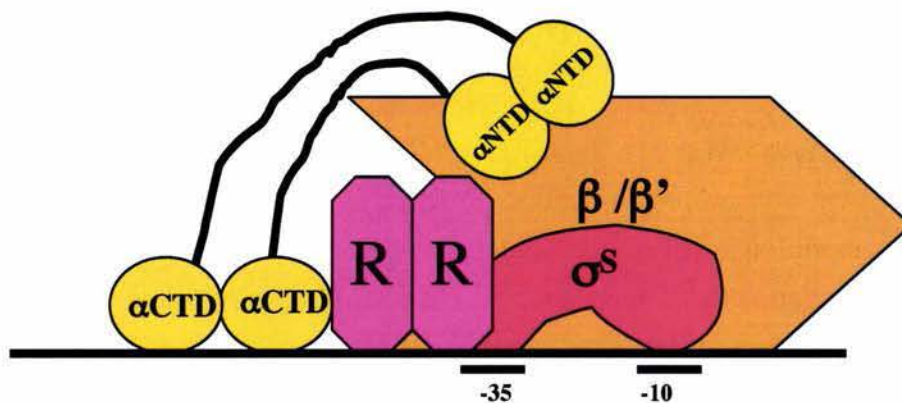


Figura 20. Modelo de regulación de los promotores tipo II. El activador transcripcional, conformado por el dímero R-R, interactúa con el factor sigma correspondiente y sobrelapa el héxamero -35 del promotor. La subunidad α del carboxilo terminal, representada por α CTD, es un elemento importante para activar la transcripción.

De acuerdo a la posición de los sitios R1 y R2, posiblemente PhbR se encuentre activando un promotor de la clase II. En este proceso, la unión de un monómero al sitio R2, permite directamente el reclutamiento de otra molécula de PhbR en el sitio R1. Como resultado, el dímero de PhbR sobreponerse la caja -35 para interactuar con la RNA polimerasa, incrementando la transcripción del operón *phbBAC* (Figura 20). Es interesante mencionar que cerca del sitio de unión R2 existe una región rica en ATs, que pudiera ser reconocido por la subunidad α de la RNA polimerasa y que pudiera ayudar en la estabilidad del complejo. Este tipo de interacción incrementa las constantes de isomerización del complejo cerrado al complejo abierto y, como se mencionó anteriormente, han sido bien caracterizadas en activadores de la familia AraC/XylS [22, 142, 157].

Hemos presentado un posible modelo de acción para el activador PhbR, pero como se trata de una región intergénica bastante grande (512pb), pensamos que el mecanismo de regulación puede ser muy complicado. En el caso de los modelos AraC y MelR, aunque las regiones intergénicas son de menor longitud que la de PhbR, se ha reportado que los monómeros de estos activadores reconocen cinco sitios de unión y que es un sistema autorregulado y corregulado por CRP. Cuatro sitios son reconocidos por MelR, 1'-1 y 2'-2', en la región promotora de *melAB* en *E. coli*, donde el sitio 2' es el menos conservado así como el que sobrepone el héxamero -35. Solamente en presencia de melobiosa, MelR se puede unir al sitio 2' y activar la transcripción, aun y cuando los sitios 1 y 2 son exactamente idénticos.

En *E. coli* se ha demostrado, que entre más grande sea la región intergénica mayor corregulación existe [115]. Otros estudios han sugerido que la curvatura es otro factor involucrado en la transcripción de estos sistemas divergentes, y que las proteínas reguladoras del tipo FNR, FIS, HNS, IHF, y HU juegan un papel importante [115]. Tales fenómenos de regulación pueden ocurrir al entrar a la fase estacionaria, estrés osmótico y transición entre la fase de crecimiento aerobia y anaerobia entre otras.

5.3. Posible organización de la región intergénica, *phbR-phbBAC*, en *A. vinelandii*.

En general, la regulación de los operones divergentes es compleja y corregulada por varias proteínas. En este caso, los resultados obtenidos muestran la presencia de cuatro posibles promotores dentro de la región intergénica *phbBAC-phbR*: dos promotores son responsables de la expresión del gene *phbR*, y el operón biosintético *phbBAC* se expresa a partir de dos promotores sobrepuestos (Figura 21a). La expresión del promotor proximal pB1 al parecer es dependiente de σ^{70} , y la secuencia consenso del promotor distal pB2 corresponde a σ^S . Cabe señalar que en muchos microorganismos, durante la fase exponencial, la mayor parte de los promotores son reconocidos por holoenzimas dependientes del factor σ^{70} ($E-\sigma^{70}$), otros son dependientes de σ^S en fase estacionaria ($E-\sigma^S$), y algunos más son promotores duales identificados por ambas holoenzimas ($E-\sigma^S \sigma^{70}$) [64]. Los resultados sugieren que la expresión de los promotores pB1 y pB2 es dependiente los factores σ^{70} (en fase exponencial) y σ^S (en fase estacionaria), respectivamente. (Figura 21a). El solapamiento entre los promotores del operón *phbBAC* implica un estado de posible competencia por parte de las holoenzimas que se unen tanto a pB1 ($E\sigma^{70}$) y pB2 ($E\sigma^S$) (Figura 21b). Posiblemente, la mayor expresión de pB1 se puede deber a que la región promotora presenta consenso con un factor σ^{70} , y que esta subunidad tiene mayor afinidad por el corazón de la RNA polimerasa, en comparación al factor σ^S , además de que la concentración intracelular de sigma 70 es alta, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Adicionalmente, el regulador PhbR activa la transcripción de pB1 (Figura 21c) y reprime parcialmente a pB2, impidiendo que la holoenzima $E\sigma^S$ se una libremente al promotor pB2 (Figura 21d).

Por otro lado, la mayor parte de los genes que codifican para activadores transcripcionales de la familia AraC/XylS se transcriben a partir de un solo promotor, por lo que se puede considerar a PhbR como uno de los pocos casos que se transcriben a partir de dos promotores. Las figura 21e y 21f muestran las dos unidades de transcripción a partir de las cuales *phbR* se transcribe, definiendo como una unidad de transcripción al gen (e) que se transcriben a partir del mismo promotor. Al parecer, la expresión de pR1 es constitutiva y depende de la holoenzima $E\sigma^{70}$, mientras que hasta el momento no podemos mencionar cual podría ser la holoenzima que reconozca a pR2; aunque cabe la posibilidad de que de trate de un efecto indirecto de RpoS y GacA.

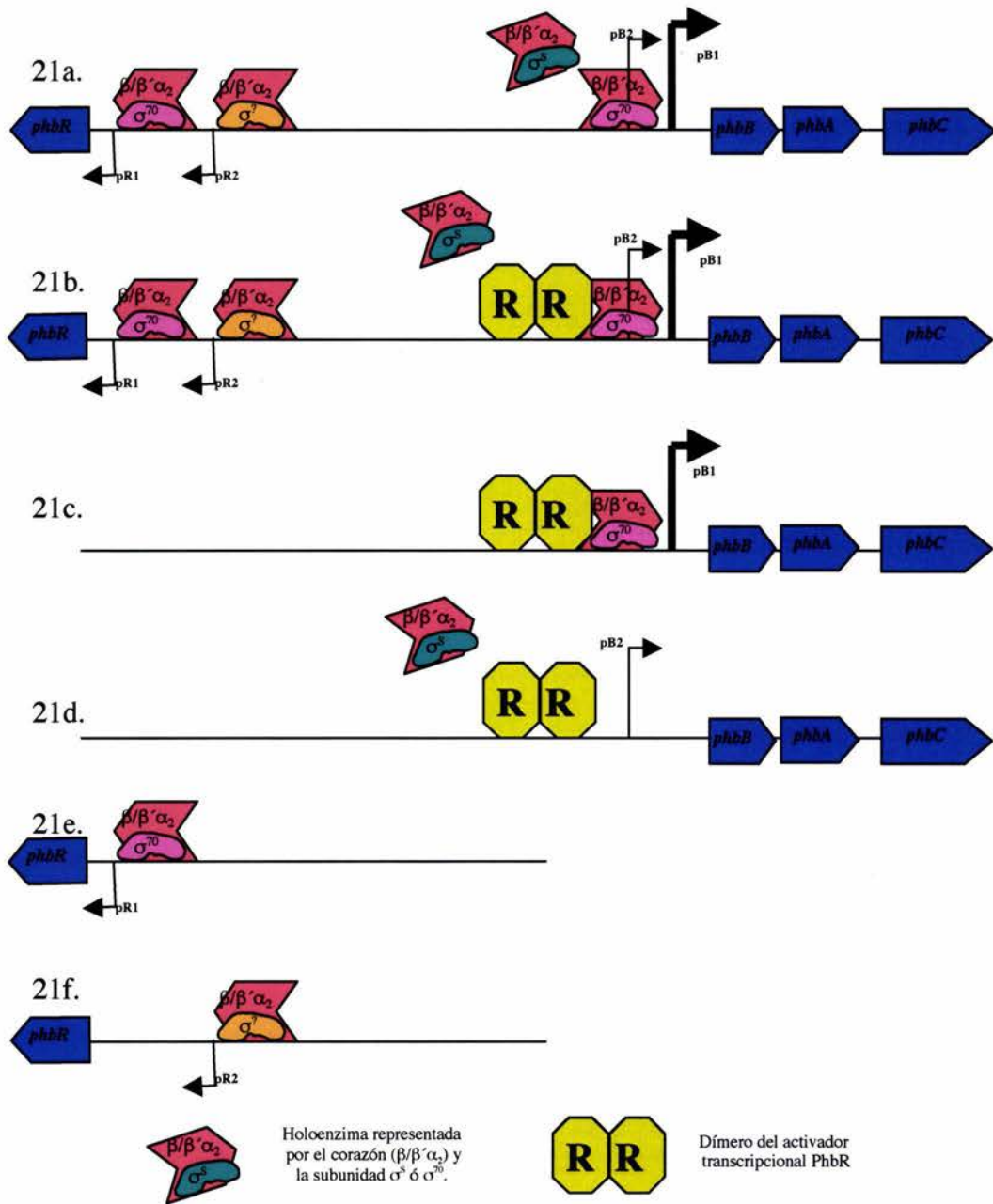


Figura 21. a) Modelo de regulación del operón divergente *phbBAC-phbR*. b) Promotores sobrepuestos del operón *phbBAC* y competencia de las holoenzimas $E\sigma^{70}$ y $E\sigma^S$. c) Regulación positiva de PhbR sobre el promotor pB1. d) Regulación negativa de PhbR sobre el promotor pB2. e) Transcripción de *phbR* a partir de pR1. f) Transcripción de *phbR* a partir de pR2. Las flechas indican los promotores.

5.4. Posible cascada de regulación del operón divergente *phbBAC-phbR*.

Como un modelo particular de la flexibilidad genética, *Azotobacter vineandii*, se adapta y responde inmediatamente a las condiciones externas. En este caso, el sistema de dos componentes GacS-GacA es un sistema de traducción de señales involucrado en monitorear estímulos medioambientales o posiblemente el estado fisiológico de la célula. La respuesta a estas señales se traduce en el procesamiento de información intracelular que involucra redes complejas, iniciando por la autofosforilación del detector GacS y posteriormente la fosforilación del regulador de respuesta GacA, el cual modula los niveles de expresión genética o actividades enzimáticas (Figura 22). Estudios realizados con el sistema de dos componentes ArcB/ArcA, muestran que el incremento del cofactor NADH estimula la autofosforilación de la cinasa histidínica (ArcB), por lo que resulta interesante pensar que si el incremento de los cofactores NADPH y NADH estimulan la síntesis de PHB, también pudieran estar involucrados en la fosforilación de sistemas de dos componentes, como el que analizamos en este proyecto, ya que GacS y ArcB pertenecen al grupo de cinasas histidínicas no ortodoxas (H-D-H). Cuando los microorganismos se encuentran en estado de estrés, el metabolismo y la expresión genética cambia considerablemente, por lo que no debemos descartar que las señales que provocan la fosforilación de los sensores sean también internas.

Como sabemos, el regulador de respuesta GacA modula indirectamente la expresión de genes involucrados en reacciones metabólicas afectando el metabolismo del carbono, provocando el incremento de metabolitos secundarios que favorecen la biosíntesis de PHB y, por lo tanto, la acumulación del carbono. Al parecer, el efecto positivo de GacA sobre *rpoS* (σ^S), en *A. vinelandii*, estimula indirectamente la expresión del activador transcripcional PhbR. Y, posteriormente, la activación conjunta entre este activador transcripcional y σ^S favorecen la transcripción del operón *phbBAC* durante la fase estacionaria (Figura 22). En consecuencia, la síntesis de PHB se verá favorecida por el incremento de las enzimas acetoacetil-CoA reductasa (*phbB*), β -cetotiolasa (*phbA*) y PHA sintasa (*phbC*), sin descartar la interacción alostérica con los cofactores NADH, NADPH y Acetil-CoA, previamente acumulados (Figura 22).

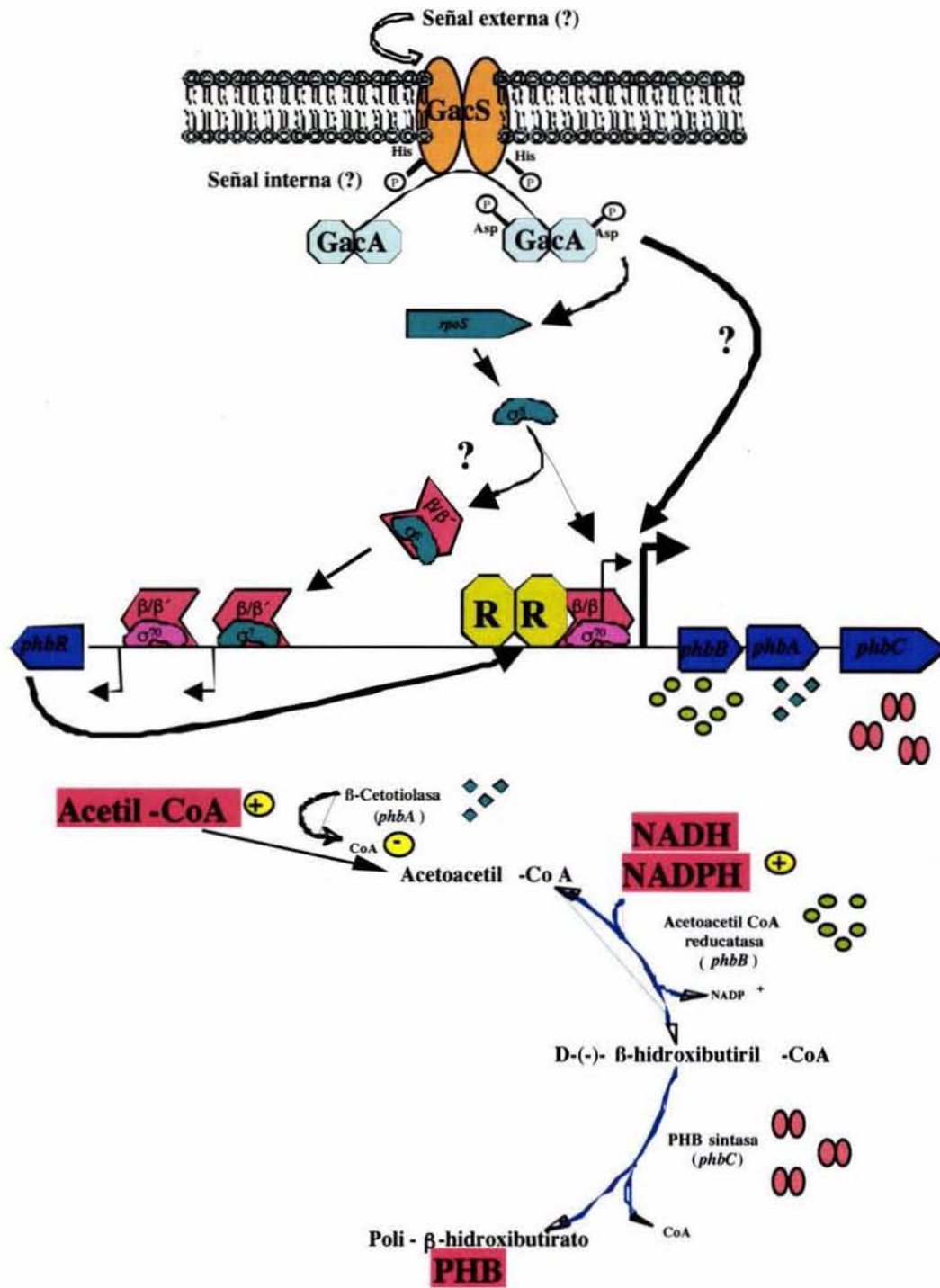


Figura 22. Posible cascada de regulación del operón biosintético *phbBAC*.

Capítulo 6

Conclusiones

Como resultado de este trabajo podemos señalar las siguientes conclusiones:

1. El análisis sobre la transcripción del operón *phbBAC* ha mostrado que éste se expresa a partir de dos promotores sobrepuestos, pB1 y pB2. De la misma forma, el gen divergente *phbR*, que codifica una proteína reguladora, se transcribe a partir de dos promotores no sobrepuestos, pR1 y pR2.
2. Dado el carácter pleiotrópico del regulador global de respuesta GacA y debido a que se desconocen posibles sitios de unión a este regulador global, podemos decir que el efecto ocasionado por GacA sobre las regiones promotoras de *phbR* y *phbBAC* es indirecto y mediado en parte por el factor sigma S.
3. Existen múltiples operones que son regulados por activadores transcripcionales divergentes. En este caso, el gene divergente *phbR* no es la excepción, ya que codifica para un activador transcripcional que regula positivamente la transcripción del operón complejo *phbBAC*. De forma tal que el activador PhbR actúa como un regulador dual sobre la transcripción del operón *phbBAC*, activando la expresión del promotor pB1 y reprimiendo de manera parcial la transcripción de pB2.
4. Al parecer, el mecanismo de acción del activador transcripcional PhbR es conservado, ya que actuaría como dímero de acuerdo al mecanismo de los activadores de la familia AraC-XylS. Dos posibles sitios de unión (R1 y R2), de 18 pares de bases (5'-TGTCACCAAnnnnCANtA-3'), son reconocidos por PhbR en la región promotora del operón *phbBAC*. La región -35 del promotor pB1 es parcialmente sobrepuesta por R1 y se encuentra a una distancia de -42.5 pb relativa al inicio de transcripción pB1.
5. Podemos considerar este trabajo como uno de los primeros que muestra una posible cascada de regulación que involucra el regulador de respuesta GacA, el factor sigma S y el activador transcripcional PhbR sobre la transcripción de los genes divergentes *phbR* y *phbBAC* en *A. vinelandii*.

Capítulo 7

Perspectivas

Caracterizar mediante análisis mutacional los posibles promotores identificados.

Analizar mediante ensayos de retardo y protección, el papel que juegan los posibles sitios de unión a PhbR, identificados en la región intergénica *phbBAC-phbR*, con la finalidad de determinar si el activador PhbR es capaz de autorregularse o de formar un asa en la región intergénica *phbBAC-phbR*.

Identificar y caracterizar vías alternas por las cuales GacA ejerce su efecto sobre la regulación de la transcripción del operón *phbBAC*.

Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR

Martín Peralta-Gil,¹ Daniel Segura,¹ Josefina Guzmán,¹ Luis Servín-González,² and Guadalupe Espín^{1*}

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología,¹ and Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas,² Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62250, Mexico

Received 29 May 2002/Accepted 7 July 2002

The *Azotobacter vinelandii* *phbBAC* genes encode the enzymes for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis. The *phbR* gene, which is located upstream of and in the opposite direction of *phbBAC*, encodes PhbR, a transcriptional activator which is a member of the AraC family of activators. Here we report that a mutation in *phbR* reduced PHB accumulation and transcription of a *phbB-lacZ* fusion. We also report that *phbB* is transcribed from two overlapping promoters, p_{B1} and p_{B2} . The region corresponding to the -35 region of p_{B1} overlaps the p_{B2} -10 region. In the *phbR* mutant, expression of *phbB* from the p_{B1} promoter is significantly reduced, whereas expression from the p_{B2} promoter is slightly increased. Two *phbR* promoters, p_{R1} and p_{R2} , were also identified. Transcription from p_{R2} was shown to be dependent on σ^S . Six conserved 18-bp sites, designated R1 to R6, are present within the *phbR-phbB* intergenic region and are proposed to be putative binding targets for PhbR. R1 overlaps the -35 region of the p_{B1} promoter. A model for the regulation of *phbB* transcription by PhbR is proposed.

Azotobacter vinelandii is a nitrogen-fixing soil bacterium that undergoes differentiation to form desiccation-resistant cysts and produces two polymers that have industrial importance, alginate and poly- β -hydroxybutyrate (PHB). PHB synthesis in *Azotobacter* species has been shown to be controlled posttranscriptionally at the level of β -ketothiolase activity, which catalyzes the first step of PHB synthesis (20). Oxygen limitation initiates the synthesis of this polymer (19). Under relaxed oxygen conditions acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) is fed into the tricarboxylic acid cycle, and the resulting CoA inhibits β -ketothiolase activity. Under oxygen limitation and carbon-excess conditions, the level of NAD(P)H increases and NAD(P)H inhibits citrate synthase and isocitrate dehydrogenase, elevating the levels of acetyl-CoA and lowering the CoA levels; thus, the inhibition of β -ketothiolase by CoA is overcome, which allows synthesis of PHB to proceed (20).

A PHB biosynthetic gene cluster (*phbBAC*) codes for the enzymatic activities involved in PHB synthesis, including β -ketothiolase (PhbA), acetoacetyl-CoA reductase (PhbB), and PHB synthase (PhbC), in *Azotobacter* sp. strain FA8 (16) and *A. vinelandii* (D. Segura, T. Cruz, and G. Espín, unpublished results). Linked to the *phbBAC* biosynthetic genes, *phbR*, a gene coding for a protein exhibiting identity to transcriptional activators of the XylS/AraC family, was identified in *A. vinelandii* (D. Segura, unpublished); 310 nucleotides upstream and

in the direction opposite that of the *phb* biosynthetic cluster a *phbR* gene is also present in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. It has been proposed that this gene is a positive regulatory factor for the PHB biosynthetic genes (11). The AraC family includes more than 100 proteins from different bacteria. Most family members are transcription activators that bind to specific 18- to 20-bp sequences at target promoters (for a review see reference 6). The 100 amino acids of the AraC C-terminal domain constitute the DNA binding domain, which is predicted to contain two helix-turn-helix DNA binding regions (6). The conservation of the AraC family DNA binding domain is such that other family members are likely to bind to their targets in a similar manner.

The presence of *phbR* upstream of the *phbBAC* biosynthetic gene cluster in *A. vinelandii* (Segura, unpublished) suggests that PHB synthesis in this bacterium may also be controlled at the transcriptional level.

In this paper, we report isolation and characterization of a *phbR* mutant and identification of four promoters within the *phbR-phbB* intergenic region: two overlapping promoters that transcribe *phbB* and two promoters that transcribe *phbR*. Our data indicate that PhbR activates transcription from one of the *phbB* promoters.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and growth conditions. The *A. vinelandii* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *A. vinelandii* cells were grown at 30°C, on PY medium (5 g of peptone per liter, 3 g of yeast extract per liter) supplemented with sucrose (20 g/liter). Growth was determined by determining the amount of protein by the method of Lowry et al. (9). The following antibiotic concentrations were used: kanamycin, 3 and 10 μ g/ml; spectinomycin, 25 μ g/ml; and gentamicin, 0.25 μ g/ml.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62250, Mexico. Phone: 52-73-291644. Fax: 52-73-172388. E-mail: espin@ibt.unam.mx.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>A. vinelandii</i> strains		
UW136	Wild type	
DS268	UW136 with <i>phbR</i> ::mini-Tn5	This study
AJ2	UW136 with <i>phbB</i> :: <i>lacZ</i> mutation	This study
JGW-S	UW136 with <i>rpoS</i> ::Sp mutation	This study
AJ2-R	AJ2 with <i>phbR</i> ::Gm mutation	This study
JGW-R	UW136 with <i>phbR</i> ::Gm mutation	This study
JGW-RS	JGW-R with <i>rpoS</i> ::Gm mutation	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	GIBCO-BRL
Plasmids		
pBluescript KS(+)		Stratagene
pUT/miniTn5 <i>lacZ2</i> Km		5
pBSL97		1
pBSL98		1
pCAM140		25
pMP01	pBSL97 derivative with Sp- <i>gusA</i> cassette	This study
pSM-Gus-Gm	pMP01 derivative with <i>gusA</i> -Gm cassette	This study
pTC2P	pBluescript KS(+) with <i>phbR</i>	This study
pSMR4	pTC2P derivative with <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> -Gm mutation	This study
pSMS7	pCNS59 derivative with <i>rpoS</i> ::Sp mutation	4

Microbiological procedures. *A. vinelandii* transformation was carried out as described previously (2). Random mini-Tn5 mutagenesis of a strain was carried out with a PUT derivative containing the mini-Tn5 *lacZ2* transposon (5), as previously described (12). PHB accumulation was determined by the method of Law and Slepecky (7) as described previously (10).

Enzymatic activities. β -Galactosidase activity was measured as reported by Miller (13); 1 U of activity corresponded to 1 nmol of *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside hydrolyzed per min per mg of protein. β -Glucuronidase activity was measured as reported by Wilson et al. (25). β -Ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, and PHB synthase activities were assayed by the methods of Segura et al. (unpublished). Protein was determined by the method of Lowry et al. (9). All measurements were done in triplicate.

Nucleic acid procedures. RNA and DNA isolation and cloning and Southern blotting procedures were carried out as described previously (17).

Construction of *A. vinelandii* *phbR* and *rpoS* mutants. It was previously shown that in *A. vinelandii* insertion of the gentamicin cassette from plasmid pBSL98 (1) into the *ampD* gene in the same orientation as the direction of transcription produces a nonpolar mutation, which allows transcription of a downstream gene in the same operon (15). A 2.2-kb *Pst*I restriction fragment containing *phbR* and *phbB* from strain UW136 was cloned into plasmid pBluescript KS(+), producing plasmid pTC2P (Fig. 1). This plasmid was partially digested with *Bam*HI, and the ends were made blunt by treatment with the Klenow fragment. A 4.25-kb *Eco*RI fragment with a spectinomycin resistance gene (Sp) and the *gusA* reporter was isolated from plasmid pCAM140 (25) and cloned into plasmid pBSL97 (1). The resulting plasmid was designated pMP01. The Sp gene in pMP01 was replaced by a 0.8-kb fragment containing a gentamicin resistance gene (Gm) from pBSL98 (1) to create plasmid pSM-Gus-Gm. A 2.8-kb *Xho*I fragment containing *gusA* and the Gm gene was isolated from pSM-Gus-Gm, made blunt by treatment with the Klenow fragment, and inserted into the *phbR* gene at the *Bam*HI site (also made blunt by treatment with the Klenow fragment) in the same orientation as the orientation of *phbR* transcription, to create a *phbR*::Gus-Gm nonpolar mutation. The resultant plasmid, pSMR4 (Fig. 1), which is unable to replicate in *A. vinelandii*, was introduced by transformation into strains UW136 and AJ2, as reported by Bali et al. (2) Two gentamicin-resistant transformants, one from each strain (designated JGW-R and AJ2-R, respectively), were chosen for further analysis. Replacement of the *phbR* gene with the *phbR*::Gus-Gm mutation on the chromosomes of strains JGW-R and AJ2-R was confirmed by Southern analysis by using plasmid pTC2P as the probe (data not shown).

Plasmid pSMS7 carrying an *rpoS*::Sp mutation (4) was transformed into strains UW136 and JGW-R. Two spectinomycin-resistant transformants, one from each strain (designated JGW-S and JGW-RS, respectively), were confirmed by Southern analysis to carry the *rpoS*::Sp mutation (data not shown).

High-resolution S1 nuclease mapping. Probes for S1 mapping were prepared by PCR amplification, after the 5' ends of the primers were labeled with [γ - 32 P]ATP (3,000 Ci/mmol) by using T4 polynucleotide kinase. The labeled primer used to map the *phbB* transcriptional start site was 5'GATTGCTGTC-

CCGATTCCGC3', and the unlabeled primer was 5'CCAGCCCATAGGCCT-TGAGC3'; these primers generated a 787-bp *phbB* probe. The PCR probe, uniquely labeled at one end, was purified from low-melting-point agarose gels. A total of 10⁵ Cerenkov counts of probe per min (corresponding to about 50 ng) was hybridized to 50 μ g of total RNA isolated from cells grown on PY medium supplemented with 2% sucrose. Hybridization, processing of the samples, and gel electrophoresis of the protected fragments were performed as previously described (21, 23). The protected fragments were electrophoresed parallel to sequence ladders obtained with the labeled primer used for probe preparation.

To map the *phbR* start sites, labeled primer 5'CCAGCCCATAGGCCT-TGAGC3' and unlabeled primer 5'GATTGCTGTCCTCCGATTCCGC3' were used to generate the 787-bp *phbR* probe.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and characterization of strain DS268. To study regulation of PHB accumulation, we isolated mutants affected in the production of PHB. UW136 is an *A. vinelandii* strain that has an opaque phenotype on PY medium supplemented with 2% sucrose due to accumulation of PHB (18). Mini-Tn5 mu-

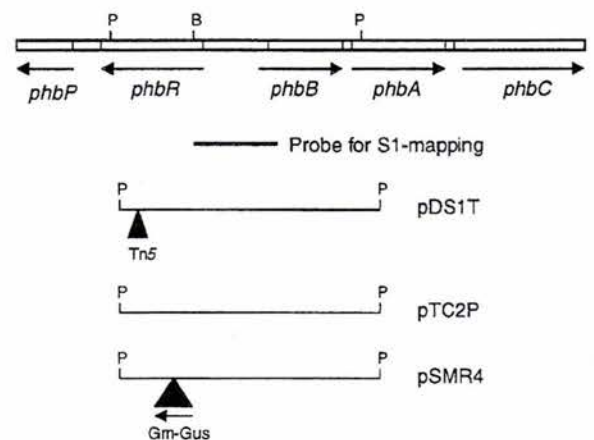


FIG. 1. Physical map of the *A. vinelandii* *phbB* and *phbR* region and plasmids constructed in this study.

TABLE 2. PHB production and PHB biosynthetic activities^a

Strain	Genotype	PHB concn ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)	β -Ketothiolase activity ^b	Acetoacetyl-CoA reductase activity ^b	PHB synthase activity ^b
UW136	Wild type	335.5 \pm 9.6	807.6 \pm 56.7	17.9 \pm 1.1	2,421.8 \pm 77
DS268	<i>phbR</i> -Tn5	62.5 \pm 5.6	231.9 \pm 20.1	5.3 \pm 0.9	871.7 \pm 51

^a Values were determined by using cells grown for 96 h on solid PY medium containing sucrose.

^b The values are means \pm standard deviations for three determinations. The units are nanomoles per minute per milligram of protein.

tagenesis of strain UW136 produced mutant strain DS268, which is less opaque than the UW136 parent strain (data not shown). Strain DS268 produced PHB at a level that was about 28% of the wild-type level (Table 2).

A *Pst*I DNA fragment containing the mini-Tn5 insertion of mutant DS268 was cloned in pBluescriptKS+ to obtain plasmid pDS1T (Fig. 1). By sequencing across the transposon-insertion junction in plasmid pDS1T, the location of the mini-Tn5 mutation was found to lie within *phbR* (Fig. 1), between codons 202 and 205. Downstream of *phbR* and in the same orientation, an open reading frame designated *phbP* encoding a protein similar to PHA granule-associated phasin is present.

Strain JGW-R, a UW136 derivative carrying a *phbR*::Gus-Gm nonpolar mutation, was constructed as described in Materials and Methods. Similar to the *phbR*::Tn5 mutation, the *phbR*::Gus-Gm mutation reduced PHB accumulation by 64% (Fig. 2B), confirming that this phenotype was due to inactivation of *phbR* and not to a polar effect on *phbP*.

Effect of the *phbR* mutation on the activities of the PHB biosynthetic enzymes. The PHB biosynthetic *phbBAC* genes seem to be organized as an operon since a mutation in *phbB*, encoding acetoacetyl-CoA reductase, was shown to negatively affect the β -ketothiolase (PhbA) and PHB synthase (PhbC) activities (Segura, unpublished). The activities of the three enzymes of the PHB biosynthetic pathway were determined in the DS268 mutant. In agreement with the 70% reduction in

PHB accumulation, the levels of the acetoacetyl-CoA reductase, β -ketothiolase, and PHB synthase activities detected in strain DS268 were about 30% of the wild-type levels (Table 2). These results suggest that PhbR acts as an activator of the *phbBAC* biosynthetic gene cluster but that in its absence there is still significant expression of the operon.

Analysis of *phbB* expression by using a *phbB-lacZ* gene fusion. We determined the effect of the *phbR* mutation on transcription of the *phbBAC* operon. The induction kinetics of *phbB* transcription was determined in vivo by measuring the β -galactosidase activity in strain AJ2 (UW136 carrying the *phbB*::*lacZ* fusion) and is shown in Fig. 2. Expression of *phbB* was detected during the exponential phase and upon entry into and during the stationary phase. Figure 2 also shows that the β -galactosidase activity in strain AJ2-R, an AJ2 derivative with the *phbR*::Gm mutation, was significantly reduced, in agreement with the reductions in both PHB biosynthetic activities and accumulation of PHB observed in *phbR* mutants, further supporting the hypothesis that PhbR activates transcription of the *phbBAC* operon.

Transcription of *phbB* is initiated from two overlapping promoters. High-resolution S1 nuclease mapping experiments were carried out to identify the transcription start site(s) upstream the *phbB* gene. They were carried out with total RNA isolated from exponentially growing cells and from stationary-phase cultures of UW136. The probe for mapping the *phbB*

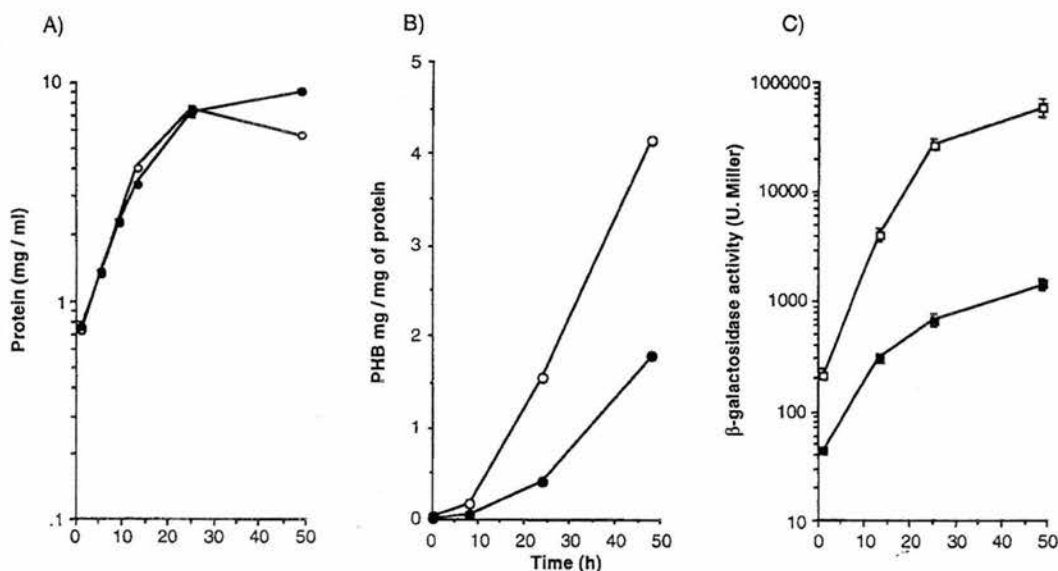


FIG. 2. Growth (A) and PHB accumulation (B) of strains UW136 (○) and JGW-R (●). (C) β -Galactosidase activity in strains AJ2 (□), and AJ2-*phbR* (■). Cells were grown on PY medium with 2% sucrose.

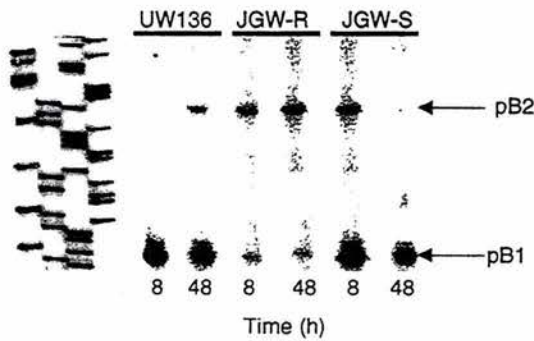


FIG. 3. S1 nuclease mapping analysis of *phbB* transcription in strains UW136, JGW-R, and JGW-S.

promoters was prepared by PCR amplification as described in Materials and Methods and is indicated in Fig. 1. As shown in Fig. 3 for UW136 (48 h), two transcriptional start sites, located 92 and 115 nucleotides upstream of the ATG start codon of *phbB*, were identified by using RNA from stationary-phase (48-h) cultures, which defined promoters p_{B1} and p_{B2} , respectively. Transcription from p_{B2} was barely detected in RNA from exponentially growing cells (Fig. 3, UW136 [8 h]) and increased in stationary-phase cells (UW136 [48 h]). The intensities of the signals corresponding to the promoters detected indicate that p_{B1} is a stronger promoter than p_{B2} . Figure 4 shows that the -35 region of p_{B1} overlaps the -10 region of p_{B2} , suggesting that strong transcription from p_{B1} could affect transcription from p_{B2} .

Transcription of *phbB* from p_{B1} depends on PhbR. As shown above, PhbR is a transcriptional activator apparently involved in the regulation of PHB production in *A. vinelandii*, since a mutation in *phbR* reduced PHB accumulation and *phbB* transcription. To further investigate the involvement of *phbR* in regulation of PHB biosynthesis, we tested the effect of the

phbR::Gus-Gm mutation on transcription of the *phbB* gene. Transcripts corresponding to the p_{B1} and p_{B2} promoters were clearly detected in the JGW-R *phbR* mutant (Fig. 3). The level of the p_{B1} transcript was significantly reduced, whereas the level of the p_{B2} transcript was increased, indicating that PhbR activates transcription from the p_{B1} promoter and that this activation interferes with the p_{B2} promoter. Lack of activation of p_{B1} by PhbR might allow the RNA polymerase to exhibit more efficient initiation from p_{B2} (see below).

In agreement with the PHB production leaky phenotype of the *phbR* mutant, transcription of *phbB* is not totally dependent on PhbR.

σ^S is needed for expression of the p_{B2} promoter in the exponential phase. Transcription from p_{B2} increases significantly during the stationary phase. To test whether p_{B2} is a promoter of the class recognized by σ^S , we carried out an S1 nuclease mapping experiment with RNA isolated from *rpoS* mutant JGW-S. As shown in Fig. 3, this promoter is not transcribed in the *rpoS* mutant during the stationary phase; however, and in contrast to the wild-type situation, transcription of this promoter increased in exponentially growing cells (Fig. 3, JGW-S [8 h]). This result suggests that p_{B2} is recognized by both σ^S and σ^D . In fact, the -10 region of p_{B2} (Fig. 4) has a sequence (CTATCCT) which corresponds well to the σ^S -dependent promoter consensus sequence CTACACT (8).

Transcription analysis of the *phbR* promoter. We also identified the transcription start sites of the *A. vinelandii phbR* gene by performing S1 nuclease mapping experiments as described above (see Materials and Methods). Two transcriptional start sites were revealed; these sites were located 61 and 139 nucleotides upstream of the ATG start codon, identifying promoters p_{R1} and p_{R2} (Fig. 5, UW136 [48 h]). Transcription from the p_{R2} promoter was not detected in exponentially growing cells and in the *rpoS* mutant (Fig. 5, UW136 [8 h] and JGW-R). However, the CTACACT consensus sequence recognized by σ^S is not present in the -10 region of p_{R2} (Fig. 4), suggesting

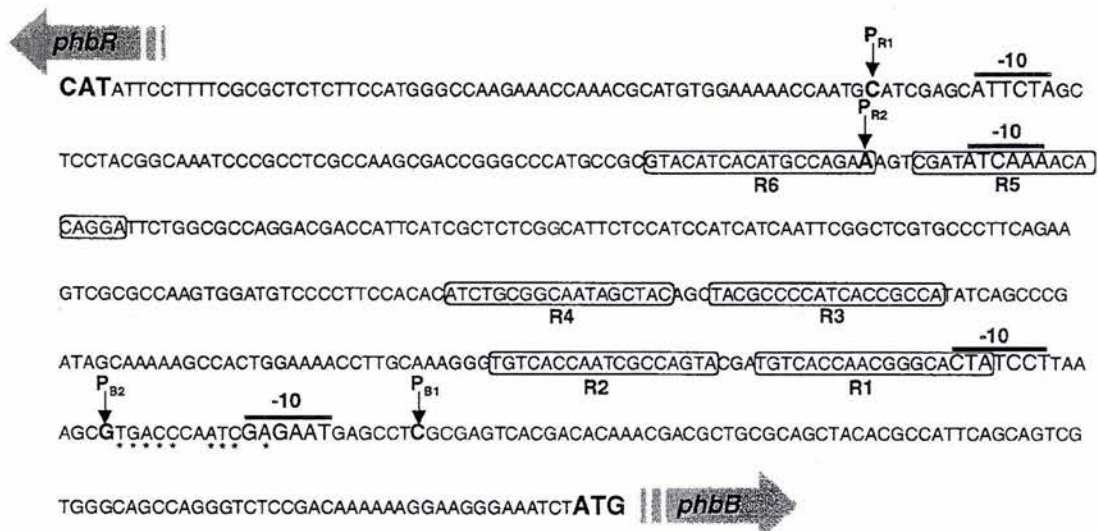


FIG. 4. Intergenic *phbR-phbB* region. The arrows indicate transcription start sites. The *phbB* and *phbR* start codons are indicated by boldface type. The -10 sequences of p_{B1} , p_{B2} , p_{R1} , and p_{R2} are overlined. Sites R1 to R6 are enclosed in boxes. The putative CydR binding site is indicated by asterisks.

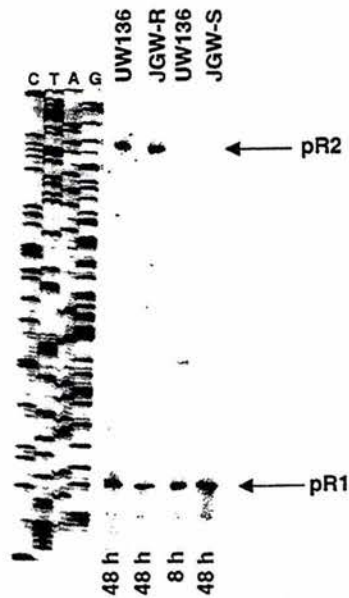


FIG. 5. S1 nuclease mapping analysis of *phbR* transcription in strains UW136, JGW-R, and JGW-S.

that transcription from p_{R2} is under σ^S control in an indirect manner. During the stationary phase, both promoters seem to contribute equally to the expression of *phbR*.

Transcription of *phbR* was also studied by using a *phbR-gus* fusion. Similar to transcription of *phbB*, transcription of *phbR* increased upon entry into the stationary phase and, as expected, was reduced in the *rpoS* mutant (Fig. 6).

Sequence analysis of the *phbB-phbR* intergenic region. PhbR belongs to the AraC family of transcriptional regulators. The binding targets for some of these regulators, such as AraC and MelR from *Escherichia coli*, consist of repeated sequences 17

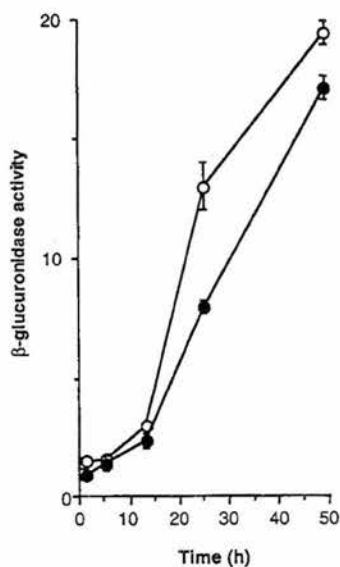


FIG. 6. β -Glucuronidase activity in strains JGW-R (○) and JGW-RS (●) during growth on PY medium supplemented with 2% sucrose.

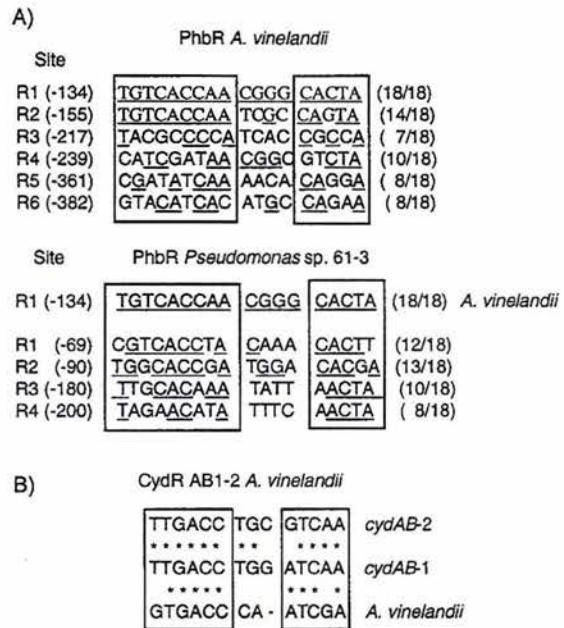


FIG. 7. (A) Alignment of the *A. vinelandii* and *Pseudomonas* sp. strain 61-3 putative PhbR binding sites. (B) Alignment of the *cydAB* CydR binding sites with the putative CydR binding site present in the *phbB* promoter.

or 18 nucleotides long that possess conserved motifs. Each monomer binds to one of these conserved sequences. MelR binds to four target sites, sites 1', 1, 2, and 2', in the *melAB* promoter of *E. coli*, where the less conserved site 2' (7 of 18 bases) binds MelR most weakly (3). MelR binding to site 2' occurs only in the presence of melbiose and is absolutely required for expression of *melAB*. Improvement of the base sequence of site 2' removes the requirement for sites 1 and 1' and for melbiose (3, 22). Binding of MelR to a fifth site that overlaps the *melR* promoter has been shown to downregulate expression from the *melR* promoter (24).

Analysis of the *phbB* promoter region revealed two almost identical 18-bp sequences centered at positions -134 and -155 upstream from the ATG start codon (Fig. 4). We designated these putative PhbR binding sites R1 and R2. Scrutiny of the DNA sequences further upstream of site R2 revealed another four less-conserved 18-bp sites that we designated R3, R4, R5, and R6 (Fig. 4). Interestingly, we found that similar 18-bp sites are present in the *phbB-phbR* intergenic region of *Pseudomonas* sp. strain 61-3 (accession number AB014757), the other bacterium in which *phbR* has been described. An alignment of these R sites is shown in Fig. 7.

Site R1 overlaps the -35 region of p_{B1} . R2 is located 3 nucleotides upstream of R1 (Fig. 4). The position of the *A. vinelandii* R1 and R2 sites is similar to the position of the binding sites (sites 2 and 2') for MelR (3), where site 2' also overlaps the -35 region of the *melAB* promoter. However, in contrast to the *A. vinelandii* R1 site that is almost identical to the R2 site, MelR site 2' is much less conserved (7 of 18 bases). The identity of the *A. vinelandii* R1 and R2 sites suggests that no inducer is required for activation, and in fact no inducer for PHB synthesis is known.

Although less conserved, putative PhbR binding site R5 overlaps the -10 region of the divergent *phbR* pR2 promoter, thus raising the possibility that PhbR acts as a repressor of its own transcription. However, when transcription of the *phbR* promoters in a *phbR* mutant was analyzed, transcription from the pR2 promoter was only slightly increased compared to transcription from pR1 (Fig. 5).

By analogy to the AraC (14) and MelR models, we propose that PhbR binds to the R1 and R2 sites and probably to the other less-conserved sites (R3 to R6) to activate transcription from the pB1 promoter. This proposal is based on the observation that in the *phbR* mutant, activation from pB1 is significantly diminished. We also propose that a reduction in transcription initiation from pB1 would free the -10 region of pB2 from PhbR occupation, favoring PhbR-independent transcription from pB2.

We also found a putative CydR binding site within the *phbB* promoter region that overlaps the -10 region of pB1 (Fig. 4 and 7). CydR is an Fnr-like regulatory protein that negatively regulates expression of *cydAB* (26, 27). The presence of this CydR binding site suggests that expression of the *phbBAC* operon could be negatively regulated by CydR. Interestingly, it has been shown that the levels of PHB biosynthetic β -keto-thiolase and acetoacetyl-CoA reductase proteins are elevated in a *cydR* mutant (28).

Based on previously published data and the results obtained in this study, a model for the regulation of PHB synthesis in *A. vinelandii* is proposed. In exponentially growing cells, low levels of PHB synthesis are due to inhibition of β -keto-thiolase activity and to a low level of *phbR* transcription. Upon entry into the stationary phase, the increase in transcription of *rpoS* and *phbR* increases transcription of the *phbBAC* operon, elevating the levels of the PHB biosynthetic enzymes. In addition, the tricarboxylic acid cycle activity might slow down during the stationary phase, allowing an increase in the acetyl-CoA/CoA ratio and in turn relieving the inhibitory effect on β -keto-thiolase.

In summary, this study showed that control of synthesis of PHB in *A. vinelandii* is regulated at the transcriptional level and that the transcriptional activator PhbR is a main regulator.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant 27767 from CONACyT. M. Peralta-Gil thanks CONACyT and PADEP-UNAM for financial support during his Ph.D. studies.

We thank R. Noguez for helpful discussions and S. Moreno for technical support.

REFERENCES

- Alexeyev, F. A., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vivo deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63–67.
- Bali, A., G. Blanco, S. Hill, and C. Kennedy. 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1711–1718.
- Belyaeva, T. A., J. T. Wade, C. L. Webster, V. J. Howard, M. S. Thomas, E. I. Hyde, and S. J. W. Busby. 2000. Transcription activation at the *Escherichia coli* *melAB* promoter: the role of MelR and the cyclic APMP receptor proteinol. *Mol. Microbiol.* **36**:211–222.
- Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Núñez, and G. Espín. 2001. The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **183**:6787–6793.
- De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568–6572.
- Gallegos, M. T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hoffman, and J. L. Ramos. 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:393–410.
- Law, J. H., and R. A. Slepecky. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**:33–36.
- Lee, J. L., and J. D. Gralla. 2001. Sigma 38 (rpoS) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* **276**:30064–30071.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.
- Martínez, P., J. Guzmán, and G. Espín. 1997. A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Lett.* **19**:909–912.
- Matsusaki, H., S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, and Y. Doi. 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61–3. *J. Bacteriol.* **180**:6459–6467.
- Mejía-Ruiz, H., S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**:101–106.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431–435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Niland, P., R. Hühne, and B. Müller-Hill. 1996. How AraC interacts specifically with its target DNAs. *J. Mol. Biol.* **264**:667–674.
- Núñez, C., S. Moreno, L. Cardenas, G. Soberón-Chávez, and G. Espín. 2000. Inactivation of the *ampDE* operon increases transcription of *algD* and affects morphology and encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**:4829–4835.
- Pettinari, J. M., G. J. Vázquez, D. Silberschmidt, B. Rehm, A. Steinbüchel, and B. S. Mendez. 2001. Poly(3-hydroxybutyrate) synthase genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5331–5334.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Segura, D., and G. Espín. 1998. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* *ptsP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**:4790–4798.
- Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. Ritchie, and E. A. Dawes. 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **128**:1193–1201.
- Senior, P. J., and E. A. Dawes. 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**:225–238.
- Servín-González, L., C. Castro, C. Pérez, M. Rubio, and F. Valdez. 1997. *bltA*-dependent expression of *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (*lipA*) in mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **179**:7816–7826.
- Tamai, E., T. A. Belyaeva, S. J. W. Busby, and T. Tsuchiya. 2000. Mutations that increase the activity of the promoter of the *Escherichia coli* melobiose operon improve the binding of MelR, a transcriptional activator triggered by melobiose. *J. Biol. Chem.* **275**:17058–17063.
- Valdez, F., G. González-Cerón, H. M. Keiser, and L. Servín-González. 1999. The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. *Microbiology* **145**:2365–2374.
- Wade, J. T., T. A. Belyaeva, E. I. Hyde, and S. J. W. Busby. 2000. Repression of the *Escherichia coli* *melR* promoter by MelR: evidence that efficient repression requires the formation of a repression loop. *Mol. Microbiol.* **36**:223–229.
- Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akkermans, and R. A. Jefferson. 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies in rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**:1691–1705.
- Wu, G., S. Hill, M. J. S. Kelly, G. Sawers, and R. K. Poole. 1997. The *cydR* gene product, required for cytochrome *bd* expression in the obligate aerobic *Azotobacter vinelandii*, is a Fnr-like protein. *Microbiology* **143**:2197–2207.
- Wu, G., H. Cruz-Ramos, S. Hill, J. Green, G. Sawers, and R. K. Poole. 2000. Regulation of cytochrome *bd* expression in the obligate aerobic *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr): sensitivity to oxygen reactive oxygen species and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **275**:4679–4686.
- Wu, G., A. J. Moir, G. Sawers, S. Hill, and R. K. Poole. 2001. Biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobic *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**:215–220.

1. **Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, and F. O'Gara.** 2000. A Regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **182** (14): 3913-3919.
2. **Agarwal N. and A. K. Tyagi.** 2003. Role of 5'-TGN-3' motif in the interaction of mycobacterial RNA polymerase with a promoter of 'extended-10' class. *FEMS Microbiology Letters.* **225**: 75-83.
3. **Alexeyev, F. A., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan.** 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassette and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vivo deletion insertion mtagenesis. *Gene.* **160**: 63-67.
4. **Anderson, A. J., and E. A. Dawes.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54** (4): 450-472.
5. **Andersson, R. A., E. T. Palva, and M. Pirhonen.** 1999. The response regulator ExpM is essential for the virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and acts negatively on the sigma factor RpoS (σ^S). *Molecular Plant-Microbe Interaction.* **12** (7): 575-584.
6. **Andersson, R. A., V. Koiv, C. Norman-Setterblad, and M. Pirhonen.** 1999. Role of RpoS in virulence and stress tolerance of the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiol.* **145**: 3547-3556.
7. **Barne K. A., J. A. Bown, S. J. W. Busby and S. D. Minchin.** 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *The EMBO Journal.* **16** (13): 4034-4040.
8. **Bashyam M. D. and A. K. Tyagi.** 1998. Identification and analysis of "extended -10" promoters from Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **180** (9): 2568-2573.
9. **Becker G. and R. Hengge-Aronis.** 2001. What makes an *Escherichia coli* promoter σ^S dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^S . *Mol. Microbiol.* **39** (5): 1153-1165.
10. **Beijlsma, J. J. E., and E. A. Groisman.** 2003. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component system. *TRENDS in Microbiology.* **11** (8). 359-366.
11. **Belyaeva, T. A., J. T. Wade, Ch. L. Webster, V. J Howard, M. S. Thomas, E. I. Hyde, and S. J. W. Busby.** 2000. Transcription activation at the *Escherichia coli melAB* promoter: the role of MeIR and the cyclic AMP receptor protein. *Mol. Microbiol.* **36** (1): 211-222.
12. **Bertani, I., M. Sevo, M. Kojic, and V. Venturi.** 2003. Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS/RpoS* in *Pseudomonas*. *Arch. of Microbiol.* **180** (4): 264-271.
13. **Bhende, P. M. and S. M. Egan.** 2000. Genetic evidence that transcription activation by RhaS involves specific amino acid contacts with Sigma 70. *J. Bacteriology.* **182**(17):4959-4969.
14. **Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller.** 1990. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* **41**: 77-93.
15. **Burr T., J. Mitchell, A. Kolb, S. Minchin and S. Busby.** 2000. DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Research.* **28** (9): 1864-1870.
16. **Camacho A., and M. Salas.** 1999. Effect of mutations in the "extended -10" motif of three *Bacillus subtilis* σ^A -RNA polymerase-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* **286**: 683-693.
17. **Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno, and G. Espín.** 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**(9):2624-2628.
18. **Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Núñez, and G. Espín.** 2001. The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **183** (23): 6787-6793.
19. **Cevallos M. A., S. Encarbación, A. Leija, Y. Mora, and J. Mora.** 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **178** (6): 1646-1654.
20. **Chancey, S. T., D. W. Wood, and L. S. Pierson III.** 1999. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (6): 2294-2299.
21. **Chatterjee, A., Y. Cui, H. Yang, A. Collmer, J. R. Alfano, and A. K. Chatterjee.** 2003. GacA, the response

- regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16** (12): 1106-1117.
22. **Chen, H., H. Tang, and R. H. Ebrigh.** 2003. Functional interaction between RNA polymerase α subunit C-terminal domain and σ^{70} in UP-element and activator dependent transcription. *Molecular Cell*. **11**: 1621-1633.
 23. **Colland F., N. Fujita, D. Kotlarz, J. A. Brown, C. F. Meares, A. Ishihama and A. Kolb.** 1999. Positioning of σ^S , the stationary phase σ factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes. *The EMBO Journal*. **18** (14): 4049-4059.
 24. **Cook, A. M., and H. G. Schlegel.** 1978. Metabolite concentrations in *Alcaligenes eutrophus* H16 and a mutant defective in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* **119**: 231-235.
 25. **Corbell, N., and J. E. Loper.** 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **177** (21): 6230-6236.
 26. **Cruz Arellano T. Judith.** 2000. Caracterización del gen *phbB* de *Azotobacter vinelandii*, involucrado en la producción del polyester natural polihidroxibutirato (PHB). Tesis de licenciatura. Instituto de Biotecnología. UNAM.
 27. **Cui, Y., A. Chatterjee, and A. K. Chatterjee.** 2001 Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpin_{Ecc}. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. **14** (4): 516-526.
 28. **De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
 29. **Duffy, B. K., and G. Défago.** 2000. Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (8): 3142-3150.
 30. **Egan, S. M.** 2002. Growing repertoire of AraC/XyIS activators. *J. Bacteriol.* **184** (20): 5529-5532.
 31. **Encarnación S., M. Dunn, K. Willms, and J. Mora.** 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **177** (11): 3058-3066.
 32. **Eriksson. A. R. B., R. A. Andersson, M. Pirhonen, and E. T. Palva.** 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. **11** (8): 743-752.
 33. **Fiedler, S., A Steinbüchel, and B. H. A. Rehm.** 2000. PhaG-mediated synthesis of poly (3-Hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (5): 2117-2124.
 34. **Fukui, T., T. Kichise, T Iwata, and Y. Doi.** 2001. Characterization of 13 kDa granule-associated protein in *Aeromonas caviae* and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria. *Biomacromolecules*. **2**:148-153.
 35. **Gallegos, M. T., C. Michán, and J. L. Ramos.** 1993. The XyIS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Research*. **21**(4): 807-810.
 36. **Gallegos, M. T., S. Marqués, and J. L. Ramos.** 1996. The TACAN₄TGCA motif upstream from the -35 Region in the σ^{70} - σ^S dependent Pm promoter of the TOL plasmid is the minimum DNA segment required for transcription stimulation by XyIS regulators. *J. Bacteriol.* **178** (22): 6427-6434.
 37. **Gallegos, M. T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J. L. Ramos.** 1997. AraC/XyIS Family of Transcriptional Regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61** (4): 393-410.
 38. **Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. C. Lin.** 1999. Amplification of signaling activity of the Arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. *The Journal of Biological Chemistry*. **274** (50): 35950-35954.
 39. **Goodier, R. I. and B. M. M. Ahmer.** 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J. Bacteriol.* **183** (7): 2249-2258.
 40. **Grainger, D. C., Ch. L. Webster, T. A. Belyaeva, E. I. Hyde and S. J. W. Busby.** 2004. Transcription activation at the *Escherichia coli melAB* promoter: interactions of MelR with its DNA target site and with domain 4 of the RNA polymerase σ subunit. *Mol. Microbiol.* **51** (5): 1297-1309.

41. Grainger, D. C., T. A. Belyaeva, D. J. Lee, E. I. Hyde and S. J. W. Busby. 2004. Transcription activation at the *Escherichia coli melAB* promoter: interactions of MelR with the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Mol. Microbiol.* **51** (5): 1311-1320.
42. Grewal, S. I. S., B. Han, and K. Johnstone. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J. Bacteriol.* **177** (16): 4658-4668.
43. Griebel, R., Z. Smith, and J. M. Merrick. 1968. Metabolism of Poly- β -Hydroxybutyrate. I. Purification, Composition, and Properties of Native Poly- β -Hydroxybutyrate. Granules from *Bacillus megaterium*. *BIOCHEMISTRY.* **7**(10): 3676-3681
44. Haas, D., Ch. Keel and C. Reimmann. 2002. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 385-395.
45. Hai, T., S. Hein, and A. Steinbüchel. 2001. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus sp.* strain MA 19. *Microbiol.* **147**: 3047-3060.
46. Hammer, B. K., E. S. Tateda, and M. S. Swanson. 2002. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **44** (1): 107-118.
47. Hankermeyer, Ch. R., and R. S. Tjeerdema. 1999. Polyhydroxybutyrate: Plastic made and degraded by microorganisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **159**: 1-24.
48. Harley C. B., and R. P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Research.* **15** (5): 2343-2361.
49. Hawley D. K., and W. R. McClure. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Research.* **11**: 2237-2255.
50. Haywood, G. W., A. J. Anderson, L. Chu, and E. A. Dawes. 1988. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters.* **52**: 259-264.
51. Heeb, S. and D. Haas. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **14** (12): 1351-1363.
52. Heeb, S., C. Blumer, and D. Haas. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* **184** (4): 1046-1056.
53. Hein, S., H. Tran, and A. Steinbüchel. 1998. *Synechocystis sp.* PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch Microbiol.* **170**: 162-170.
54. Hellingwerf, K. J., P. W. Postma, J. Tommassen, and H. V. Westerhoff. 1995. Signal transduction in bacteria: phosphoneural network(s) in *Escherichia coli*? *FEMS Microbiology Reviews.* **16**: 309-321.
55. Henderson, R. A., C. W. Jones. 1997. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase.
56. Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **66** (3): 373-395.
57. Hoffmann, N., A. Steinbüchel and B. H. A. Rehn. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiology Letters.* **184**: 253-259.
58. Hoffmann, N., A. A. Amara, Br. B. Beermann, H. J. Hinz, and B. H. H. Rehm. 2002. Biochemical characterization of the *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase which diverts intermediates of fatty acid *de novo* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277** (45): 42926-42936.
59. Holcroft, C. C., and S. M. Egan. 2000. Roles of cyclic AMP receptor protein and the carboxyl-terminal domain of the α subunit in transcription activation of the *Escherichia coli rhaBAD* operon. *J. Bacteriol.* **182** (12): 3529-3535.
60. Hong, S. H., S. J. Park, S. Y. Moon, J. P. Park, and S. Y. Lee. 2003. In silico prediction and validation of the importance

- of the Entner-Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. **83** (7): 854-863.
61. **Howard, V. J., T. A. Belyaeva, S. J. W. Busby, and E. I. Hyde.** 2002. DNA binding of the transcription activator protein MelR from *Escherichia coli* and its C-terminal domain. *Nucleic Acids Research*. **30** (12): 2629-2700.
 62. **Huisman, G. W., E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra, and B. Witholt.** 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*: Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* **266** (4): 2191-2198.
 63. **Hyytiäinen, H., M. Montesano, and E. T. Palva.** 2001. Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14** (8): 931-938.
 64. **Ishihama A.** 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 499-518.
 65. **Jackson, F. A., and E. Dawes.** 1976. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen or oxygen limitation. *Journal of General Microbiology*. **97**: 303-312.
 66. **James B. W., W. S. Mauchline, P. J. Dennis, C. W. Keevil, and R. Wait.** 1999. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, and energy source for survival in low-nutrient environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (2): 822-827.
 67. **Jendrossek, D., and R. Handrick.** 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 403-32
 68. **Jia, Y., W. Yuan, J. Wodzinska, Ch. Park, A. J. Sinskey, and J. Stubbe.** 2002. Mechanistic studies on class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: Class I and III synthases share a similar catalytic mechanism. *Biochemistry*. **40**: 1011-1019.
 69. **Johnson, C. M., and R. F. Schleif.** 2000. Cooperative action of the catabolite activator protein and AraC in vitro at the *araFGH* promoter. *J. Bacteriol.* **182** (7): 1995-2000.
 70. **Jung, Y., J. S. Park., and Y. H. Lee.** 2000. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. **26**: 201-208.
 71. **Jurasek, L., and R.H. Marchessault.** 2002. The role of phasins in the morphogenesis of poly(3-hydroxybutyrate) granules. *Biomacromolecules*. **3**: 256-261.
 72. **Kabir, M. Md., and K. Shimizu.** 2003. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly (3-hydroxybutyrate) production. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **62** (2-3): 244-255.
 73. **Kadouri, D., S. Burdman S., E. Jurkevitch, and Y. Okon.** 2002. Identification and isolation of genes involved in poly (β -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (6): 2943-2949.
 74. **Kang, B. R., B. H. Cho, A. J. Anderson and Y. Ch. Kim.** 2004. The global regulator GacS of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates transcription from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor and effects survival in oxidative stress. *Gene*. **325**: 137-147.
 75. **Kinscherf, T. G., and D. K. Willis.** 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *J. Bacteriol.* **181** (13): 4133-4136.
 76. **Klinke, S., M. Dauner, G. Scott, B. Kessler, and B. Witholt.** 2000. Inactivation of isocitrate lyase leads to increased production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (3): 909-913.
 77. **Korotkova, N, L. Chistoserdova, and M. E. Lidstrom.** 2002. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*. *J. Bacteriol.* **184** (22): 6174-6181
 78. **Kranz, R. G., K. K. Gabbert, T. A. Locke, and M. T. Madigan.** 1997. Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: Genes, mutants, expression, and physiology. *Environmental Microbiology*. **63** (8): 3003-3009.

79. Kumar A., B. grimes, N. Fijita, K. Makino, R. A. Malloch, R. S. Hayward and A. Ishihama. 1994. Role of the sigma σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *J. Mol. Biol.* **235**: 405-413.
80. Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, and B. Witholt. 1998. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (12): 2924-2932.
81. Lee, I. Y., M. K. Kim, H. N. Chang, and Y. H. Park. 1995. Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters.* **131**: 35-39.
82. Lee S. J., and J. D. Gralla. 2001. Sigma 38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *The Journal of Biological Chemistry.* **276** (32): 30064-30071.
83. Lee, J.-N., H.-D. Shin, and Y.-H. Lee. 2003. Metabolic engineering of pentose phosphate pathway in *Ralstonia eutropha* for enhanced biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate. *Biotechnol. Prog.* **19**: 1444-1449.
84. Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering.* **49**: 1-14.
85. Lee, S. Y., H. H. Wong, J. Choi, S.H. Lee, S. Ch. Lee, and Ch. S. Han. 2000. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. *Biotechnology and Bioengineering.* **68** (4): 466-470.
86. Lee, T. R., J. S. Lin, S. S. Wang, and G. C. Shaw. 2004. PhaQ, a new class of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB)-responsive repressor, regulates *phaQ* and *phaP* (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB. *J. Bacteriol.* **186** (10): 3015-21.
87. Lesley, J. A., and C. D. Waldburger. 2003. Repression of *Escherichia coli* PhoP-PhoQ signaling by acetate reveals a regulatory role for acetyl coenzyme A. *J. Bacteriol.* **185** (8): 2563-2570.
88. Liebergesell, M., and A. Steinbüchel. 1996. New knowledge about the PHA-locus and P(3HB) granule-associated proteins in *Chromatium Vinosum*. *Biotechnology Letters.* **18** (6): 719-724.
89. Lissner S. and H. Margalit. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Research.* **21** (7): 1507-1516.
90. Lobell, R. B., and R. F. Schleif. 1991. AraC-DNA looping: Orientation and distance-dependent loop breaking by the cyclic AMP receptor protein. *J. Mol. Biol.* **218**: 45-54.
91. Madison, L. L., and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (1): 21-53.
92. Maehara, A., S. Ueda., H. Nakano, and T. Yamane. 1999. Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* **181** (9): 2914-2921.
93. Maehara, A., S. Taguchi, T. Nishiyama, T. Yamane, and Y. Doi. 2002. A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *J. Bacteriol.* **184** (9): 3992-4002.
94. Maehara, A., T. Yamane, S. Taguchi, and Y. Doi. 2001. Molecular characterization of a regulatory protein (PhaR) involved in PHA biosynthesis. *RIKEN Review.* **42**: 77-80.
95. Maehara, A., Y. Doi, T. Nishiyama, Y. Takagi, S. Ueda, H. Nakano, and T. Yamane. 2001. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression in vitro. *FEMS Microbiology Letters.* **200**: 9-15.
96. Manchak, J., and W. J. Page. 1994. Control of polyhydroxyalkanoates synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiol.* **140**: 953-963.
97. Marqués S., M. T. Gallegos and J. L. Ramos. 1995. Role of σ^S in transcription from the positively controlled Pm promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. **18** (5): 851-857.
98. Martin, R. G. and J. L. Rosner. 2002. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol. Microbiol.* **44** (6): 1611-1624.
99. Martínez, P., J. Guzmán, and G. Espín. 1997. A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly-

- β -hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnology Letters*. **19** (9): 909-912.
100. **Martínez-Salazar, J., S. Moreno, R. Nájera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez and V. Deretic.** 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 1800-1808.
 101. **Matsubara, M., S.-I. Kitoaka, S.-I. Takeda, and T. Mizuno.** 2000. Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by His-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes to Cell*. **5**: 555-569.
 102. **Matsumoto, K., H. Matsusaki, K. Taguchi, M. Seki, and Y. Doi.** 2002. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoate inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*. **3**: 787-792
 103. **Matsusaki, H., S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, and Y. Doi.** 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.* **180** (24): 6459-6467
 104. **McCool, G. J., and M. C. Cannon.** 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **181** (2): 585-592.
 105. **McCool, G. J., and M. C. Cannon.** 2001. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriology*. **183** (14): 4235-4243.
 106. **McCracken A., M. S. Turner, P. Giffard, L. M. Hafner and p. Timms.** 2000. Analysis of promoter sequences from *Lactobacillus* and *Lactococcus* and their activity in several *Lactobacillus* species. *Arch. Microbiol.* **173**: 383-389.
 107. **Medvedkin, V. N., E. A. Permyakov, L. V. Klimenko, Y. V. Mitin, N. Matsushima, S. Nakayama, and R. H. Kretsinger.** 1995. Interactions of (Ala*Ala*Lys*Pro) $_n$ and (Lys*Lys*Ser*Pro*) $_n$ with DNA. Proposed coiled-coil structure of AlgR3 and AlgP from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Engineering*. **8** (1): 63-70.
 108. **Minakhin L., and K. Severinov.** 2003. On the role of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} region 4.2 and α -subunit C-terminal domains in promoter complex formation on the extended -10 *galP1* promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. **278** (32): 29710-29718.
 109. **Mitchell J. E., D. Zheng, S. J. W. Busby and S. D. Minchin.** 2003. Identification and analysis of 'extended-10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. **131** (16): 4689-4695.
 110. **Miyake, M., K. Kataoka, M. Shirai, and Y. Asada.** 1997. Control of poly- β -hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in Cyanobacteria. *J. Bacteriology*. **179** (16): 5009-5013.
 111. **Miyamoto, C. M., W. Sun, E. A. Meighen.** 1998. The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. *Biochimica Et biophysica Acta*. **1384**:356-364.
 112. **Moshiri, F., J. W. Kim, Ch. Fu, and R.J. Maier.** 1994. The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo. *Mol. Microbiol.* **14** (1): 101-114.
 113. **Mukhopadhyay, S. J. P. Audia, R. N. Roy, and H. E. Schellhorn.** 2000. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol. Microbiol.* **37** (2): 371-381.
 114. **Noguéz, R.** 2003. estudio de la participación de las proteínas Npr y IIA^{Ntr} de la síntesis de PHB y el enquistamiento en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM.
 115. **Opel M. L., S. M. Arfin and G. W. Hatfield.** 2001. The effects of DNA supercoiling on the expression of operons of the *ilv* regulon of *Escherichia coli* suggest a physiological rationale for divergently transcribed operons. *Mol. Microbiol.* **39** (5): 1109-1115.
 116. **Oppenheim, J., and L. Marcus.** 1970. Correlation of ultrastructure in *Azotobacter vinelandii* with nitrogen source for growth. *J. Bacteriol.* **101** (1): 286-291.
 117. **Ozoline O. N., A. A. Deev and M. V. Arkhipova.** 1997. Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*. **25** (23): 4703-4709.

118. **Page, W. J.** 1989. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Applied Microbiology Biotechnology*. **31**: 329-333.
119. **Page, W. J., and O. Knosp.** 1989. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (6): 1334-1339.
120. **Page, W. J., A. Tindale, M. Chandra, and E. Kwon.** 2001. Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly- β -hydroxybutyrate. *Microbiol.* **147**: 483-490.
121. **Parkins, M. D., H. Ceri, and D. G. Storey.** *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **40**: 1215-1226.
122. **Peña, C., L. Miranda, D. Segura, C. Nuñez, G. Espín, and E. Galindo.** 2002. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly- β -hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **29**: 209-213.
123. **Pérez, M. G., J. L. Ramos, M. T. Gallegos, and S. Marqués.** 1999. Critical nucleotides in the Upstream Region of the XyIS-dependent TOL meta-Cleavage Pathway Operon Promoter as Deduced from Analysis of Mutants. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(4):2286-2290.
124. **Pernestig, A. K., O. Melefors, and D. Georgellis.** 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. **276** (1): 225-231.
125. **Pernestig, A. K., D. Georgellis, T. Romeo, K. Susuki, H. Tomeniuss, S. Normark, and Ö Melefors.** 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J. Bacteriol.* **185** (3): 843-853.
126. **Pessi, G., and D. Haas.** 2001. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiology Letters*. **200**: 73-78.
127. **Pettinari, M. J., G. J. Vázquez, D. Silberschmidt, B. Rehm, A. Steinbüchel, and B. S. Méndez.** 2001. Poly(3-Hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (11): 5331-5334
128. **Pettinari, M. J., L. Chaneton, G. Vazquez, A. Steinbüchel, and B. S. Méndez.** 2003. Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid*. **50**: 36-44.
129. **Pieper-Fürst, U., M. H. Madkour, F. Mayer, and A. Steinbüchel.** 1994. Purification and Characterization of a 14-Kilodalton Protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *J. Bacteriol.* **176** (14) 4328-4337.
130. **Pieper-Fürst, U., M. H. Madkour, F. Mayer, and A. Steinbüchel.** 1995. Identification of the region of a 14-Kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *J. Bacteriol.* **177** (9): 2513-2523.
131. **Plumbridge, J., and O. Pellegrini.** 2004. Expression of the chitobiose operon of *Escherichia coli* is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP. *Mol. Microbiol.* **52** (2): 437-449.
132. **Pötter, M., M. H. Madkour, F. Mayer, and A. Steinbüchel.** 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Micobiol.* **148**: 2413-2426.
133. **Pozo, C., M. V. Martínez, B. Rodelas, and J. G. López.** 2002. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J. Biotechnol.* **97** (2): 125-131.
134. **Pries, A., H. Priefert, N. Krüger, and A. Steinbüchel.** 1991. Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(β -hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173** (18): 5843-5853.
135. **Prieto, M. A., B. Bühler, K. Jung, B. Witholt, and B. Kessler.** 1999. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GP01 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* **181** (3): 858-868.
136. **Ramos-Comerzana, A., y M. Monteoliva-Sanchez,** 2000. Potencial Biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola. *Ars. Pharmaceutica*. **41** (1): 129-136.

137. Reddy C. S. K., R. Ghai, Rashmi, and V. C. Kalia. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. **87**: 137-146.
138. Rehm, B. H. A., and A. Steinbüchel. 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. **25**: 3-19.
139. Rehm, B. H. A. 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J*. **376**: 15-33.
140. Reimmann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, and D. Haas. 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyl-L-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* **24** (2): 309-319.
141. Reusch, R. N., and H. L. Sadoff. 1988. Putative structure and functions of a poly- β -hydroxybutyrate/epsilon-calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 4176-4180.
142. Rhodius, V. A., and S. J. W. Busby. 1998. Positive activation of gene expression. *Current Opinion in Microbiology*. **1**: 152-159.
143. Rich, J. J., T. G. Kinscherf, T. Kitten, and D. K. Willis. 1994. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176** (24): 7468-7475.
144. Ruiz, R., J. L. Ramos, and S. M. Egan. 2001. Interactions of the XylS regulators with the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit influence the expression level from of the cognate Pm promoter. *FEBS Letters*. **491**: 207-211.
145. Ryu, S., and S. Garges. 1994. Promoter switch in the *Escherichia coli pts* operon. *The Journal of Biological Chemistry*. **269** (7): 4767-4772.
146. Saad, B., P. Neuenschwander, G. K. Uhlschmid and U. W. Suter. 1999. New versatile, elastomeric, degradable polymeric material for medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*. **25**: 293-301
147. Sabra, W., A.-P. Zeng, H. Lünsdorf, and W.-D. Deckwer. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (9): 4037-4044.
148. Sadoff, H. L. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. **39** (4): 516-539.
149. Sahu, S. N., S. Acharya, H. Tuminaro, I. Patel, K. Dudley, J. E. LeClerc, T. A. Cebula, and S. Mukhopadhyay. 2003. The bacterial adaptive response gene, *barA*, encodes a novel conserved histidine kinase regulatory switch for adaptation and modulation of metabolism in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **253**: 167-177.
150. Salehizadeh, H., and M. C. M. Van Loosdrecht. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. **22**: 261-279.
151. Sarniguet, A., J. Kraus, M. D. Henkels, A. M. Muehlchen, and J. E. Loper. 1995. The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 12255-12259.
152. Schembri, M. A., A. A. Woods, R. C. Bayly, and J. K. Davies. 1995. Identification of a 13-kDa protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules from *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters*. **133**: 277-283.
153. Schembri, M. A., R. C. Bayly, and J. K. Davies. 1995. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* **177** (15): 4501-4507.
154. Schmider-keel, U., A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. G. Bonnefoy, C. Reimmann, R. Notz, G. Défago, D. Haas, and Ch. Keel. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J. Bacteriol.* **182** (5): 1215-1225.
155. Schmidt-Eisenlohr, H., A. Gast, and Ch. Baron. 2003. Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (3): 1817-1826.
156. Schubert, P., N. Krüger, and A. Steinbüchel. 1991. Molecular Analysis of the *Alcaligenes eutrophus* Poly (3-Hydroxybutyrate) Biosynthetic Operon: Identification of the N Terminus of Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthase and

- Identification of the Promoter. *Journal of Bacteriology*. **173** (1): 168-175.
157. Scott, C., J. D. Partridge, J. R. Stephenson, and J. Green. 2003. DNA target sequence and FNR-dependent gene expression. *FEBS Letters*. **541**: 97-101.
 158. Segura, D., and G. Espín. 1998. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180** (18): 4790-4798.
 159. Segura, D., E. Vargas and G. Espín. 2000. β -ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene*. **260**: 113-120
 160. Segura, D., T. Cruz, and G. Espín. 2003. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* **179**: 437-443.
 161. Segura, D., and G. Espín. 2003. *Azotobacter vinelandii* mutant that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63** (2): 159-163.
 162. Segura, D., and G. Espín. 2004. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. PMID: 15127163.
 163. Senior, P. J., and E. A. Dawes. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**: 55-66.
 164. Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. F. Ritchie, and E. A. Dawes. 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **128**: 1193-1201.
 165. Senior, P. J., and E. A. Dawin. 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beinjerinchii*. *Biochem J.* **134**: 225-238.
 166. Seo M.-Ch., H.-D. Shin, and Y.-H. Lee. 2003. Functional role of granule-associated genes, *phaP* and *phaR*, in poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *E. coli* harboring *phbCAB* operon. *Biotechnology Letter*. **25**: 1243-1249.
 167. Slater S., K. L. Houmiel, M. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgett and K. J. Gruys. 1998. Multiple β -ketothiolases mediate poly (β -hydroxyalkanoates) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **180** (8): 1979-1987.
 168. Socolofsky, M. D., and O. Wyss. 1962. Resistance of the *Azotobacter* cyst. *J. Bacteriol.* **84**: 119-124.
 169. Steinbuchel, A. and B. Fuchtenbusch. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *TIBTECH* **16**: 119-127.
 170. Stevenson, L. H., and M. D. Socolofsky. 1966. Cyst formation and Pol- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91** (1): 304-310.
 171. Stock, A. M. V. L. Robinson, and P. N. Goudreau. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215.
 172. Sugiura M., H. Aiba. And T. Mizuno. 2003. Identification and classification of two-component system that affect *rpoS* expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (7): 1612-1615.
 173. Suh, S. J., L. Silo-Suh, D. E. Woods, D. J. Hassett, S. E. H. West, and D. E. Ohman. 1999. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181** (13): 890-897.
 174. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of Poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
 175. Taylor, B. L., and I. B. Zhulin. 1999. PAS domains: Internal sensor of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63** (2): 479-506.
 176. Tchieu, J. H., V. Norris, J. S. Edwarda, and M. H. Saier, Jr. 2001. The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3** (3): 329-346.
 177. Timm, A., and A. Steinbüchel. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* **209**: 15-30.
 178. Van der Walle, G. A. M., G. J. M. de Koning, R. A. Weusthuis, and G. Eggink. 2001. Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **71**: 263-291.
 179. Vargas-García, M. C., M. J. López, M. A. Elorrieta, F. Suárez, and J. Moreno. 2002. Physiology of exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* from 4-

- hydroxybenzoic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **29**: 129-133.
180. **Venturi, V.** 2003. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol. Microbiol.* **49** (1): 1-9.
181. **Voskuil M. I. K. Voskuil, K. Voepel and G. H. Chambliss.** 1995. The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **17** (2): 271-279.
182. **Wakisaka, Y., E. Masaki, and Y. Nishimoto.** 1982. Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- β -hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** (6): 1473-1480.
183. **Ward, A. C., B. I. Rowley, and E.A. Dawes.** 1977. Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. *Journal of General Microbiology*. **102**: 61-68.
184. **Whistler, Ch. A., N. A. Corbell, A. Sarniguet, W. Ream, and E. Loper.** 1998. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **180** (24): 6635-6641.
185. **Wieczorek, R., A. Pries, A. Steinbuchel, and F. Mayer.** 1995. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **177** (9): 2425-2435.
186. **Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akkermans, and R. A. Jefferson.** 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies in rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**: 1691-1705.
187. **Williams, S. F., D. P. Martin, D. M. Horowitz and O. P. Peoples.** 1999. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. **25**: 111-121.
188. **Wong, S. M., P. A. Carroll, L. G. Rahme, F. M. Ausubel and S. B. Calderwood.** 1998. Modulation of expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infection and Immunity*. **66** (12): 5854-5861.
189. **Wood, T. I., K. L. Griffith, W. P. Fawcett, K.-W. Jair, T. D. Schneider, and R. E. Wolf Jr.** 1999. Interdependence of the position and orientation of SoxS binding sites in the transcriptional activation of the class I subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible promoters. *Mol. Microbiol.* **34** (3): 414-430.
190. **Wösten, M. M. S. M.** 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology reviews*. **22**: 127-150.
191. **Wu, G., A. J. G. Moir, G. Sawers, S. Hill and E. K. Poole.** 2001. Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*. **194**: 215-220.
192. **Yannone S. M. and B. K. Burgess.** 1997. Identification of a palindromic sequence that is responsible for the up-regulation of NAPDH-ferredoxin reductase in a ferredoxin I deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (22): 14454-14458.
193. **York, G. M., B. H. Junker, J. Stubbe, and A. J. Sinskey.** 2001. Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *J. Bacteriol.* **183** (14): 4217-4226.
194. **York, G. M., J. Stubbe, and A. J. Sinskey.** 2001. New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **183** (7): 2394-2397.
195. **Zinn, M., B. Witholt, and Tl Egli.** 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **53**: 5-21.
196. **Zuber, S. F. Carruthers, Ch. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb, C. Reimann, and Dieter Haas.** 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16** (7): 634-644.