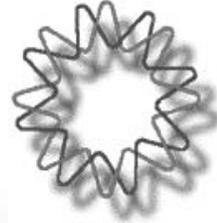


Regulación de la síntesis de PHB en
Azotobacter vinelandii.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



El papel de las proteínas NPr y IIA^{Ntr} en la vía de señalización entre la enzima I^{Ntr} y la síntesis de PHB, el enquistamiento y la fijación de nitrógeno en *Azotobacter vinelandii*.

¿Señal intracelular?

¿Intermediarios?

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS: PRESENTA:

El Maestro en Biotecnología: Raúl Noguez Moreno.

Directora: Doctora Elda Guadalupe Espín Ocampo

Cuernavaca, Morelos, Mayo del 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



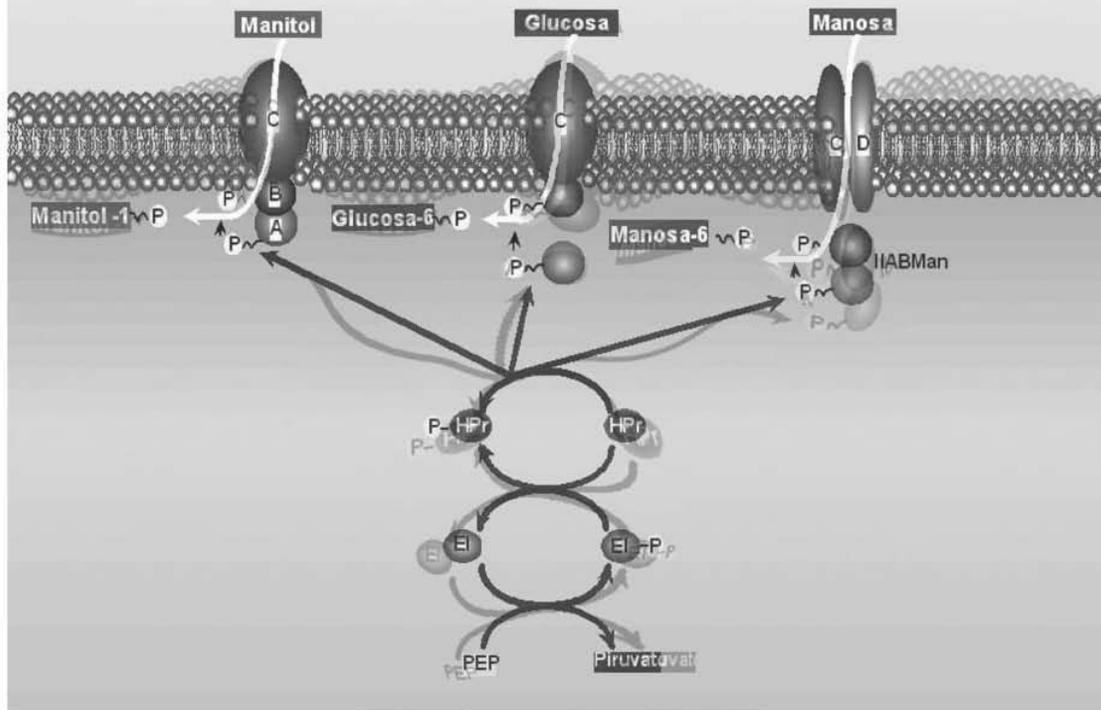
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

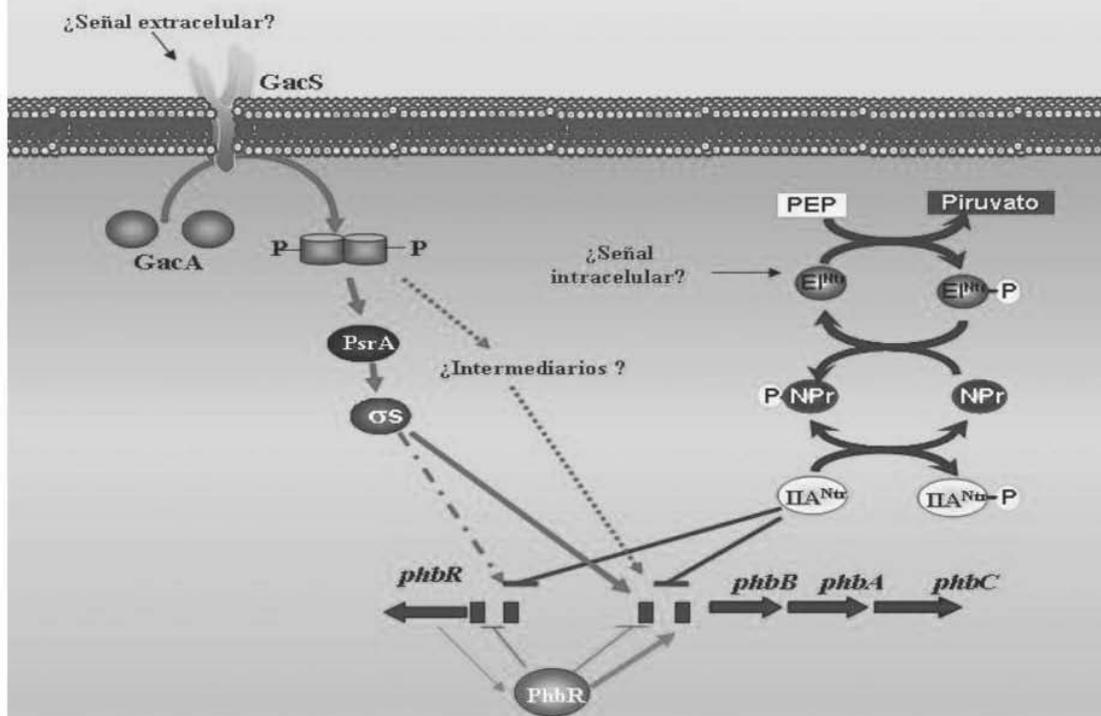
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Sistemas de transporte y fosforilación de carbohidratos en bacterias



Regulación de la síntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii*.



I.- Resumen

Azotobacter vinelandii es una bacteria del suelo fijadora de nitrógeno que durante condiciones de crecimiento óptimo presenta una forma típica de cacahuete. Sin embargo en respuesta a condiciones de estrés, esta célula se diferencia para formar quistes resistentes a la desecación. El crecimiento vegetativo y la formación de quistes están asociados a la síntesis de polímeros tales como el alginato; (exopolisacárido extracelular), los alquilresorcinoles, (lípidos fenólicos que forman parte de la envoltura del quiste) y el β -polihidroxibutirato (PHB, el cual es un poliéster intracelular que se almacena como fuente de energía para la bacteria). El PHB es un polímero de interés industrial, porque puede ser utilizado por la industria manufacturera en la generación de insumos desechables biodegradables como un sustituto de plásticos derivados del petróleo.

En nuestro grupo de investigación existe el interés en estudiar la genética molecular de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*. En un trabajo previo se encontró que una mutante en el gen *ptsP* de *A. vinelandii* presenta una reducida capacidad en la acumulación de PHB, es incapaz de crecer en 0.2 % de glucosa en condiciones de fijación de nitrógeno y no forma quistes resistentes a desecación. El gen *ptsP* codifica para la enzima (EI^{Ntr}), del sistema de transporte y fosforilación de azúcares relacionadas a nitrógeno (PTS^{Ntr}). En *E. coli* y en otras bacterias tales como *Pseudomonas putida* se ha demostrado que EI^{Ntr} forma una cascada de fosforilación específica junto con las proteínas NPr y IIA^{Ntr}, y participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno y del carbono, aunque los mecanismos moleculares están poco entendidos. El objetivo de este trabajo fue conocer el mecanismo molecular por el cual *ptsP* (EI^{Ntr}), *ptsO* (NPr) y *ptsN* IIA^{Ntr}, regulan la producción de PHB en *A. vinelandii*. Los resultados obtenidos indican que el sistema PTS^{Ntr} forma una cascada de fosforilación que participa en la regulación de la acumulación de PHB, regulando de alguna manera la transcripción del regulador *phbR* y el operón biosintético *phbBAC*. Los resultados sugieren que la proteína IIA^{Ntr} en un estado no fosforilado es un regulador negativo de la acumulación de PHB, el enquistamiento y la protección respiratoria de la nitrogenasa.

I. - Summary

Azotobacter vinelandii is a nitrogen-fixing bacterium that during optimal growth conditions has the shape of a peanut. Under conditions of stress, this cell differs in a desiccation-resistant cyst form. The vegetative growth and the encystment are associated to the synthesis of polymers such as alginate (a component the capsule), the alkylresorcinols (fenolic lipids that are part of the outer layer of the cyst) and the polyhydroxybutyrate (PHB, which is an intracellular polyester stored as an energy source). The PHB is a polymer of industrial interest because it can be used as a biodegradable substitute for plastics derived from petroleum.

Our research group is interested in studying the molecular genetics of the synthesis of PHB in *A. vinelandii*. In a previous work it was found that a mutant of *A. vinelandii* (*ptsP*), accumulates less PHB, and is incapable of growing in 0.2% glucose media under conditions of nitrogen fixation. Additionally, this mutant does not form resistant cysts in response to desiccation conditions. The gene *ptsP* codes for Enzyme I (EI^{Ntr}) of the system PEP-PTS which is involved in the transport and phosphorylation of sugars related to nitrogen (NTR). In *E. coli* and in other bacteria such as *Pseudomonas putida* has been demonstrated that EI^{Ntr} forms a cascade of specific phosphorylation together with the proteins NPr and IIA^{Ntr}, and they participate in the regulation of nitrogen and carbon metabolism (although the specific molecular mechanisms are not well understood. The objective of this work was to know the molecular mechanism for the one which *ptsP* (EI^{Ntr}), *ptsO* (Npr) and *ptsN* IIA^{Ntr}, regulates the producción of PHB in *A. vinelandii*. The obtained results indicate that the system PTS^{Ntr} forms a fosforilación cascade that participates in the regulation of the accumulation of PHB, regulating the transcription of *phbR* regulator and the biosintetic operon *phbBAC* somehow. The results suggest that the IIA^{Ntr} protein in a state non fosforilado is a negative regulator of the accumulation of PHB, the enquistamiento and the breathing protection of the nitrogenasa.

II.- Índice

	Pagina
I.- Resumen.....	3
I.- Summary.....	4
II.- Índice.....	5
III.- Introducción	7
III.1.- Los plásticos derivados del petróleo.....	8
III.2.- Los plásticos biodegradables.....	8
III.3.- La importancia del estudio de los polihidroxicanoatos (PHAs).....	9
III.3.1.- Estructura química de los hidroxicanoatos.....	9
III.3.2.- Aplicaciones de los PHAs.....	10
III.3.3.- Acumulación, distribución y función de los PHAs en los seres vivos.....	11
III.4.- Estructura de los gránulos de PHAs.....	12
III.5.- Vías de síntesis de PHAs, genes, enzimas y regulación.....	12
III.5.1.- Tres etapas en la síntesis de PHAs de cadenas cortas.....	13
III.5.1.1.- β -cetoacetyl-CoA reductasa.....	13
III.5.1.2.- Acetoacetyl-CoA reductasa.....	14
III.5.1.3.- PHB sintasa.....	14
III.5.2.- Otras vías para la síntesis de PHAs de cadenas cortas.....	14
III.5.2.1.- Síntesis de PHAs utilizando enoil-CoA hidratasa.....	15
III.5.2.2.- Síntesis de 3-hidroxi-butirato-3-hidroxi-valerato (3-HB-3HV) a partir de azúcares en la vías de malonil-CoA.....	15
III.5.3.- Síntesis de PHAs de cadenas medias, utilizando intermediarios de la β -oxidación.....	16
III.5.4.- Síntesis de PHAs de cadenas medias a partir de carbohidratos.....	17
III. 6.- Genes y sus productos que participan en la biosíntesis de PHAs.....	18
III. 7.- Regulación de la síntesis de PHAs.....	19
III.7.1.- Regulación enzimática de la vía de síntesis de PHAs.....	20
III.7.2.- Regulación de la transcripción de los genes que participan en la síntesis de PHAs.....	20
III.7.3.- Regulación de la degradación de PHAs.....	21
III.8.- El sistema de transporte y fosforilación de azúcares dependientes de fosfo-enol-piruvato (PEP-PTS).....	22
III.8.1.- Los sistemas PTS de <i>E. coli</i>	24
III.8.2.- Regulación del transporte de carbohidratos y del metabolismo del carbono por PTS ^{Glc}	25
III.8.3.- Represión por catabolito y exclusión del inductor.....	25
III.8.4.- Represión por catabolito mediado por Cra y Mlc.....	26

III.8.5.- Reguladores transcripcionales que tienen dominios PTS y dominios regulados por PTS (PRDs).....	27
III.9.- El sistema PTS de bacterias gram-positivas y el control global del metabolismo de azúcares.....	28
IV.4.- El sistema PTS ^{NTR}	30
III.11.- El modelo de estudio.....	32
IV. Antecedentes.....	33
IV.1.- Vía de síntesis de PHAs y su regulación en <i>A. vinelandii</i>	33
IV.2.-Organización de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	33
IV.3.- El sistema de dos componentes GacS/GacA, RpoS, PhbR y su papel en la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	34
IV.4.- Aislamiento y caracterización de la mutante en <i>ptsP</i> de <i>A. vinelandii</i>	35
V.- Hipótesis.....	36
VI. Objetivos.....	37
VII.- Resultados y discusión.....	38
VII.1.- Resultados y discusión parte I (artículo).....	39
VII.1.- Resultados y discusión parte II (complementarios o adicionales).....	
VIII.-Conclusiones.....	85
IX.- Perspectivas.....	86
X.- Bibliografía.....	87
XI.- Abreviaturas.....	91

III.- INTRODUCCION

III.1.- Los plásticos derivados del petróleo.

Los plásticos derivados del petróleo se utilizan en una gran diversidad de productos de la industria manufacturera. Esto se debe a que su estructura puede ser químicamente modificada para dar origen a una gran diversidad de polímeros sintéticos, con extraordinaria versatilidad de fuerzas y formas. Los plásticos sintéticos presentan pesos moleculares entre 50,000 a 100,000 Da (Madison y Huisman., 1999., Reddy *et al.*, 2003). Estos tienen una alta resistencia a los compuestos químicos y pueden ser fácilmente moldeados para hacer películas finas y fibras que presentan cierta flexibilidad, por lo que se ha incrementado la popularidad en su uso en insumos desechables de materiales de empaquetamiento. Lo anterior ha generado un uso indiscriminado de plásticos derivados del petróleo, lo que se refleja en graves problemas de contaminación en el mundo, esto es debido a que son compuestos xenobióticos y recalcitrantes, ya que presentan un tiempo de degradación de aproximadamente 50 años, de tal manera que se calculaba que para 1996, estos plásticos presentaron una acumulación de 25 millones de toneladas anuales (Lee., 1996), y se estimó que en el año 2000, más de 100 millones de toneladas fueron producidas en el mundo. En México se desechan más de 90 millones de botellas por año (Lichtinger, 2003) y junto con otros tipos de plásticos constituyen aproximadamente el 40 % en volumen y 27 % de peso de la basura doméstica. En la actualidad en los Estados Unidos de América hay un consumo de 80Kg. *per capita*, en Europa 60 y en la India 2Kg. Se calcula que el 75 % de los plásticos producidos son vertidos en basureros, y varios cientos de toneladas son desechados cada año en medio ambientes marinos acumulándose en regiones oceánicas (Reddy., *et al.*, 2003).

Una de las estrategias que se ha venido utilizando para deshacerse de los plásticos derivados del petróleo es la incineración, pero esto causa efectos negativos en el ambiente tales como el incremento de CO₂ en la atmósfera y la liberación de otros compuestos químicos muy peligrosos tales como las dioxinas, el cloruro y el cianuro de hidrógeno. Otra estrategia es el reciclaje de plásticos, sin embargo el principal problema que se enfrenta es la clasificación de la gran diversidad de plásticos desechados y los cambios químicos que estos sufren (cuando dos plásticos de diferentes categorías se procesan o siendo el mismo pero si uno de ellos sufrió cambios químicos, hay una disminución en la calidad del plástico resultante). Todo lo anterior ha estimulado la investigación para el desarrollo de materiales y métodos de producción de plásticos biodegradables que presenten las mismas propiedades, pero que tengan un periodo de degradación más corto, con el fin de reducir el impacto en el ambiente y la sustitución de un recurso no renovable como lo es el petróleo (Maddison y Huisman., 1999; Reddy., *et al.*, 2003).

III.2.- Plásticos biodegradables.

Se han desarrollado 4 tipos de plásticos biodegradables, los fotodegradables, los semi-biodegradables, los completamente biodegradables sintéticos y completamente biodegradables naturales. Los plásticos fotodegradables tienen grupos sensibles a luz incorporados directamente al esqueleto del polímero. Después de una gran exposición a la luz ultravioleta (en varias semanas o meses) la estructura polimérica puede desintegrarse en una estructura abierta que le permite ser degradada completamente por bacterias. No obstante, en los rellenos sanitarios, la ausencia de luz hace que permanezcan como material no degradable (Johnstone, *et al.*, 1990). Una vez en los rellenos sanitarios las bacterias degradan los azúcares liberando el polietileno, sin embargo este permanece como material no degradable. Recientemente se ha desarrollado otro tipo de plástico sintético derivado del petróleo que es completamente biodegradable, éste es un polímero de polietanoato que tiene una estructura parecida al del polietano. La presencia de grupos -OH tiene efectos muy importantes. Los más destacados son que el polímero es hidrofílico y por lo tanto soluble en agua y es completamente degradable (Fardis Ibérica, 2004). Por último, el cuarto tipo de plásticos son los completamente degradables naturales, entre estos se encuentran los polihidroxicanoatos (PHAs), poliláctilos, poliésteres alifáticos, polisacáridos y copolímeros derivados de ellos (Lee., 1996; Steinbüchel y Füchtenbusch, 1998., Reddy, *et al.*, 2003). Aunque estos plásticos ya están siendo utilizados industrialmente, existen varios problemas que frena el desarrollo de los polímeros biodegradables naturales como sustitutos de los plásticos convencionales, uno de éstos es su alto costo de producción (Lee, 1996., Reddy., *et al.*, 2003., Selehizadeh., 2004).

III.3.- La importancia del estudio de los polihidroxicanoatos

Los PHAs han atraído una mayor atención respecto a los otros polímeros completamente biodegradables debido a su versatilidad en las propiedades físicas semejantes a los plásticos derivados del petróleo, y por que pueden ser reciclados y por son producidos a partir de recursos renovables, (figura 1). Se ha encontrado que más de 90 géneros bacterianos sintetizan PHAs, entre los cuales se encuentra *Azotobacter*. Estas bacterias los acumulan como polímeros intracelulares en forma de gránulos y se sabe que lo utilizan como reserva de carbono y energía (Poirier., *et al.*, 1995). Lo anterior ha impulsado el estudio de métodos que permitan abaratar los costos de producción de los PHAs. Dentro de éstos se encuentran la modificación genética de cepas bacterianas con un nivel de producción incrementado, el mejoramiento de la tecnología de fermentación, la separación del producto, la utilización de materias primas más baratas y la obtención de plantas transgénicas que sintetizan PHAs (Lee., *et al.*, 1996., Choi y Lee., 1997., de Koning., *et al.*, 1997., Madison y Huisman., 1999., Kim., 2000). En 1996 Zeneca bioproducts y otros fabricantes, calculaban que el costo de producción de BIOPOL (un polímero de hidroxibutirato/hidroxivalerato, PHB/PHV) era de 16 dólares por Kg. (Lee, *et al.*, 1996). Sin embargo el precio de los PHA es demasiado caro comparado con 1 dólar por Kg. de los plásticos derivados del petróleo. Para 1998 se calculaba que reduciendo los costos de producción de 2 a 5 dólares, el precio en el mercado sería de 8 dólares por Kg.,

produciendo unas 5,000 toneladas por año (Fritz, *et al.*, 1988). Las plantas transgénicas que sintetizan PHAs pueden incrementar la producción en orden de varios millones de toneladas (acumulando de 20 a 40 % de su peso seco), comparadas solo con las cientos de toneladas que se pueden producir por fermentación bacteriana. Los costos de producción potencialmente pueden disminuir hasta 0.20 dólares, entonces sería posible competir con los plásticos derivados del petróleo. Por todo esto, existe un gran interés en el desarrollo de los plásticos biodegradables, particularmente por el agotamiento en las reservas de petróleo y el impacto negativo de los plásticos no degradables en el ambiente (figura 1) (Reddy, *et al.*, 2003).



A) B)
Figura 1.- Degradación de botellas hechas de P(3HB-3HV) en composteo aeróbico (A). Las botellas fueron incubadas en compostas durante el verano con temperaturas promedio de 20 °C. El progreso de la degradación es mostrado de izquierda a derecha con tiempos de 0, 2, 4, 6, 8, y 10 semanas. Fotografía de Dieter Jendrossek, Universidad de Göttingen Alemania (Madison y Huisman, 1999).

I.3.1.- Estructura química de los Polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros lineales de poliésteres de 3-hidroxi-butirato unidos cabeza con cola. En el polímero, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace con el grupo hidroxilo del siguiente. Los PHAs tienen una fórmula general: $O-CHR-(CH_2)_nCO-$ y pueden tener de 100 a 30,000 unidades estructurales, dependiendo del organismo, las condiciones nutricionales de las cepas bacterianas y el método de extracción (figura 2) (Anderson y Dawes., 1990; Lee., 1996., Madison y Huisman., 1999). Los monómeros se clasifican en dos grupos de acuerdo a la longitud de la cadena principal: el primero son monómeros de cadena corta que tienen de 1 a 5 carbonos, el segundo son monómeros de cadena media de 6 a 16 carbonos. Además los grupos **R** pueden ser cadenas alifáticas desde metil a tridecil saturados o insaturados, cadenas ramificadas, halogenadas o con grupos aromáticos (figura 2). En la actualidad más de 100 monómeros han sido encontrados como constituyentes de los PHAs, lo que plantea una gran variedad de posibilidades para la producción de diferentes polímeros biodegradables con diferentes propiedades desde aquellos semejantes al cristal o tan elásticos como el caucho; esto es dependiente de la unidad de monómero incorporada a la estructura del polímero (Lee, 1996). Dentro de los PHAs, el polihidroxi-butirato (PHB) es el más común. Está constituido por unidades de 3-hidroxi-butirato (3HB) (Lee., 1996; Madison y Huisman, 1999., Reddy *et al.*, 2003).

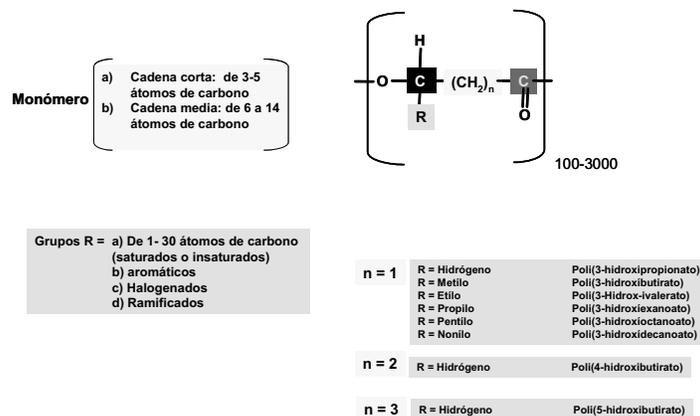


Figura 2.- Formula general de los polihidroxicanoatos (PHAs) (Madison y Huisman, 1999).

III.3.2.- Aplicaciones de los Polihidroxicanoatos (PHAs).

Los PHAs han tenido diversas aplicaciones a partir 1982. Inicialmente se comercializo el Biopol por ICI Ltd, un copolímero de 3-hidroxiacetato (3-PHB) y polihidroxiacetato (PHV), y fue usado para la fabricación de botellas, fibras, látex, rastrillos desechables y varios productos de empaquetamiento de alimentos, aceite de motores, cuidado del cabello y cosméticos (Figura 3). En la agricultura los PHAs se utilizan para encapsular fertilizantes, fungicidas y herbicidas de liberación controladas. En virtud de que son asimilables por el cuerpo humano (biodegradables) y no causan efectos tóxicos (biocompatibles), estos polímeros han sido utilizados ampliamente en medicina: en la encapsulación de medicamentos de dosis controlada, hilos para suturar heridas, implantes, prótesis y fijación de fracturas. Adicionalmente parece muy prometedor la gran utilidad de PHAs en un área nueva de la medicina, la ingeniería de tejidos y órganos. En esta, se han desarrollado, tejido cardiovascular y nervioso. La idea es generar tejidos y órganos en cultivos sumergidos de células troncales totipotenciales a partir de estructuras de PHAs preformadas, las cuales son recubiertas con factores de crecimiento y morfógenos. Por lo tanto, existe un gran potencial de usos para los PHAs, de manera importante en áreas donde los plásticos derivados del petróleo no pueden ser utilizados (Angelova., *et al.*, 1999., Zinn., *et al.*, 2001., Luengo., 2003).



Figura 3.- Aplicaciones han tenido del Biopol por ICI Ltd, (un copolímero de PHB y PHV). Es usado para la fabricación de botellas, fibras, látex, rastrillos desechables y varios productos de empaquetamiento de alimentos, aceite de motores, cuidado del cabello y cosméticos (Madison y Huisman., 1999).

III.3.3.- Acumulación, distribución y función de PHAs en los seres vivos.

Los PHAs se acumulan intracelularmente hasta en un 80% del peso seco de bacterias gram negativas y positivas, como polímeros insolubles amorfos y móviles en forma de gránulos de diferentes tamaños. Esto ocurre cuando hay un desbalance en los nutrientes en donde el carbono está en exceso y faltan nutrientes tales como el nitrógeno, fósforo y oxígeno. El papel principal de los PHAs es la reserva de energía para ser utilizada cuando la bacteria se encuentre en un medio con limitación de carbono (figuras 4 y 5) (Lafferty, *et al.*, 1990).

Los PHAs no solo son moléculas insolubles en el citoplasma de bacterias, también se han encontrado como polímero de bajo peso molecular (de menos de 15 KDa) unidos a proteínas o formando con el polifosfato canales de calcio en la membrana plasmática de bacterias (Seebach, *et al.*, 1996). Se ha propuesto que estas estructuras son importantes para la competencia (obtención de DNA por transformación), ya que existe una correlación directa entre la presencia de P(3HB) en la membrana plasmática y la eficiencia de transformación de *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, *Hemophilus influenzae* y *Escherichia coli* (Reusch, *et al.*, 1988; Huang y Reusch., 1995).

Los PHAs también se han encontrado en una gran variedad de plantas y animales. En el plasma sanguíneo de humano, el P(3HB) está asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y a la albumina. Ambas proteínas funcionan como acarreadoras de P(3HB) a diversos tejidos (Reusch, *et al.*, 1992). Se sabe que en mamíferos en ayuno prolongado el hidroxibutirato (el monómero) se utiliza como fuente de energía en el cerebro y diversos tejidos, a través de la vía de la β -oxidación (Lenhinger, *et al.*, 2005). En la araña europea *Linyphia triangularis*, un dímero (R)-3-(R) hidroxibutiril-acido butírico, funciona como una feromona de la hembras para atraer a los machos (Schulz y Tolf, 1993).

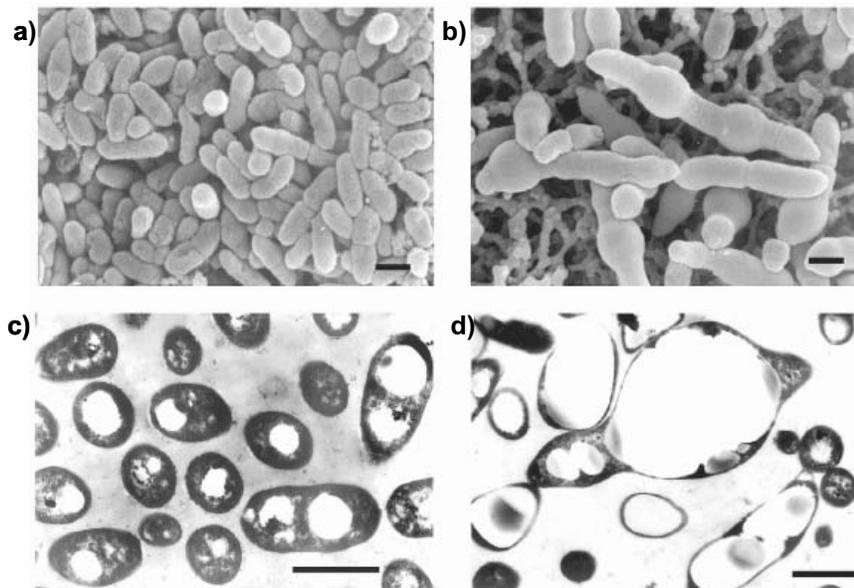


Figura 4.- Microscopía de barrido a), b) y microscopía electrónica de transferencia de cultivos de dos diferentes cepas de *Pseudomonas putida* donde se pueden ver los gránulos intracelulares de PHA c) y d) (Luengo, *et al.*, 2003).

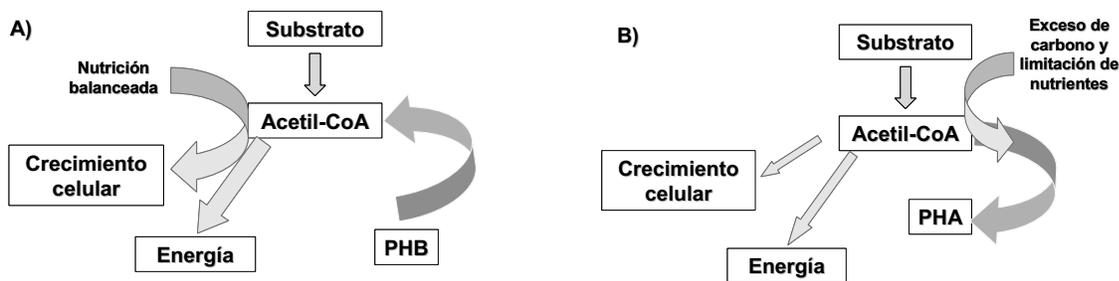


Figura 5.- Las condiciones nutricionales determinan la síntesis o movilización de PHA en bacterias. A) Cuando la bacteria crece en condiciones de nutrición balanceada, la fuente de carbono se utiliza para el crecimiento y la energía celular. B) Si la bacteria crece en un medio donde hay un exceso de carbono y la carencia de algún nutriente tal como nitrógeno, fósforo o potasio; acumula el carbono como PHA, para ser utilizado cuando las condiciones sean más favorables para el crecimiento.

III.4.- Estructura de los gránulos de PHAs.

Como se mencionó anteriormente, la producción más importante de los PHAs en la naturaleza se presenta en las bacterias en forma gránulos intracelulares. Estos están rodeados por una monocapa de fosfolípidos, que contienen proteínas tales como las fasinas PhaF y PhaI, polimerasas de PHAs, depolimerasas de PHAs y proteínas de unión no específicas al gránulo. La función de la monocapa de fosfolípidos no se conoce, aunque se cree que es necesaria para evitar el contacto de los PHAs con el agua, previniendo la transición de un estado líquido amorfo a una estructura cristalina más estable y formando una barrera protectora evitando el daño celular causado por la interacción de los PHAs con proteínas citosólicas (figura 6) (Luengo, *et al.*, 2003). Se ha publicado una discusión muy interesante sobre la formación del gránulo donde se menciona que la monocapa de fosfolípidos debe participar en el inicio de su formación y ésta debe extenderse a medida que el gránulo incrementa de tamaño, así que se propone que las enzimas necesarias para la síntesis de la monocapa de fosfolípidos deben existir y estar asociadas al poliéster (Jurasek, *et al* 2001).

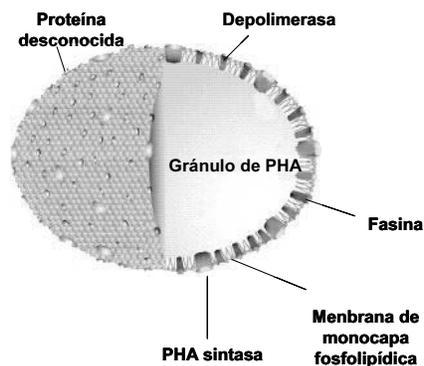


Figura 6.- Representación de la estructura de un gránulo de polihidroxicanotatos (PHA) (Luengo, *et al.*, 2003).

III.5.- Vías de síntesis de PHAs, genes, enzimas y regulación

Aunque los PHAs tienen una fórmula general, son diversos en su estructura, particularmente por la variedad de grupos R y las cadenas que pueden ser de 4 a 16

carbonos. Por esto mismo existen diferentes vías metabólicas involucradas en la síntesis de PHAs que veremos a continuación.

III.5.1.- Tres etapas en la biosíntesis de PHAs de cadenas cortas (PHAs sc)

La síntesis de P(3HB) en *Ralstonia eutropha*, es una de las vía más estudiadas (Steinbüchel y Schlegel., 1991). Esta consiste de tres pasos enzimáticos catalizados por tres diferentes enzimas. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, catalizada por la enzima β -cetoacil-CoA tiasa (codificada por el gen *phbA*). En la segunda reacción, la molécula de acetoacetyl CoA es reducida R-3-hidroxiacetil-CoA utilizando NADPH por la enzima β -cetoacetyl CoA reductasa (codificada por el gen *phbB*). Por último, los monómeros de 3-hidroxiacetil CoA son polimerizados por la 3-hidroxiacetil-CoA polimerasa [P(3HB) polimerasa], codificada por el gen *phbC* (figura 7).

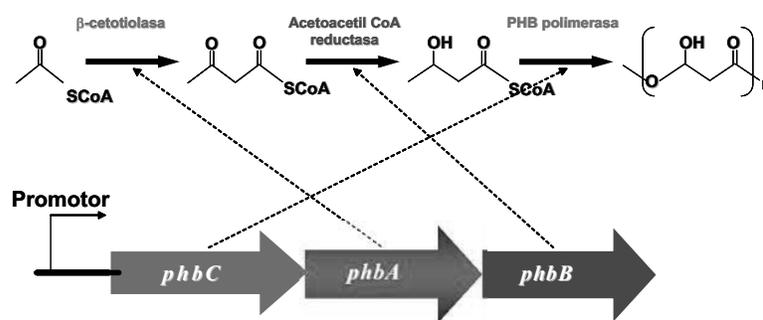


Figura 7.- Vía para la síntesis de PHB *R. eutropha*. Las enzimas están codificadas por los genes *phbCAB*, los cuales forman un operón (Madison y Huisman, 1999).

III.5.1.1.- β -cetoacetyl CoA tiasa

Como ya se mencionó anteriormente, la β -cetoacetyl CoA tiasa (acetil-CoA: acetil transferasa; EC.2.3.19), cataliza la primera etapa en la síntesis de P(3HB). Esta es un miembro de la familia de enzimas que están distribuidas ampliamente en la naturaleza desde procariontes hasta eucariontes superiores, como mamíferos y plantas. Las tiasas se dividen en dos grupos de acuerdo a la especificidad por el sustrato. El primer grupo consiste de tiasas de amplio rango de especificidad por cetoacetyl-CoA, con longitudes de C₄ a C₁₆. Esta clase de enzimas están involucradas en la degradación de ácidos grasos y están localizadas en el citoplasma de procariontes, en la mitocondria y en peroxisomas de células de mamíferos y plantas. La segunda clase de β -cetoacetyl-CoA tiasas son consideradas biosintéticas y tienen un espectro corto de especificidad de los monómeros con cadenas de C₃ a C₅ y están especializadas en una gran cantidad de funciones, tales como la formación de cuerpos cetónicos (en células de mamífero), la síntesis de esteroides e isoprenoides (animales y plantas respectivamente) y la síntesis de P(3HB) en bacterias (Marchessault., 1996; Madison y Huisman., 1999).

III.5.1.2.- Acetoacetil CoA reductasa.

La enzima Acetoacetil CoA reductasa es una (R)-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (E.C.1.1.1.36) y cataliza el segundo paso de la biosíntesis de P(3HB) para convertir la acetoacetil-CoA en 3-hidroxiacil-CoA. Las Acetoacetil CoA reductasas caracterizadas hasta el momento, son dependientes de NADPH. En las vías biosintéticas de P(3HB), las reacciones catalizadas por la tiolasa y la reductasa proporcionan el monómero para la polimerización de PHA. Las características cinéticas y especificidades por el sustrato de estas dos enzimas son cruciales para determinar el espectro de PHAs que puedan ser sintetizados. Lo anterior puede ser utilizado en los procesos de producción para suplir los sustratos e incluso los monómeros para la síntesis de PHAs con propiedades termoplásticas específicas (Madison y Huisman., 1999).

III.5.1.3.- P(3HB) sintasa.

La PHB sintasa es la tercera enzima de la vía de biosíntesis de P(3HB) y es un miembro de la familia de las PHAs polimerasas. El gen *phbC* que codifica para la PHB polimerasa en, fue clonado y caracterizado inicialmente en *A. eutrophus* (Peoples y Sinskey., 1989). En la actualidad han sido reportadas alrededor de 55 secuencias codificantes para PHAs sintasas en 45 bacterias. Las PHAs polimerasas se han clasificado de acuerdo a la secuencias de amino ácidos deducida de la secuencia de nucleótidos y su estado oligomérico en cuatro clases (Rehm, 2003). Las PHAs sintasas de la clase I y II comprenden las enzimas que están formadas por una sola subunidad (PhaC), con pesos moleculares de 61 a 73 KDa. La clase I de PHAs sintasas se distingue por su especificidad por los sustratos, los cuales son ésteres de CoA de 3-hidroxiácidos de 3 a 5 carbonos (p.e. las PHAs sintasas de *A. eutrophus* y *A. vinelandii*). Las sintasas de clase II comprenden a las enzimas con especificidad por los sustratos, los cuales son ésteres de CoA de 3-hidroxiácidos de 6 a 14 carbonos (p.e. la PHA sintasas de *P. aeruginosa*). Las sintasas de la clase III incluye a las enzimas que tienen dos diferentes subunidades: la subunidad PhaC con un peso molecular de aproximadamente 40 KDa con el 21 a 28 % de similitud a las PHAs sintasas de clase I, y la subunidad PhaE con peso molecular aproximado de 40 KDa, la cual no presenta similitud a ninguna PHA sintasa. Esta enzima utiliza preferentemente ésteres de CoA de 3-hidroxiácidos de 3 a 5 carbonos (p.e. como los encontrados en *Alochromatium vinosum*). Por último, las PHA sintasas de clase IV (p.e. la de *Bacillus megaterium*) se parece a las PHA sintasas de la clase III, sin embargo la subunidad de PhaE es remplazada por PhaR la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 20 KDa (Yuan, *et al.*, 2001; McCool y Cannon, 2001).

III.5.2.- Otras vías para la síntesis de PHAs de cadenas cortas.

El P(3HB) es un sólo tipo de PHAs, pero como mencione antes polímeros de éste tipo son sintetizados por cientos de diferentes microorganismos que viven en diferentes nichos y con su propia historia evolutiva. Por esta razón, no todos los microorganismos utilizan la misma vía de biosíntesis de PHAs. Las tres etapas en la síntesis de P(3HB) es utilizada por *Ralstonia eutropha*, *Z. ramnigera* y *Azotobacter spp.* Sin embargo, algunas otras bacterias utilizan vías alternativas para la síntesis de PHAs (Madison, Huisman, 1999).

III.5.2.1.- Síntesis de PHAs utilizando enoil-CoA hidratasa.

Cuando *Aeromonas cavia* crece en un medio que contiene diversos ácidos grasos o aceite de oliva como única fuente de carbono, produce un copolímero de 3-hidroxiacetato (3HB), 3-hidroxihexanoato (3HH). Los genes involucrados para la biosíntesis de 3PHB en *A. cavia* han sido clonados y caracterizados. En este se encuentra el gen *phbC* que codifica para la PHB polimerasa, el gen *phaJ* que codifica para la enzima enoil-CoA hidratasa y el gen *phaP* que codifica para una fasina. Estos genes son suficientes para la formación de PHA en huéspedes heterólogos que no sintetizan PHA como *E. coli*. La vía biosintética procede de la oxidación de ácidos grasos (figura 8). La enoil-CoA y hexanoil-CoA son convertidos a precursores de PHAs por la enoil-CoA hidratasa, ambas son polimerizadas por la PHA sintasa (figura 8) (Fukui y Doi., 1997; Fukui, *et al.*, 1998).

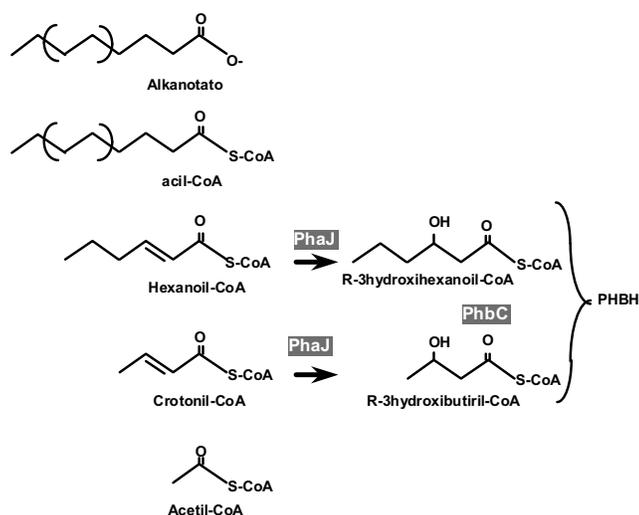


Figura 8.- Vía de síntesis para los monómeros P(3HB) y P(HH), los cuales son derivados de la degradación de ácidos grasos por conversión de enoil-CoA a precursores de (R)- 3-hidroxiacil-CoA por una enoil-CoA hidratasa (Pha J) Fukui y Doi, 1997; Fukui, *et al.*, 1998; Madison, Huisman, 1999).

III.5.2.3.- Síntesis de 3-Polihiidroxiacetato-Polihiidroxiacetato (3HB-3HV) a partir de azúcares en la vía de Metilmalonil CoA.

Las bacterias *Nocardia coralina* y *Rodobacter ruber* acumulan PHAs que contienen hidroxiacetato (3HV) en ausencia de precursores HV y propionato en el medio de cultivo. En esta vía el succinil-CoA es convertido a metilmalonil-CoA, el cual es descarboxilado a propionil-CoA. Parece ser que en *N. coralina* y *R. ruber* los monómeros de PHA provienen tanto de la degradación de ácidos grasos, como de la vía tradicional de la síntesis de PHB contrariamente a lo que sucede con *A. cavia* (figura 9)(Anderson, *et al.*, 1990; Williams, *et al.*, 1994 ;Valentin y Dennis., 1996).

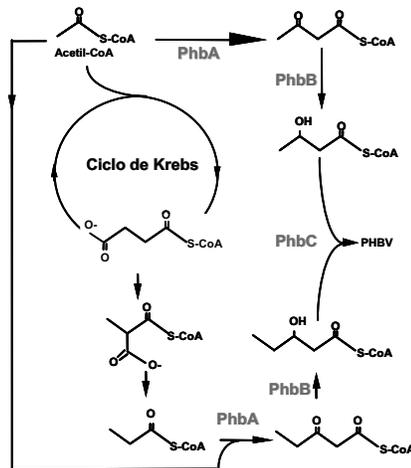


Figura 9.- Vía de síntesis del copolímero polihidroxibutirato-hidroxivalerato P(HB-HV) a partir de carbohidratos. Algunos microorganismos acumulan P(HB-HV), sin suplementación de propionato, valerato, o algún otro ácido graso. El propionato en estas especies es formado a través de la vía de metilmalonil-CoA y acetil-CoA, los cuales se originan de succinil CoA en el ciclo de Krebs. Tanto metilmalonil-CoA y acetil-CoA son convertidos a P-(HB-HV), por enzimas típicas de la síntesis de PHB (Anderson, *et al.*, 1990; Williams, *et al.*, 1994; Valentin y Dennis, 1996).

III.5.3.- Síntesis de PHAs de cadenas medias.

Las *Pseudomonas* clasificadas en el grupo I mediante su ARNr, utilizan la vía oxidativa de ácidos grasos para obtener los precursores para la síntesis de PHAs (figura 10). En esta vía los ácidos grasos son degradados removiendo acetil-CoA en cada etapa del ciclo. En parte de la vía la acil-CoA se oxida a un intermediario de 3-hidroxiacil-CoA. Dado que en la β -oxidación el intermediario es 3-hidroxiacil-CoA se requiere una etapa enzimática para la síntesis de 3-hidroxiacil-CoA. Las polimerasas de cadenas medias tienen, un espectro de especificidad de C₆ a C₁₆ de 3-hidroxiacil-CoA, con preferencia de cadenas de monómeros C₈ y C₉. Los precursores de PHA pueden ser el producto de una reacción catalizada por la hidratasa (como en *A. cavia*), por las actividades de una epimerasa a partir del complejo de la β -oxidación o puede ser también por una enoil-CoA reductasa específica desconocida (Langenbach, *et al.*, 1987). La vía de síntesis de *Pseudomonas* que sintetiza PHAs de cadenas medianas (PHAs smc) es muy diferente a la vía de síntesis de PHAs de cadenas cortas (PHAs scc). Los genes involucrados en la formación de PHAs de cadenas medias han sido caracterizados en *P. oleovorans* y *P. aeruginosa*. En ambas especies dos PHAs polimerasas fueron identificadas, las cuales tienen aproximadamente 50 % de identidad entre ellas y son igualmente activas en la síntesis de PHAs. Entre los dos genes de las PHAs polimerasas (*phaC1* y *phaC2*) se encuentra un ORF que presenta homología al gen *phaZ*, el cual codifica para una depolimerasa. Adicionalmente este ORF tiene en su región 5' una caja de regulación de tipo lipasa. Hacia el 3' de *phaC2* hay tres genes de función desconocida cuyos productos pueden estar asociados a la formación de gránulos de PHAs (figura 10) (Valentin, *et al.*, 1988).

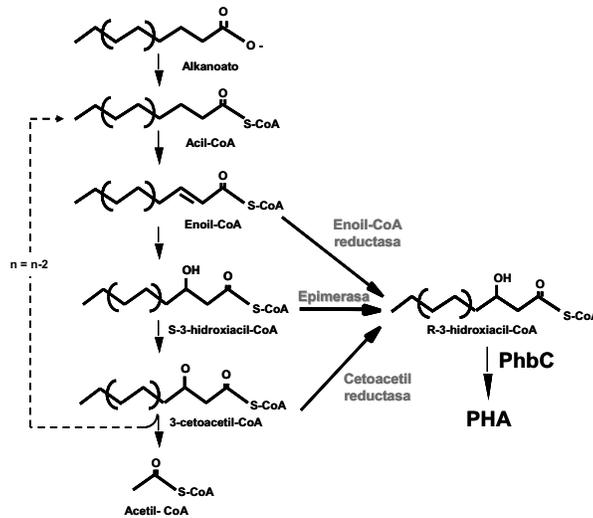


Figura 10.- Vía de síntesis propuesta para PHAs smc en *P. fluorescens* del grupo I de homología (por análisis del RNAr). Los precursores pueden ser intermediarios del ciclo de la β -oxidación de ácidos grasos, pueden ser convertidos a 3-hidroxiacil-CoA por actividades de la hidratasa, epimerasa o reductasa (cuya naturaleza es desconocida). Alguna o todas las enzimas determinan la especificidad de C6 a 16 carbonos de los 3-hidroxiácidos (Valentin, *et al.*, 1988; Madison y Huisman, 1999).

III.5.4.- Síntesis de PHAs de cadenas medias a partir de carbohidratos.

Cuando *P. fluorescens* del grupo I de ARNr es crecida en un medio de cultivo suplementado con azúcares, sintetiza precursores de PHAs de C8 a C10. Los precursores de PHAs derivan de intermediarios de la síntesis de ácidos grasos. Se ha clonado el gen *phaG* cuyo producto realiza la conversión de (R)-3-hidroxiacil-ACP a (3)-hidroxiacil-CoA y se observó que es intermediario es polimerizado por la PHA sintasa (figura 11) (Rehm, *et al.*, 1998).

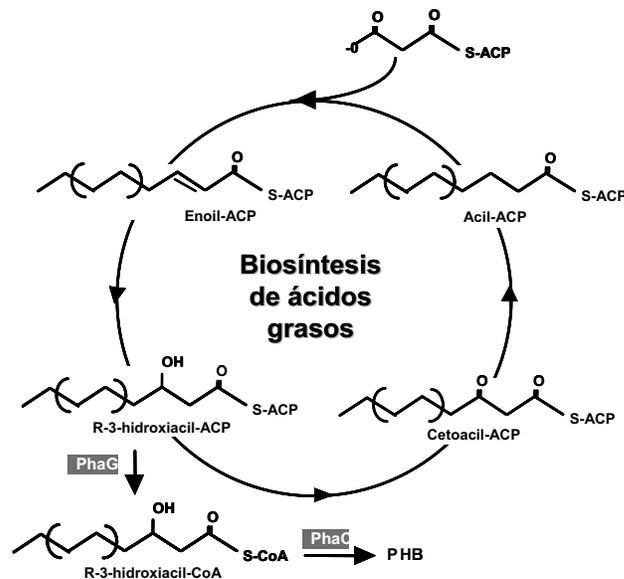


Figura 11.- La vía de biosíntesis de PHAs de cadenas medias (PHAs msc), provienen de la biosíntesis de ácidos grasos como derivados de R-3-hidroxiacil-ACP y son convertidos a R-3-hidroxiacil-CoA a través de una acil-ACP-CoA transacetilasa codificada por el gen *phaG* (Rehm, *et al.*, 1998; Madison, Huisman, 1999).

III.6.- Los genes y sus productos que participan en la biosíntesis de PHAs.

Los primeros genes clonados y caracterizados fueron los de la bacteria *Zoogloea ramiginera*, la cual almacena P(3HB). Esto se logró a través de tamizar una librería genómica en *E. coli* utilizando un anticuerpo anti-tiolasa (Peoples, *et al.*, 1987). En este clona se encuentran los genes *phbA* y *phbB* formando un operón, posteriormente se clonó el gen *phbC*. Los genes de *Ralstonia eutropha* fueron clonados en un fragmento de 5.2 Kb, el cual es suficiente para conferir a *E. coli* la capacidad de sintetizar PHB. En *Acinetobacter spp.*, *Alcaligenes lotus*, *Pseudomonas acidophila* y *Ralstonia eutropha*, los genes *phbCAB* están arreglados uno tras otro, aunque no en el mismo orden. En *Paracoccus denitrificans*, *Rhizobium meliloti* y *Zoogloea ramiginera* los genes *phbAB* y *phbC* están separados. Las bacterias *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea* y *Synechocystis*, tienen PHAs polimerasas constituida por dos diferentes subunidades y codificada cada una por diferentes genes (*phbE* y *phbC*); en estos organismos los *phbAB* y los *phbEC* están en un mismo locus, sin embargo orientados en de manera divergente. Los loci de *phb* en *C. vinosum*, *P. acidophila*, *R. eutropha*, *R. meliloti* y *T. violacea* tienen un gen adicional *phbF*, cuya función es desconocida. En *A. cavia* el gen de la PHA polimerasa está flanqueado por un solo gen biosintético (*phaJ*), el cual codifica para la enzima PhaJ que tiene una actividad de enoil-CoA hidratasa. Estos dos genes son suficientes para la síntesis del copolímero P(3HB-3HH) a partir de la degradación de ácidos grasos (fig. 10). Los microorganismos productores de PHAs de cadenas medias *P. oleovorans* y *P. aeruginosa*, poseen dos genes *phaC*, separados por *phaZ*, los cuales codifican para una depolimerasa de PHA intracelular. Las dos PHA polimerasas tienen 50 % de identidad y presentan una especificidad muy similar por el sustrato (figura 12) (Madison y Huisman, 1999).

Se ha hecho una propuesta en cuanto al origen y evolución de la síntesis de PHAs, derivado de la organización de los genes *pha*. Se propone que cuando las primeras bacterias sintetizaban PHA era con un fin muy diferente, al almacenaje de fuente de carbono y energía, quizás como un evento lateral a una vía metabólica, por ejemplo, la regulación de los equivalentes reductores. A medida que en la acumulación de PHA y la manera de movilizarlo fue eficiente cuando las bacterias lo requerían, generó una ventaja evolutiva al proporcionar fuente de carbono y energía cuando las condiciones del medio ambiente eran escasas. En el curso de la evolución el gen *phaC* algunas veces fue combinado con los genes *phaAB* o *phaJ*, o con otros genes involucrados en otros aspectos del metabolismo de PHA tales como *phaZ* (depolimerasa de PHA). La selección natural actuó en el tiempo para agrupar a los genes *pha* en operones en algunos organismos (tales como *P. acidophila*, *R. eutropha*, *Acinetobacter*, *A. latus* y *A. cavia*) o como unidades de transcripción separadas (tales como *Z. ramiginera*, *P. denitrificans*, *R. meliloti*, *C. vinosum*, *T. violaceae*, *P. oleovorans*, *P. putida* y posiblemente otras bacterias en las cuales no se han encontrado genes codificantes para las enzimas β -tiolasa y Acetocetil-CoA reductasa (*phaA* y *phaB*, respectivamente). En cuanto a la evolución de las PHA polimerasas, no se sabe cuáles son las más ancestrales, si aquellas que están codificadas por un solo gen (*phaC*) o las que están codificadas por dos genes (*phaEC*) (Madison y Huisman, 1999).

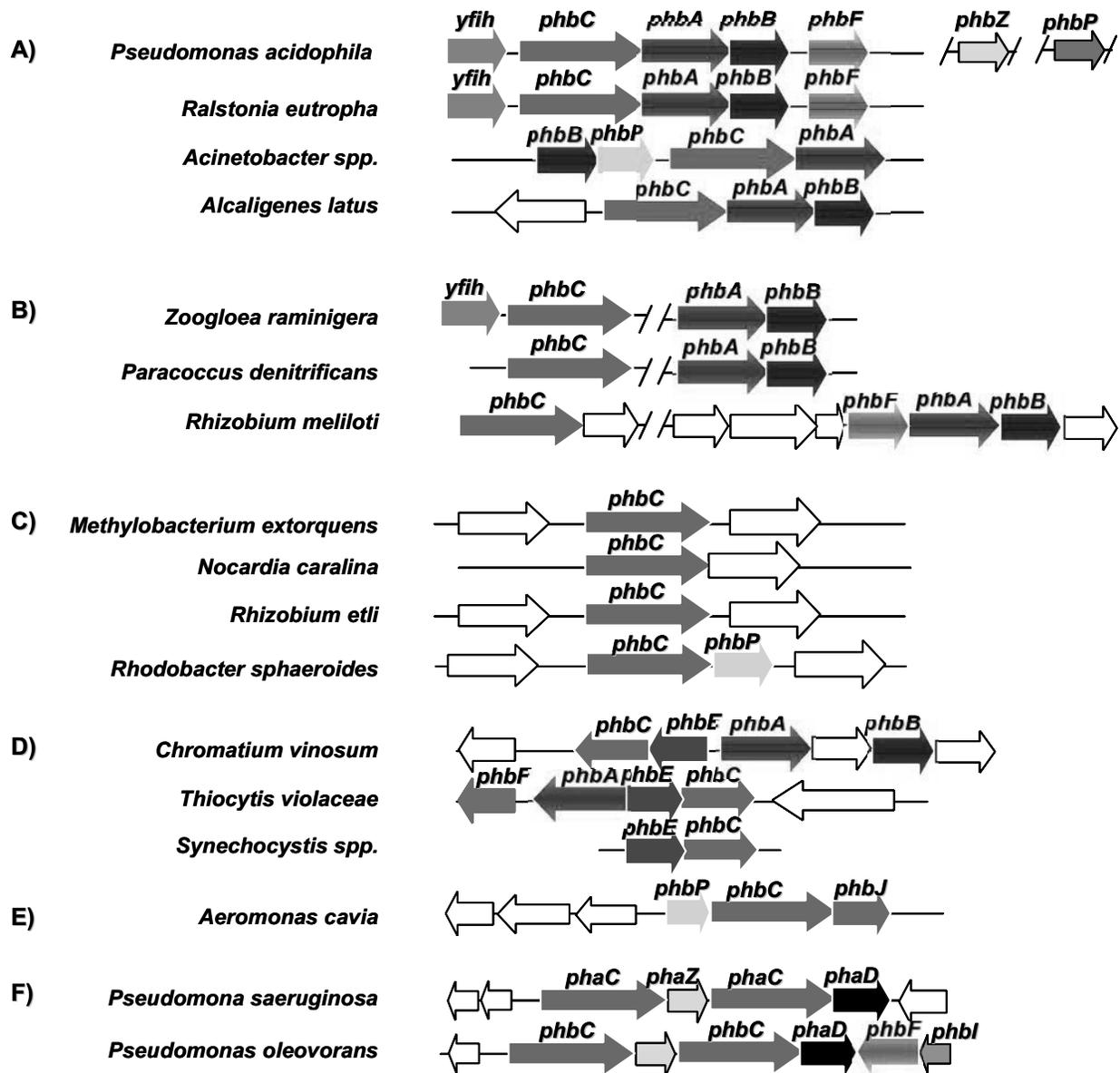


Figura 12.- Organización genética de los operones involucrados en la síntesis de PHAs. Los loci involucrados en la síntesis de PHAs han sido clonados en muchos organismos. Los genes cuyos productos participan en PHAs de cadenas cortas (PHAs sc) son asignados como *phb* y aquellos específicos para PHAs de cadenas medias (PHAs mc) son designados como *pha*. No todas las vías han sido completamente elucidadas en estas cepas. Los genes *phb* y *pha*, no necesariamente están organizados de la misma manera y pueden variar de especie a especie y algunos otros genes pueden estar asociados a los loci y pueden participar en el metabolismo de PHAs. A) Se muestran operones completos. B) Los loci de *phb* interrumpidos. C) Los loci de *phb* incompletos. D) Los loci de los organismos que codifica para dos PHB sintetas. E) El locus *phbCJ* de *A. cavia* involucrado en la síntesis de P3HB-3HH). F) Los loci para la formación de PHAs de cadenas medias en *Pseudomonas* (modificado de Madison y Huisman, 1999).

III. 7.- Regulación de la síntesis de PHAs.

La regulación de la producción de PHAs es compleja, esto y se puede presentar a cuatro niveles. El primero es a nivel enzimático, a través de la inhibición o activación por cofactores de diversas etapas enzimáticas en la vía de síntesis o en vías generales del metabolismo para dirigir el flujo de carbono, lo cual se refleja en la disponibilidad de

precursores de PHAs. El segundo a nivel genético, esto mediado por factores sigma (σ), sistemas de dos componentes y moléculas inductoras. Un tercer factor de regulación se da a nivel del tamaño del gránulo y el peso molecular del PHAs, el cual está controlado por el nivel de PHAs polimerasa y fasinasa (Madison y Huisman, 1999). Un cuarto nivel de regulación sería la degradación de los PHAs.

III.7.1.- Regulación enzimática de la vía de síntesis de PHAs.

Se ha encontrado la mayoría de las bacterias estudiadas acumulan PHAs en condiciones limitación de nutrientes para el crecimiento (nitrógeno, fósforo, magnesio y oxígeno), pero además se requiere un exceso de carbono y energía. (Anderson y Dawes., 1990). En *Alcaligenes eutropus*, la bacteria mejor estudiada, se ha encontrado que las tres enzimas de la vía se sintetizan constitutivamente y la regulación está dada a nivel de las actividades enzimáticas. La regulación principalmente se da por CoA libre la cual se genera en el primer paso del ciclo de Krebs. La CoA inhibe la condensación de Acetil-CoA realizada por la β -cetotiolasa (la primera etapa en la síntesis de PHB). Cuando los niveles de CoA disminuyen y los de acetil-CoA incrementan la actividad de la β -cetotiolasa es incrementada. De este modo, se decide dirigir principalmente la acetil-CoA al ciclo de Krebs en condiciones de limitación de carbono y cuando hay un exceso de carbono se acumula en forma de PHB (Oeding y Schlegel, 1973).

En la cianobacteria *Synechococcus*, el control se da por regulación alósterica de acetilfosfato a la PHB sintasa, como un reflejo del estado nutricional de un exceso de nitrógeno y limitación de carbono (Miyake, *et al.*, 1997).

Otra estrategia para regular a nivel enzimático se presenta en *Synechocystis* sp, en donde existe una subunidad regulatoria que es necesaria para que el PhaC (PHB sintasa) tenga actividad (Hein y Steinbüchel, 1998). Un mecanismo similar ocurre en *B. megaterium* donde PhaR parece tener una función regulatoria (que no es homólogo de PhaE) es necesaria para que tenga actividad tanto *in vitro* como *in vivo*; sin embargo no se sabe si PhaR la regule de manera directa o indirecta (McCool y Cannon, *et al.*, 2001).

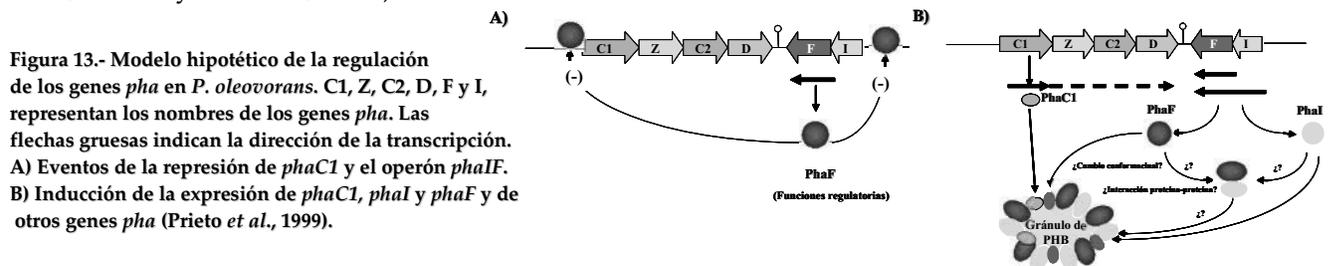
III.7.2.- Regulación de la transcripción de los genes que participan en la síntesis de PHAs.

A pesar de que existen muchos trabajos sobre los PHAs en diversos organismos poco se conoce acerca de la regulación transcripcional. Por ejemplo en *Ralstonia eutropha* no se sabe si ocurre regulación a nivel transcripcional o traduccional de los genes que participan en la biosíntesis de PHB (Oeding y Schlegel., 1973; Steinbüchel y Schlegel., 1991). Uno de los mejores modelos estudiados es el de *Vivrio harveyi*, en el cual se encontró que la síntesis de PHB depende de la densidad celular de manera similar a la regulación de la luminiscencia. En este caso la síntesis de PHB es controlada por la concentración de N-3(hidroxibutanoil) homoserin lactona que al unirse al activador transcripcional LuzR incrementa la tasa de transcripción de los genes biosintéticos de PHB (Miyamoto, *et al.*, 1998). En *P. putida* se ha identificado un gen que codifica para un posible regulador llamado *phaS*, la cual presenta identidad con proteínas sensoras de sistemas de dos componentes. El fenotipo de la mutación en *phaS* es una disminución en la síntesis de PHB

(Madison y Huisman., 1999). En *Acinetobacter*, aunque existe un nivel constitutivo de transcripción de los genes biosintéticos de PHB, esto se ve incrementado cuando la concentración de fosfato es limitante. Esta inducción se da a través de promotores alternativos dependientes del activador PhoB que forma parte del regulón de fosfatos (Schembri, *et al.*, 1995). En *Pseudomonas* sp 61-3 se ha demostrado que existen otros factores involucrados en la regulación transcripcional de los genes *phas*; uno de estos es el regulador transcripcional *phbR*, el cual exhibe una significativa similitud con los activadores transcripcionales de la familia de AraC/XylS. Mutantes en *phbR* disminuyen la transcripción de los genes biosintéticos y reducen hasta en un 50% la acumulación de PHB (Matsusaki *et al.*, 1988)

Aunque no se ha estudiado exhaustivamente, en muchas bacterias la regulación por nitrógeno se sabe que el exceso de nitrógeno regula negativamente la acumulación de PHB. En *Azospirillum brasilense*, se ha demostrado que en condiciones de alto nitrógeno hay una disminución en la acumulación de PHB, mutantes en los genes *ntrB* y *ntrC* que participan en la regulación global del nitrógeno, acumulan PHB en condiciones de alto nitrógeno, lo que indica que los productos de estos genes (NR_{II} y NR_I respectivamente) participan en la regulación de la síntesis de PHB en esta bacteria (Sun, *et al.*, 2000). En *P. aeruginosa* PAO1 se ha mostrado que una mutación en *ntrA* (RpoN) disminuye drásticamente la acumulación de PHA cuando se usa gluconato ó ácidos grasos como fuente de carbono (Timm y Steinbüchel., 1992).

Por otra parte, en *Pseudomonas* y en otras bacterias se ha encontrado que las fasinas tienen un papel dual en la acumulación de PHAs. Se ha demostrado que PhaF es capaz de unirse al ADN en regiones específicas de los genes *phaC1* y *phaI* reprimiendo su transcripción y que además de esta función regulatoria participa en la estructuración del gránulo. Se ha propuesto un modelo de cómo podría funcionar PhaF en virtud de que mutantes en *phbC* son incapaces de reprimir los genes involucrados en la síntesis de PHAs. En condiciones de acumulación de PHAs, PhaF podría despegarse del ADN y permitir la transcripción de los genes biosintéticos y formar parte del gránulo (figura 13) (Prieto *et al.*, 1999; Kesler y Witholt., 2001).



III.7.3.- Regulación de la degradación de PHAs.

A nivel molecular no se conoce mucho acerca de la regulación de la degradación de PHAs. En general se supone que la síntesis de PHAs y de las depolimerasas están altamente reguladas en las diversas bacterias. La mayoría de las bacterias reprimen las depolimerasas en presencia de una fuente de carbono soluble que permita una alta tasa de crecimiento (Kessler, y Witholt, 2001). Se ha encontrado que después de que la fuente de

carbono se disminuye, las depolimerasas se desreprimen. (Foster, *et al.*, 1995; Jendrossek, *et al.*, 1993; Scheirmer, *et al.*, 1993). Sin embargo existen datos contradictorios; por ejemplo, la inhibición de la síntesis de proteínas no afecta la degradación en *P. oleovorans*, y se ha sugerido que la PHA depolimerasas siempre están presentes y en una forma activa, de tal manera que la síntesis y degradación ocurren simultáneamente (Zinn, 1998). Conclusiones similares se ha llegado en *R. eutropha* (Doit, *et al.*, 1992). En *R. autropha* también se ha encontrado que mutantes en los genes *phbI* y *phbB* presentan una disminución en la acumulación de PHB. Estos genes presentan identidad con la enzima I y HPr del sistema de transporte y fosforilación dependientes de fosfoenol piruvato (PEP-PTS). El efecto en la disminución de la acumulación de PHA es por una mayor velocidad de degradación de PHB en fase estacionaria, lo que ha llevado a proponer que la PHB depolimerasa es regulada por fosforilación por el sistema PTS; sin embargo, esto no ha sido probado (figura 14) (Pries, *et al.*, 1991).

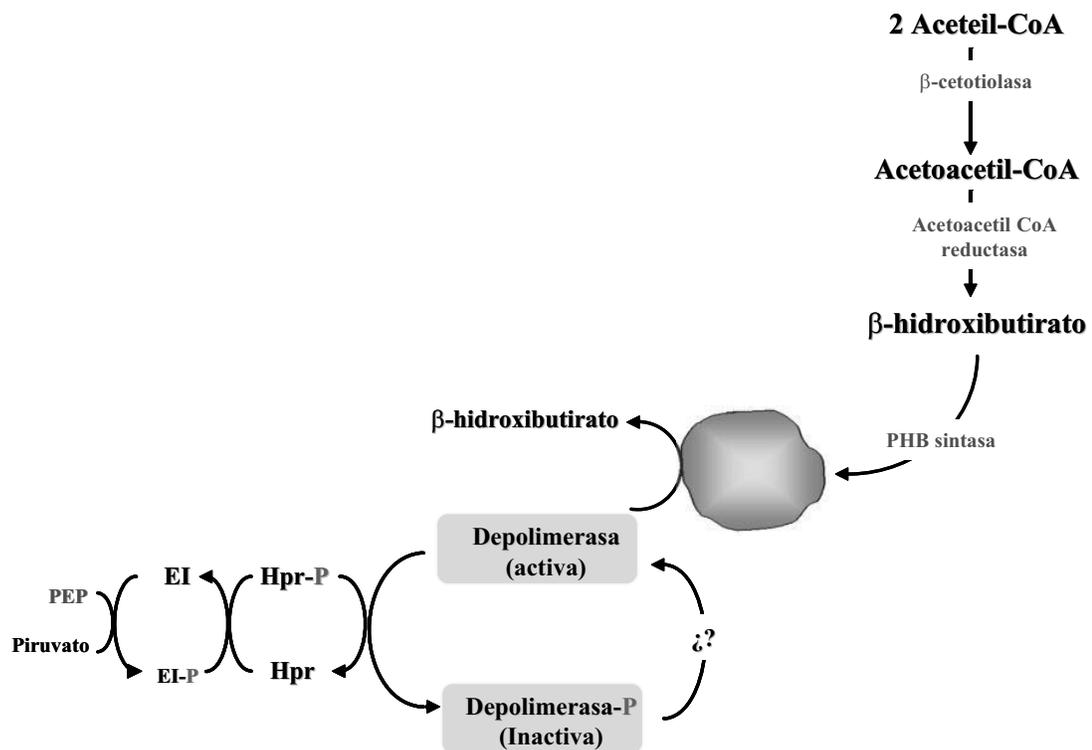


Figura 14.- Modelos hipotético de la participación de las enzimas EI y HPr de *R. eutropha* (*A. eutrophus*) (Pires, *et al.*, 1991).

III.8.- El sistema de transporte y fosforilación de azúcares dependientes de fosfoenol-piruvato (PEP-PTS) de *E. coli*.

El sistema de transporte y fosforilación de azúcares (PTS), fue descubierto primeramente en *E. coli* hace mas de 40 años (Kundig, *et al.*, 1964). En la actualidad se sabe que el PTS es el principal sistema de transporte y fosforilación de un gran número de carbohidratos en eubacterias (bacterias Gram-negativas y Gram-positivas) y está ausente en

arqueobacterias y eucariontes (Siebold, *et al.*, 2001). Además del transporte y fosforilación, el PTS participa en la quimiotaxis, competencia y en la regulación de diversas vías metabólicas del carbono, nitrógeno y en la competencia para la transformación con ADN.

Generalmente el PTS está formado por 4 dominios funcionales, llamados Enzima I, HPr, Enzimas IIA, Enzimas IIB y Enzima IIC, las cuales juntas forman una cascada de fosfoproteínas que transfieren el grupo fosfato desde el fosfo-enol-piruvato (PEP), a el azúcar entrante (figura 15). Las dos primeras proteínas de la cascada EI y HPr, son citoplásmicas, y en *E. coli* participan en la fosforilación de todas los carbohidratos PTS. Mientras que las proteínas IIA, IIB y IIC forman complejos de transporte específico de azúcar. Estas pueden formar un sola proteína unida a membrana con tres dominios (A, B y C), tal como ocurre con el transportador específico de manitol (EII^{Mtl}), o pueden consistir de más de dos proteínas, una unidas a membrana (IIBC) con dos dominios estructurales y una proteína soluble (IIA), tal como en el transportador para glucosa (IIBC^{Glu} y IIA^{Glu}). En algunos casos el complejo II de transporte puede tener una proteína membranar adicional IID, la cual forma un canal junto con IIC, como en el transportador de manosa (IIC^{Man} y IID^{Man}) (figura 15) (Postma *et al.*, 1996).

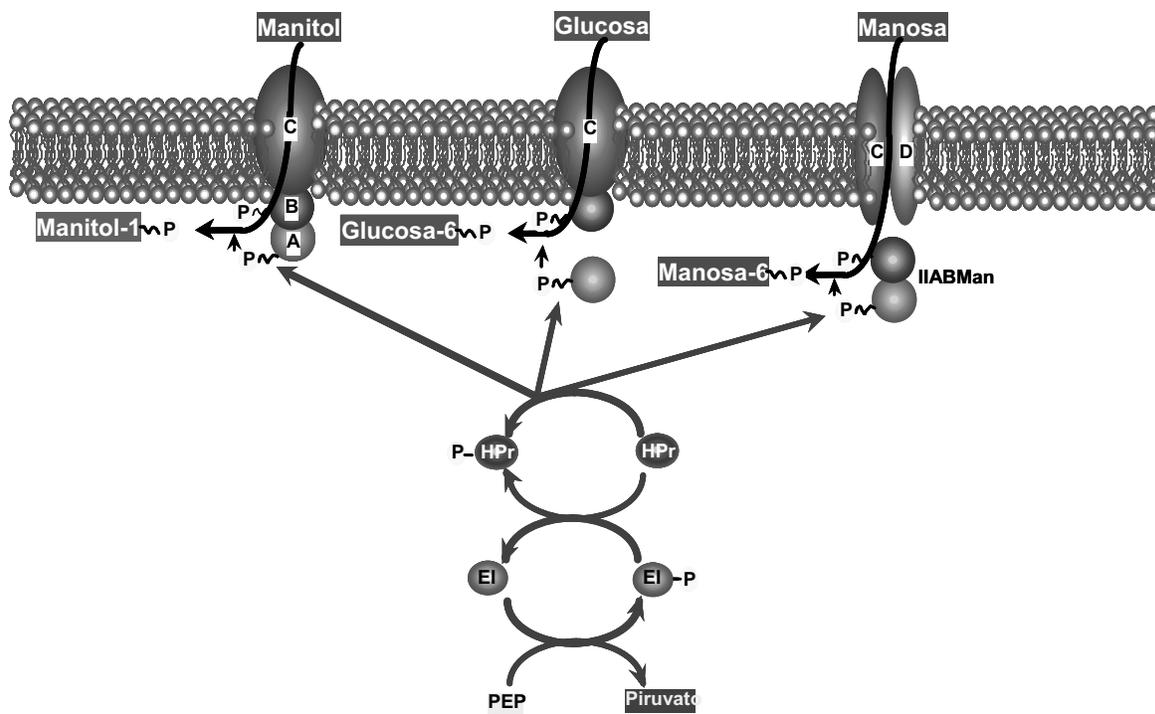


Figura 15.- Modelo de los sistemas de transporte y fosforilación de azúcares dependientes de fosfoenolpiruvato de *E. coli* (PTSs). Las enzimas I y HPr son proteínas generales para todos los PTSs. De las muchas enzimas II solo tres son mostradas, la específica para manitol (Mtl), glucosa (Glc) y manosa (Man). Cada una contiene dos dominios hidrofóbicos: IIA contiene el primer sitio de fosforilación (P-His), y IIB tienen el segundo sitio de fosforilación (que puede ser un residuo de Cys o de His). Los dominios hidrofóbicos de unión a membrana son IIC, sin embargo en algunos casos estos son dos proteínas separadas (IIC y IID) (Postma *et al.*, 1996).

III.8.1 Los sistemas PEP-PTS de *E. coli*.

Mediante análisis computacional del genoma de *E. coli*, se han encontrado 5 EI's, y 6 Hpr's, las secuencias de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos indican que estas proteínas están relacionadas evolutivamente (Tchieu, *et al.*, 2001). Así mismo, que se encontraron 22 transportadores (complejos IIA; IIB y IIC), los cuales pueden ser agrupados en 5 familias con plegamientos y estructura oligomérica diferentes (figura 16) (Tchieu, *et al.*, 2001; Siebold, *et al.*, 2001). La enzima IIA^{Gluc} es miembro representativo de una de estas familias, esta proteína forma un "sandwich" de 2 láminas β , las cuales consisten de 6 estructuras tipo β -antiparalelas y 2 α -hélices muy cortas. La estructura de la familia de las IIA^{Mtl}, esta formada por una mezcla de 5 plegamietos tipo β , que forman una lámina, con una α -hélice en ambas caras. La enzima IIA^{Man} es un homodímero que forma un giro abierto con una mezcla de estructuras α/β , en la cual el dímero es estabilizado por intercambio de cadenas β entre ambas subunidades. La enzima IIA^{Cel} forma un giro abierto semejante al IIA^{Man}, pero tiene 4 α -hélices y 7 estructuras tipo β (figura 16) (Siebold, *et al.*, 2001).

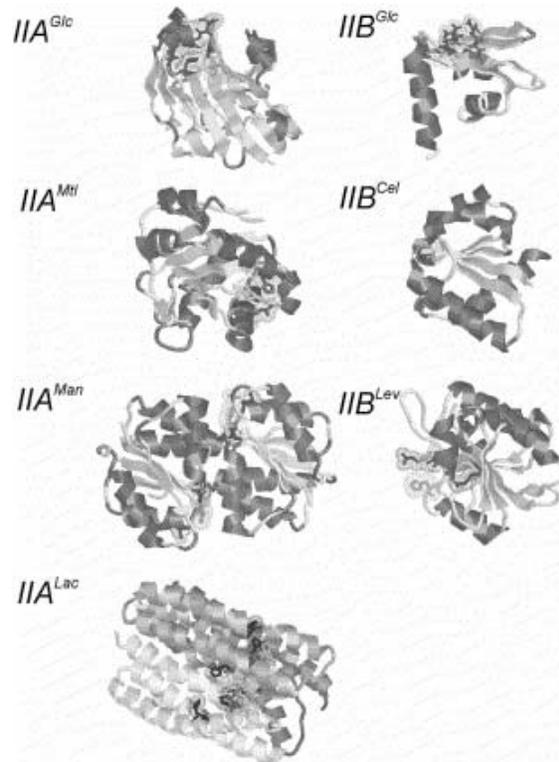


Figura 16.- Diversidad de los plegamientos de los dominios IIA y IIB. Representación de los dominios/subunidades de diferentes sistemas de transporte PTS. Los residuos que pueden ser fosforilados se presentan en barras y esferas en verde. La IIA^{Lac} es un trímero, la IIA^{Man} es un dímero y los otros dominios son monoméricos (Siebold *et al.*, 2001).

De las 5 EI encontradas en *E. coli*, las proteínas EI y HPr (las cuales están codificadas por el operón (*ptsH, I, crr* junto con IIA^{Gluc} respectivamente), forman parte del sistema general que participa en el transporte de azúcares PTS. La EI^{Frw} y Apr (homólogo a HPr) participan en una vía específica para fructuosa junto con FrwB, FrwC y FrwD (el transportador específico IIB^{Frw}-IIC^{Frw}-IID^{Frw}). Una vía de PTS propuesta incluye a FryA

(EI^{Fry}) y TPr (HPr^{Fry}), estas forman un operón con la proteína IIA^{Fry} (homólogas de PTS^{Frw}), y en virtud de que se ha encontrado que están agrupadas junto a varios genes que presentan homología a endoglucosidasas y peptidasas, se ha propuesto que pueden participar en la degradación de pared celular y el transporte de sus productos (Sielbold, *et al.*, 2001). Otros dominios estructurales homólogos a EI y HPr se han encontrado fusionados a una proteína con un dominio N-terminal regulatorio (R), el cual parece estar involucrado en el metabolismo de dihidroxiacetona (Tchieu, *et al.*, 2001). Por último, también se han encontrado genes homólogos a *ptsH* (*ptsP*) que presentan dominios extras en el N-terminal semejantes a NifA, el cual codifica para EI^{Ntr}, y se ha demostrado que junto con las proteínas NPr y IIA^{Ntr} forman una cascada de fosforilación específica que parece no funcionar en el transporte de azúcares, sino más bien en la señalización y regulación del estatus de carbono/nitrógeno en la célula. Como veremos mas adelante, el PEP-PTS^{Ntr} no sólo funciona en *E. coli* sino en muchas bacterias Gram-negativas (Rabus, *et al.*, 1999; Tchieu, *et al.*, 2001).

III.8.2.- Regulación del transporte y metabolismo de carbono por PTS de Glucosa en *E.coli*.

En *E. coli*, el PTS de glucosa (PTS^{Gluc}) tiene el papel principal de la regulación del transporte y fosforilación de carbohidratos, así como en regular su metabolismo a través de inducir genes responsables para el transporte y utilización de glucosa como fuente de carbono, reprimir los genes que participan en la utilización de otras fuentes alternativas de carbono que se encuentren en el medio de cultivo, y activar o inactivar enzimas a través de la fosforilación o la interacción proteína-proteína. Por razones energéticas el PTS^{Gluc} se encuentra en bacterias que fermentan glucosa utilizando la vía Embder-Meyerhof-Parnas y está ausente en bacterias aeróbicas estrictas como son *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Azotobacter*, excepto en *Bacillus subtilis* (Romano y Saier., 1992). En *E. coli* existen tres mecanismos principales de regulación genética en los cuales interviene el PTS^{Gluc}: la represión por catabolito, la exclusión del inductor y la inducción por glucosa. A continuación se describirán los tres modelos de regulación para los mecanismos mencionados (Postma, *et al.*, 1996; Plumbridge., 2002).

III.8.3.- Represión por catabolito y exclusión del inductor.

En *E. coli* y bacterias relacionadas la represión por catabolito se observa cuando la glucosa está presente. La cascada de fosfoproteínas procede de la siguiente manera. EI se autofosforila a expensas de PEP, la enzima EI-P transfiere su grupo fosfato a HPr, y HPr-P a la IIA^{Glc}. La IIA^{Glc}-P transfiere el grupo fosfato al dominio IIB y ésta a la glucosa entrante. En presencia de glucosa, cae la concentración de la IIA^{Glc}-P. Esto genera que IIA^{Glc} no pueda interaccionar con adenilato-ciclase (al no estar fosforilada) por lo que disminuye su actividad, de esta manera el nivel de AMPc baja. Esto provoca que los niveles de transcripción de los promotores dependientes de AMPc-CRP disminuyan. Muchos genes son regulados de esta manera, dentro de los cuales se encuentran genes que participan en

el transporte y metabolismo de otras fuentes de carbono diferentes de la glucosa. La concentración de IIA^{Glc}-P se incrementa sólo cuando la glucosa ha sido consumida y entonces se pueden utilizar otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa (figura 17) (Postma, *et al.*, 1997).

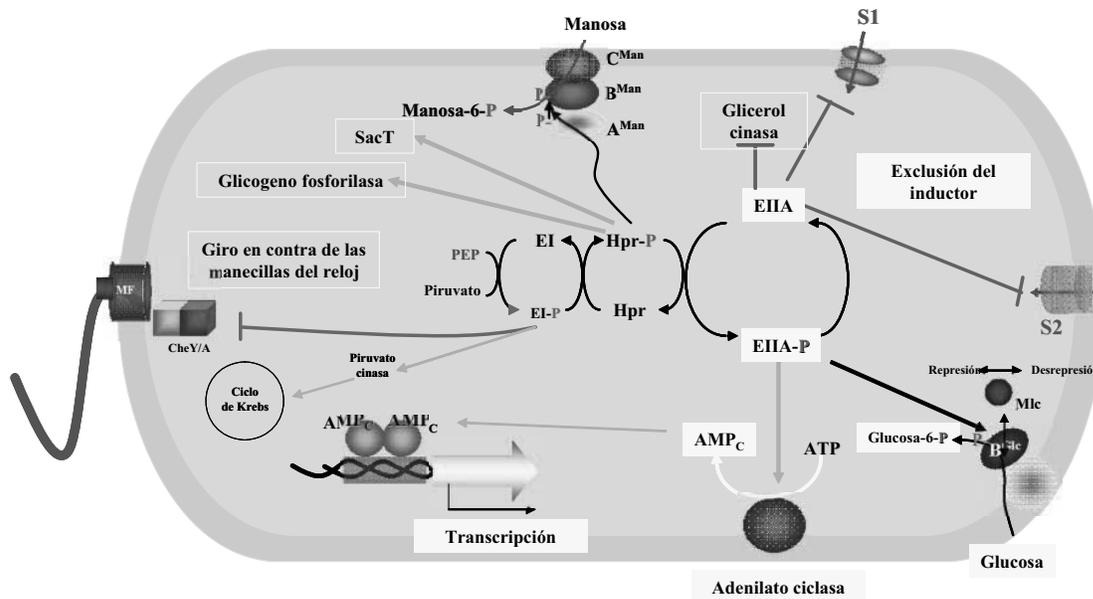


Figura 17.- Modelo para la regulación por PTS. Además de las proteínas del sistema general de PTS, las enzimas II mostradas son específicas para manitol (II^{Mt}) y para glucosa (IIA^{Glc}). La activación de adenilato ciclasa es por la forma fosforilada de IIA^{Glc} (P-IIA^{Glc}) y la inhibición de dos diferentes sistemas de transporte, S1y S2, (p.e: lactosa, melibiosa, maltosa o glicerol), por la forma no fosforilada IIA^{Glc} que también inhibe a la glicerol cinasa. Por otro lado también se han encontrado que HPr tiene un papel en la regulación positiva al fosforilar a la glicógeno fosforilasa y algunos antiterminadores de la transcripción como por ejemplo SacT. Además, EI regula negativamente a CheY/CheA lo que genera un cambio en la rotación del flagelo y con esto un cambio en la dirección del movimiento de la bacteria a su sustrato (quimiotaxis) (Postma *et al.*, 1997; Titgemeyer y Hillen., 2002).

La exclusión del inductor se presenta debido a que la proteína IIA^{Glc} (no fosforilada) puede interaccionar directamente con transportadores y con enzimas de diversos azúcares que participan en su metabolismo las cuales son inhibidas. Aunque se ha supuesto que la activación dependiente de CRP-AMP_c es el mecanismo más importante para la represión por catabolito, no obstante la exclusión del inductor puede contribuir de una manera igualmente importante a la regulación del metabolismo de fuentes alternativas de carbono (figura 17) (Stulke y Hillen, 1999).

III.8. 4.-Inducción por glucosa vía Mlc.

La inducción por glucosa ocurre a través del secuestro de un represor conocido como Mlc. Este regulador transcripcional fue identificado debido a que su sobre expresión permite crecer utilizando un medio complejo de fuentes de carbono que incluyen glucosa. Un posible mecanismo de regulación ha sido propuesto en virtud de que datos experimentales apuntan a que la forma no fosforilada de PtsG (IIB^{Glc}) se une a Mlc. La actividad normal de PTS estimula el transporte y fosforilación de glucosa, esto lleva a una forma no fosforilada de PtsG, la cual secuestra a Mlc, evitando que esta última reprima la transcripción (figura 18). Dentro de los genes que son activados por la desrepresión de Mlc,

se encuentran el operón *ptsHlcr* (que codifica para EI^{Glc}, HPr y IIA^{Glc}), *manXYZ* (que participan en el metabolismo de manosa), así como el activador de maltosa *malT*, que regula al regulón de maltosa (Lee *et al.*, 2000; Plumbridge, 1988; Plumbridge, *et al.*, 2002).

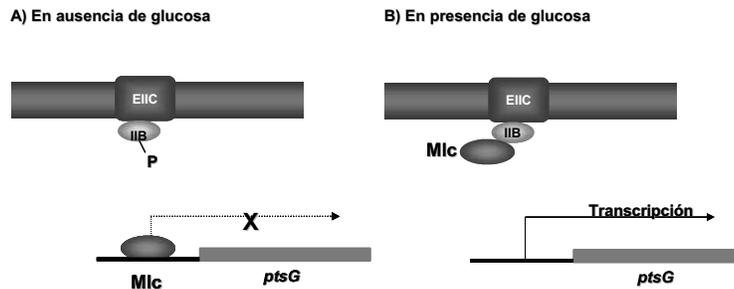


Figura 18.- Modelo para la expresión de *ptsG* durante el crecimiento en glucosa. A) En ausencia de glucosa, EIICB^{Glc} (PtsG) está presente en la membrana en una forma fosforilada y la transcripción de *ptsG* es reprimida por la unión de Mlc arriba del promotor. B) Cuando la glucosa está presente, es fosforilada por IICB^{Glc}, Mlc se une a la forma no fosforilada de IICB^{Glc} y libera al promotor de la represión (Lee, *et al.*, 2000; Plumbridge *et al.*, 2002).

III.8.5.- Reguladores transcripcionales que tienen dominios PTS y (PRDs).

Se han encontrado tanto en bacterias Gram-negativas como en bacterias Gram-positivas dos clases de proteínas que responden a señales mediadas por PTS: activadores transcripcionales multidominio operón específico y antiterminadores que contienen los llamados dominios regulados por PTS o PRDs, del inglés: **PTS Regulatory Domains**. Estos dominios pueden ser fosforilados a expensas de las proteínas PTS. Todos los reguladores transcripcionales presentan en su N-terminal uno o dos sitios de unión a ácidos nucleicos llamados NBDs (del inglés, Nucleic acid Binding Domains), y dos regiones PRDs. Adicionalmente, en su C-terminal presentan dos dominios con similitud a IIA y IIB de PTS. En los antiterminadores se presentan tanto los dominios NBDs, así como los dominios PRDs, sin embargo, carecen de los dominios IIA y IIB (figura 19) (Greenberg, *et al.*, 2002).

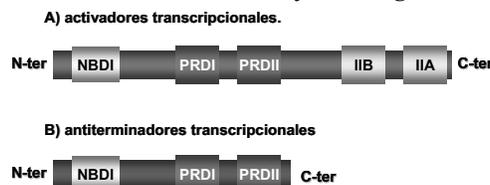


Figura 19.- Reguladores transcripcionales que tienen dominios PTS y (PRDs). Los activadores transcripcionales multidominio operón específico y antiterminadores que contienen los llamados dominios PRDs, del inglés: PTS Regulated Domains, estos dominios pueden ser fosforilados a expensas de las proteínas PTS. A) Todos los reguladores transcripcionales presentan en su N-terminal uno o más sitios de unión a ácidos nucleicos llamados NBDs del inglés, Nucleic acid Binding Domains, y dos regiones PRDs. Adicionalmente, en su C-terminal presentan dos dominios con similitud a IIB y IIA de PTS. B) En los antiterminadores se presentan tanto los dominios NBDs, así como los dominios PRDs, sin embargo carecen de los dominios IIA y IIB (Greenberg, *et al.*, 2002).

Análisis computacionales indican que los dominios NBDs de los activadores transcripcionales y de los antiterminadores no presentan similitud entre ellos por lo que pueden tener diferente origen evolutivo. Mientras los dominios PRDs se pueden dividir en cuatro subfamilias, PRD I y PRD II de los antiterminadores, y PRD I y PRD II de los activadores transcripcionales. Cada una de estas subfamilias presenta diferentes motivos, supuestamente con un significado funcional. Por ejemplo PRD I está sujeto a la

fosforilación por BglG (IIA^{Bgl}), resultando en la inactivación del antiterminador en ausencia del inductor. Los dominios PRD II son fosforilados directamente por HPr en ausencia de la fuente de carbono represora (figura 20) (Görke, 2003). Los activadores transcripcionales son fosforilados por PTS en los dominios IIA y IIB. Por ejemplo la fosforilación del dominio IIA del regulador LevR por HPr resulta en su activación. Contrariamente, la fosforilación del dominio IIA de LicR es controlado negativamente y específicamente por PTS^{Lic}. En la actualidad los detalles de los mecanismos moleculares de regulación están siendo estudiados en los diferentes complejos de activadores y antiterminadores transcripcionales (Greenberg, *et al.*, 2002).

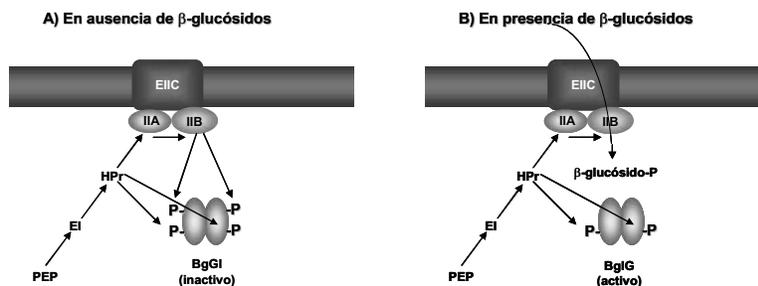


Figura 20.-Modelo para la regulación del antiterminador BglG mediada por PTS. A) en ausencia de β-glucósidos y azúcares PTS, las proteínas PTS son fosforiladas y el antiterminador BglG es fosforilado por EIIACB^{Bgl} en uno de los dominios PRD (PTS regulatory Domains). El Segundo dominio puede ser fosforilado por HPr. De este modo, BglG es ta inactivo para la ante-terminación. B) En presencia de β-glucósidos BglF (IIB) transfiere su grupo fosfato del dominio EIIIB del β-glucósido durante el transporte a la célula. La forma defosforilada de BglF defosforila a BglG. Sin embargo, el segundo sitio de fosforilación (mediado por HPr) es necesario para que BglG sea un antiterminador completamente activo (Greenberg, *et al.*, 2002).

III.9.- Represión por catabolito en bacterias Gram-positivas.

Un mecanismo diferente para la regulación global del carbono está presente en bacterias Gram-positivas de bajo contenido de GC, en el cual HPr y HPr cinasa/fosfatasa (HPrK/P) y la proteína CcpA (catabolic control protein) están involucradas en monitorear el estado fisiológico de la célula y la regulación del consumo de la fuente de carbono (Stulke y Hillen., 1999; Titgemeyer F. y Hillen., 2002).

La proteína HPr del sistema PTS refleja en su estado de fosforilación la situación nutricional y puede ser considerado como el equivalente funcional de IIA^{Glc} de bacterias entéricas. Una característica de este sistema es que HPr es fosforilado en un segundo sitio regulatorio, serina 46, por la HPrk/p la cual no está presente en enterobacterias. La fosforilación de HPr dependiente de PEP por la EI en His15 y la fosforilación de HPr en Ser46 por la HPrk/p, proporciona el balance entre HPr-his-P/HPr-ser-P, reflejando el estatus de carbono extra e intracelular (figura 21). Cuando los sustratos PTS son metabolizados, el nivel de intermediarios metabólicos se incrementan (tales como fructosa 1, 6-bifosfato). Estos metabolitos estimulan a la HPrk/p para generar HPrser-P, utilizando como sustrato ATP o PPi. Al mismo tiempo la velocidad de consumo de azúcar por PTS se reduce, debido a que HPr-ser-P no puede ser fosforilada en His- por la EI, lo cual inhabilita a HPr-P para participar en la obtención de la fuente de carbono (Deustscher, *et al.*, 1994; 1995). A medida que el nivel de intermediarios metabólicos cae y el nivel de fosfato inorgánico incrementa, la HPrk/p realiza la reacción de fosfatasa en HPr-ser-P, generando

HPr y Pi, lo que lleva a un incremento en el transporte dependiente de PTS (figura 21) (Kravanja *et al.*, 1999).

Además de participar en el transporte, HPr-his-P dispara la actividad de glicerol cinasa por fosforilación y coordina la utilización de glicerol con otras fuentes de carbono. La proteína HPr-his-P controla también varios activadores específicos de fuente de carbono y antiterminadores a través de fosforilar los dominios PRDs de una manera similar para lo descrito anteriormente en el antiterminador transcripcional Bgl de *E. coli* (Stulke y Hillen., 1999).

Otra función de HPr-his-P es formar un corregulador junto a CcpA (HPr-his-P:CcpA), el cual parece tener un papel dual de represor/activador al unirse a una secuencia de ADN conocida como elemento *cre* (catabolite responsive element) (figura 21). La posición del elemento *cre* varía con respecto al promotor sugiriendo que existen diferentes modos de control transcripcional mediados por CcpA. Por ejemplo, para el caso del gen *amyE*, el elemento *cre* se encuentra dentro del promotor y entonces la unión de CcpA puede prevenir el inicio de la transcripción (Miwa, *et al.*, 2000). En el caso del locus *hut* (utilización de histidina), el elemento *cre* se encuentra dentro de la región codificante, donde puede causar un bloqueo durante la elongación del transcrito naciente (Wray, *et al.*, 1994). Otros genes como los del operón de gluconato (*gnt*) de *B. subtilis*, contienen múltiples cajas *cre*, las cuales pueden contribuir sinérgicamente a la represión por catabolito dependiendo de las condiciones ambientales (Miwa, *et al.*, 1997). Como se ha mencionado, CcpA también puede activar la transcripción de otros genes tales como fosfofructosa cinasa (glucólisis), genes involucrados en la asimilación del amonio tales como tales como el que codifica para glutamato sintasa, genes que contribuyen a flujo metabólico tales como *ackA* (acetato cinasa) (Henkin, *et al.*, 1996; Faires *et al.*, 1999; Tobisch *et al.*, 1999). El mecanismo de cómo CcpA activa la transcripción es poco entendido, debido a que en algunos casos la caja *cre* está ausente, sin embargo, en otros como el de los genes *ackA* y *pta* (que participan en la producción de acetato), las cajas *cre* se encuentran río arriba del promotor donde el complejo (CcpA/HPr-ser-P/fructosa 1, 6, bifosfato) se une para estabilizar la unión de la ARN polimerasa (Turinsky, *et al.*, 1988, Presecan-Siedel, *et al.*, 1999).

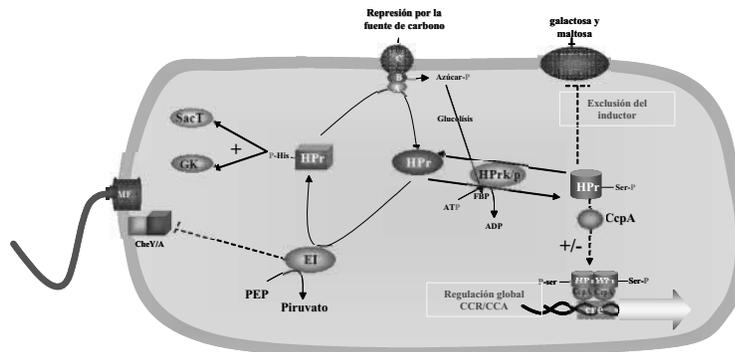


Figura 21.- Modelo de regulación del carbono por catabolito en bacterias Gram-positivas de bajo contenido de GC. La regulación se indicada como activación (+) y represión (T), los eventos de fosforilación son representados por flechas con línea continua y otras interacciones por líneas discontinuas. El estado de fosforilación de HPr es clave. Durante las condicione de represión, HPr es foroforilada en Ser46 (HPr-ser-P) por la HPr cinasa. La enzima HPr-P media la exclusión de inductor y la represión/activación es mediada por CcpA.

Durante la secuenciación del genoma de *B. subtilis* se ha descubierto un gen parálogo de *hpr* llamado *crh* (catabolite represión HPr-like protein) (Kunding *et al.*, 1997). La proteína Crh tiene el sitio para fosforilación His46, por la HPr cinasa y carece del sitio de fosforilación His15 por la EI (Galnier, *et al.*, 1997). De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que Crh no participa en el transporte de azúcares mediados por PTS, sin embargo, es funcional en la represión por catabolito; Crh puede ser fosforilada por la HPr cinasa y actuar como un correpresor junto con CcpA. En *B. subtilis* la enzima HPr parece actuar en paralelo con Chr ya que cuando la bacteria crece en un medio con succinato y glutamato, la regulación de la expresión del transportador de citrato-Mg⁺ es reprimida específicamente por Chr y no por HPr. Esto también sugiere que Crh pueda estar participando específicamente en la regulación del metabolismo de otros compuestos diferentes a los azúcares (Warner, *et al.*, 2003).

III.10.- El sistema PTS relacionado al nitrógeno (PTS^{Ntr}).

En *E. coli*, y en diversas bacterias se han encontrado además del gen *ptsP* que codifica para la enzima I^{Ntr}, los genes homólogos a *ptsH* y *ccr* (*npr* y *ptsN* respectivamente), estos dos últimos están formando un operón junto con el gen *rpoN* y codifican para las proteínas NPr, PtsN (IIA^{Ntr}) respectivamente (Reitzer *et al.*, 1996). Se ha demostrado que existe una cascada de fosforilación específica en donde la EI^{Ntr} fosforila a NPr y ésta a su vez a la enzima IIA^{Ntr} (Rabos, *et al.*, 1999). Sin embargo los mecanismos moleculares de la regulación por el sistema PTS no se conocen; cepas con deleciones en *ptsN* (IIA^{Ntr}) de *E. coli* presentan inhibición en el crecimiento cuando se les adiciona uno de varios carbohidratos o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, cuando se les crece con una base nitrogenada o un aminoácido como fuente de nitrógeno. Esta inhibición en el crecimiento es liberada cuando se le complementa con el gen *ptsN* o se le agrega sales de amonio al medio de cultivo, sin embargo no cuando se le agrega exógenamente AMPc. Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo de regulación diferente al sistema general PTS (Powell, *et al.*, 1994).

En *Klebsiella pneumoniae* y en *E. coli* se ha clonado y caracterizado el gen *rpoN*. Este forma parte del operón *rpoN*, (*rpoN*, ORF95, *ptsN*, ORF284 y *ptsO*). Mutación en el gen *ptsN* *K. pneumoniae* causa una elevada expresión de fusiones *pnifL::lacZ*, *pnifH::lacZ* y *glnAp2::lacZ* (los productos de estos genes participan en la asimilación y fijación del nitrógeno), lo cual se ve reflejado en el incremento en la capacidad para fijar nitrógeno. Mientras que mutantes en *ptsO* tienen efectos contrarios en los mismos blancos de transcripción y en la fijación de nitrógeno. Estos resultados sugieren que el estado de fosforilación de PtsN (IIA^{Ntr}) participa en la modulación del metabolismo del nitrógeno (Merrick *et al.*, 1995).

En *P. putida* se ha clonado la región río debajo de *rpoN* y se encontraron cuatro ORFs, dos de los cuales codifican para las proteínas NPr y IIA^{Ntr} del sistema PTS^{Ntr}. Se obtuvieron mutantes en los cuatro ORFs. Mutantes no polares en los ORFs 102 y 284 no presenta fenotipo en la inhibición de la degradación de tolueno causada por glucosa, mientras que mutantes en *ptsN* (IIA^{Ntr}) no responden a la represión por glucosa. Se midió el transporte de

glucosa en la mutante *ptsN* y se encontró que no estaba afectada. Estudios a nivel de transcripción en mutantes *ptsN* de *P. putida* muestran una incapacidad para reprimir el promotor *Pu* (de los genes que participan en la degradación de tolueno). Mediante una mutación que cambia el sitio de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr} HIS68/ASP (que mimetiza un estado fosforilado), encuentran que la proteína mutante reprime constitutivamente al promotor *Pu*. Lo que sugiere que la proteína IIA^{Ntr}-P es un regulador negativo de la transcripción del promotor *Pu* en respuesta a glucosa (Cases, *et al.*, 1999). En *E. coli* se encontró que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado activa la desrepresión del operón *ilvBN*, el cual codifica para la enzima acetohidroxi-ácido sintasa I (AHAS I), la enzima que cataliza la primera reacción en la síntesis de amino ácidos ramificados (Lee *et al.*, 2005). Debido a que la proteína IIA^{Ntr} no tiene dominios de unión a DNA, debe haber algún factor intermediario que regule tanto la transcripción del promotor *Pu* como del operón *ilvBN*. Recientemente también en *E. coli*, se ha demostrado que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilada interacciona con la proteína Trk, la cual regula la entrada de potasio a la célula (Lee *et al.*, 2007).

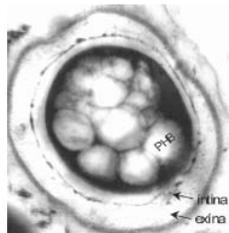
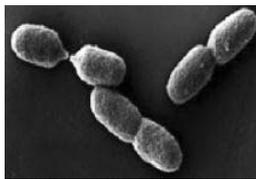
La caracterización de mutantes en los genes que codifican para las enzimas del sistema PTS^{Ntr} (EI^{Ntr}, Npr y IIA^{Ntr}). Sugiere que estas proteínas participan en la modulación del metabolismo del nitrógeno y carbono en diferentes bacterias a través de su estatus de fosforilación, sin embargo, el mecanismo es poco conocido. Se ha pensado que en estos casos la proteína IIA^{Ntr} en su estado fosforilado o no fosforilado activa o inhibe la función de otras proteínas a través de la interacción más que al transferir el grupo fosfato (Powell *et al.*, 1995; Michiels *et al.*, 1998; Segura y Espín 1998; Cases, *et al.*, 1999; Cases y DeLorenzo., 2000).

III.11.- Nuestro modelo de estudio: *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa del suelo, pleomórfica que puede medir de 2 a 10 μM de diámetro, fija nitrógeno y es una de las bacterias más atractivas para ser utilizadas para la producción industrial de PHB, debido a sus altos rendimientos y su capacidad de utilizar desechos orgánicos de agroindustrias y de industrias procesadoras de alimentos, lo que permitiría disminuir los costos de producción (Page, 1989; Dewes, 1990; Page *et al* 1993, Lee, 1996; Cho *et al*, 1997). Como una característica muy particular, *A. vinelandii* presenta un ciclo de vida único (figura 22). El ciclo incluye una fase de vida vegetativa y una fase de vida latente en forma de quiste, ésta última es una forma de resistencia a la desecación. No obstante, se sabe que los quistes son capaces de sobrevivir por más de 10 años (Sadoff, H., 1975). Las células vegetativas son móviles por la presencia de flagelos peritricos. Los cambios morfológicos iniciales en la formación del quiste, son la pérdida de movilidad y una división binaria que da origen a dos células esféricas encapsuladas de aproximadamente 1.5 a 2 μM de diámetro (Sadoff, 1975). El cuerpo central del quiste está cubierto por dos capas: una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina. El principal componente de estas capas es el alginato, el cuerpo central presenta una acumulación de gránulos de poli- β -hidroxibutirato, a partir del cual se

pensaba que se formaban los alquilresorcinoles, lípidos característico de los quistes (figura 22B) (Sadoff., 1975). Se conocen los cambios que ocurren a nivel bioquímico y morfológico durante la formación del quiste, pero poco se sabe a nivel molecular. Además las condiciones que disparan la diferenciación celular en vida libre son desconocidas. Sin embargo, en el laboratorio el enquistamiento se puede inducir con n-butanol o β -hidroxibutirato. Se sabe que el proceso de diferenciación está directamente relacionado con la síntesis de tres polímeros de importancia industrial el alginato, los alquilresorcinoles y el polihidroxibutirato (PHB), por lo cual en el laboratorio de la Doctora Espín, se estudia la regulación del enquistamiento y la síntesis de estos polímeros (Segura y Espín., 2000).

A) Célula vegetativa B) Quiste



C) Ciclo de vida de *A. vinelandii*

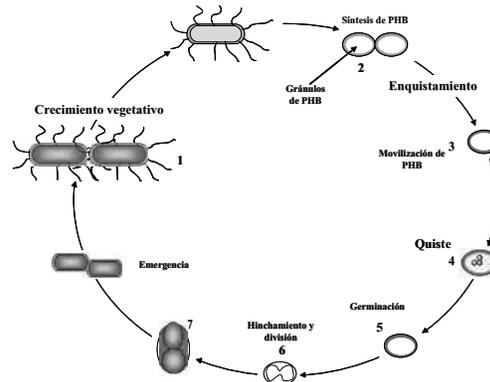


Figura 22- Diferentes estados alternativos en el ciclo de vida de *A. vinelandii*. A) Microscopía electrónica de barrido de células vegetativas en división. B) Quiste maduro resistente a desecación (Segura y Espín, 2000). C) Ciclo de vida de *A. vinelandii* (Sadoff et al., 1975).

IV.- ANTECEDENTES

IV.1.- Vía de síntesis de PHB y su regulación a nivel enzimático en *Azotobacter vinelandii*.

En *A. vinelandii* la síntesis de PHB se lleva a cabo en tres etapas enzimáticas. La primera reacción se da por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, la cual es catalizada por la enzima β -cetotiolasa, obteniéndose como producto acetoacetil-CoA (Ritchie y Dawes, 1969). En el segundo paso enzimático, la acetoacetil-CoA es reducida por la acetoaceti-CoA reductasa, utilizando NADPH y produciéndose D- β -hidroxibutiril-CoA, que es polimerizada por la PHB sintasa (Senior y Dawes., 1973). Se ha encontrado un mecanismo regulador de la síntesis de PHB en el primer y segundo paso de la ruta. Condiciones fisiológicas que generan una relación alta de acetil-CoA/CoA y NADPH/NADP inhiben alostericamente el primer paso en el ciclo de Krebs y favorecen la síntesis de PHB al activar alostéricamente a la β -cetotiolasa y la acetoacetil-CoA reductasa. Las condiciones contrarias inhiben alostéricamente la síntesis de PHB en ambas etapas (Senior y Dawes., 1973; Manchak y Page., 1994).

IV.2.- Organización de los genes que codifican para las enzimas de la síntesis de PHB y su regulación en *A. vinelandii*.

Con el propósito de conocer los genes que participan en la síntesis y regulación del PHB, en nuestro grupo de investigación se hicieron dos mutagénesis con los transposones *Tn5* y *miniTn5::lacZ* en la cepa UW136 de *A. vinelandii*, con el objetivo de aislar varias mutantes afectadas en la síntesis de PHB. La caracterización de uno de los locus afectados indicó la presencia del gen *phbB* que codifican para la acetoacetil-CoA reductasa la segunda enzima de la vía de biosíntesis (Arellano., 2000; Segura y Espín, 1998). Otra inserción del *miniTn5* se pudo localizar en el gen *phbR* (que codifican para un posible regulador transcripcional de la familia de AraC/XyIR) mutaciones en este gen disminuyen la acumulación de PHB hasta un 50 % (Peralta-Gil, 2004). La secuenciación de las regiones afectadas por estas inserciones demostró la presencia de los genes *phbA* y *phbC* adyacentes a *phbB*, posiblemente formando un operón *phbBAC* y *phbR* que se encuentra hacia arriba y en sentido divergente (Figura 23). Los otros dos genes, *phbP* y *phbF*, probablemente que codifiquen para proteínas asociada a los gránulos de PHB y su regulador transcripcional, respectivamente (Segura y Espín., 2000).

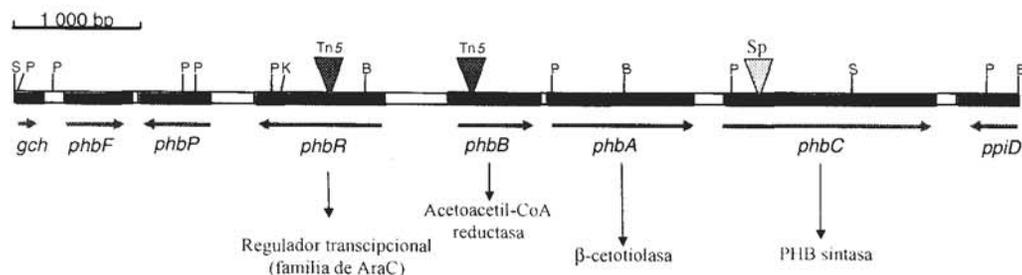


Figura 23.- Organización genética de los genes involucrados en la síntesis y regulación de PHB en *A. vinelandii* (Segura y Espín, 2000)

IV.3.- El sistema de dos componentes GacS/GacA, RpoS, PhbR y su papel en la acumulación de PHB.

Por otro lado, al estudiar los genes que participan en la síntesis de alginato en la cepa ATCC9046 de *A. vinelandii*, se identificaron los genes *gacS* y *gacA*. La inactivación de estos genes reduce la producción de alginato y de manera sorprendente también se encontró que no acumulan PHB (Castañeda, *et al.*, 2000). Por otra parte una mutación en el gen *rpoS*, también presenta una disminución en la acumulación de PHB (Peralta-Gil., 2004).

En un trabajo previo se estudió la regulación del operón *phbBAC* y del gen regulador *phbR* de *A. vinelandii* mediante análisis de exonucleasa S1 y fusiones transcripcionales (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Peralta-Gil M., 2004). Se encontró que *phbR* regula al operón biosintético *phbBAC* en dos promotores que se encuentran hacia arriba de *phbB*. Mientras que el promotor pB1 es activado por PhbR, el promotor pB2 es reprimido. Esto probablemente se debe a que los promotores están juntos y parcialmente sobrelapados. Por otro lado, mutantes en *gacA* abaten la transcripción de *phbB* en ambos promotores lo que indica que esta proteína regula la transcripción de los genes biosintéticos al menos a través de dos vías diferentes, una a través de regular *rpoS*, y otra a través de regular *phbR*. Los mismos resultados indican que pueda existir otra vía adicional que también puede estar regulada por *gacA*. En este mismo trabajo se encontró que existen dos inicios de transcripción para el gen *phbR* y que un inicio de la transcripción del gen regulador *phbR* es afectada por una mutante *gacA* y esto es a través de regular a *rpoS* (figura 24) (Peralta-G., *et al.*, 2002). Adicionalmente, mediante análisis de computadora se pudieron encontrar en la región intergenética de *phbR* y *phbBAC*, seis sitios posibles de unión para *phbR*, esto sugiere que pueda existir un mecanismo de regulación de la transcripción muy parecido al sistema AraC, en el operón *phbBAC* mediado por PhbR (Peralta-Gil., 2004).

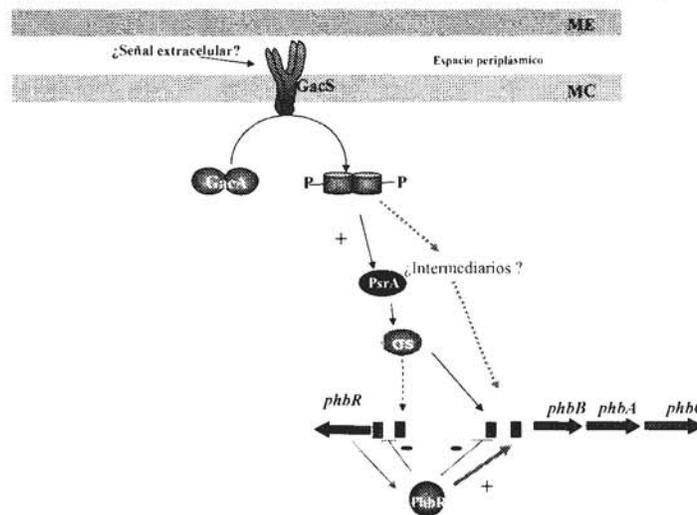


Figura 24.- Modelo de regulación del gen *phbR* y el operón *phbBAC* de *A. vinelandii* mediado por el sistema GacS/GacA, el factor RpoS y el regulador transcripcional PhbR (Peralta-Gil, *et al.*, 20004 Peralta-Gil, 2004).

IV.4.- Aislamiento y caracterización de la mutante *ptsP* de *A. vinelandii*.

En una ronda de mutagénesis de la cepa UW136 *A. vinelandii* con el transposón *Tn5*, se encontró que una inserción en el gen *ptsP*, tiene una menor acumulación de PHB en cuando la cepa crece en Py con sacarosa al 2 %, además es incapaz de crecer en glucosa bajo condiciones de fijación de nitrógeno y presenta una disminución en la formación de quistes maduros. Adicionalmente, el crecimiento en gluconato como fuente de carbono es menor respecto de la cepa silvestre. También, ni el transporte de glucosa ni las actividades de glucosa-cinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se afectaron por la mutación en *ptsP* pero se vió disminuída la actividad de β -cetotilasa (primera enzima en la vía de síntesis de PHB) (Segura y Espín., 1998). El gen *ptsP* ha sido caracterizado previamente en *E. coli* y presenta identidad al gen *ptsI*, que codifica para la enzima I (EI) del sistema de transporte y fosforilación de azúcares (PTS) (Postman, *et al*, 1996).

V.- HIPÓTESIS

La organización genética del operón *rpoN* debe de estar conservada en *A. vinelandii* y la cascada de fosforilación del sistema PTS^{Ntr} debe ser funcional y estar participando de alguna manera en la síntesis de PHB. Esto sería a través de regular la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de PHB, o a través de regular la transcripción o de la actividad del regulador transcripcional *phbR*, u otro factor de transcripción (figura 25).

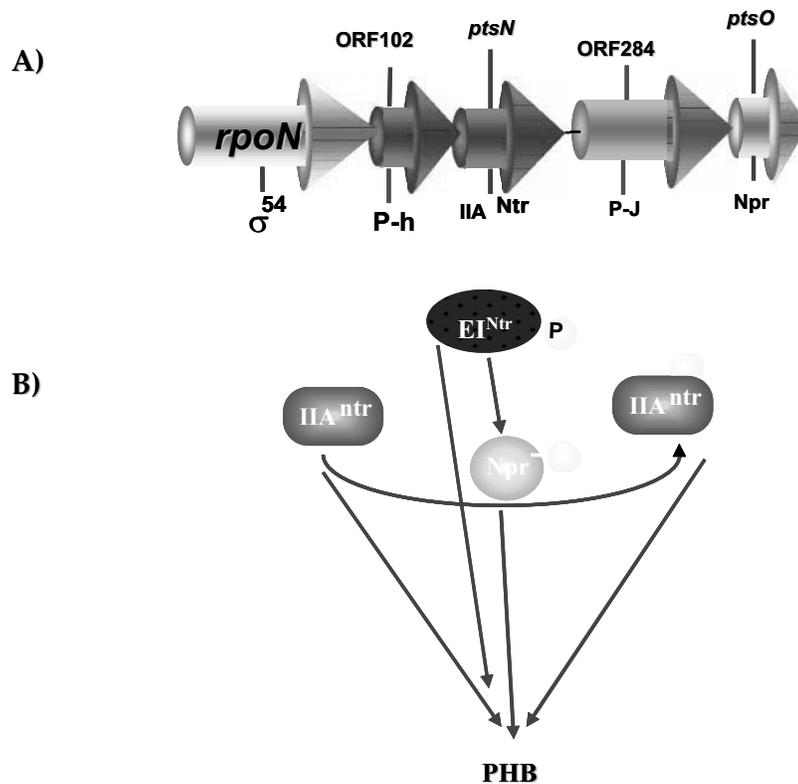


Figura 25.- Hipótesis de trabajo. A) Como en otras bacterias, es posible que la organización genética del operón *rpoN* este conservada en *A. vinelandii*. B) Las proteínas Npr y IIA^{Ntr} pueden estar formando una cascada que podría estar involucrada en la síntesis de PHB, el enquistamiento y la protección respiratoria de la nitrogenasa.

VI.- OBJETIVOS

Objetivo general.- Determinar el papel de las proteínas Npr y Ntr^{Ntr} y la relación con la enzima Ntr^{Ntr} en la vía de señalización que regula la síntesis de PHB y el enquistamiento en *A. vinelandii*.

Objetivos específicos

1) Clonar y caracterizar los genes p_{Ntr} y p_{Npr} que codifican para las otras dos proteínas del sistema PTS^{Ntr} y Npr.

2) Estudiar el papel de las proteínas Ntr^{Ntr} y NPr en la regulación de la acumulación de PHB y el enquistamiento, a través de generación de mutantes en los genes p_{Ntr} , p_{Npr} y midiendo la acumulación de PHB y el porcentaje de enquistamiento.

3) Estudiar el papel de las proteínas Ntr^{Ntr} y NPr en la regulación de los genes *phbR* (el regulador) y *phbA* (del operón biosintético). Esto a través de estudiar el efecto de las mutaciones en los genes p_{Ntr} , p_{Npr} .

4) Conocer si las proteínas Ntr^{Ntr} y Npr están formando una cascada de regulación junto con la enzima Ntr^{Ntr} , o a través del análisis genético de mutantes dobles $p_{\text{Npr}}p_{\text{Ntr}}$ y $p_{\text{Ntr}}p_{\text{Npr}}$ y $p_{\text{Ntr}}p_{\text{Ntr}}$ de *A. vinelandii*, midiendo su efecto sobre la transcripción de los genes *phbR* y *phbA*, así como la acumulación de PHB y el porcentaje de enquistamiento y la protección respiratoria de la nitrogenasa.

VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE I.

En ésta sección se presentan los resultados y la discusión en dos partes: la primera parte corresponde al artículo que ha sido aceptado para publicación en la revista Journal Molecular Microbiology and Biothechnology y la segunda parte resultados adicionales y complementarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE I (Artículo).

Title: Enzyme I^{Ntr}, Npr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*

Authors: Raúl Noguez, Daniel Segura Soledad Moreno, Alberto Hernandez, Katy Juarez and Guadalupe Espín*.

Address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México¹. Apdo Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62271, México.

*Corresponding author Phone 52-777-3291644

Fax 52-777-3172388

Electronic mail espin@ibt.unam.mx

Abstract

The *ptsP*, *ptsO*, and *ptsN* genes encode Enzyme I^{Ntr}, Npr, and IIA^{Ntr} proteins of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}). These proteins participate in a phosphoryl transfer chain in several bacteria, where IIA^{Ntr} appears to be the terminal phosphoryl acceptor. Inactivation of the *ptsP* gene in *Azotobacter vinelandii* was previously shown to reduce poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production. Therefore, the question of a role of the *ptsO* and *ptsN* gene products in PHB synthesis was raised. In this work we constructed strains carrying mutations in the *ptsO* and *ptsN* genes and tested their effect on PHB accumulation. In the *ptsO* mutant, PHB accumulation diminished as in the *ptsP* mutant, while the *ptsN* mutant, accumulated more PHB than the wild type strain. The negative effect of the *ptsP* and *ptsO* mutations on PHB accumulation was suppressed by the *ptsN* mutation, and a H68A mutation in the phosphorylatable site of IIA^{Ntr}, impaired PHB accumulation similar to the *ptsP* mutation. The *ptsP* and *ptsO* mutations negatively affected transcription of the *phbBAC* biosynthetic operon and of the *phbR* gene coding for a transcriptional activator of *phbBAC*, whereas the *ptsN* mutation increased expression of this operon. Taken together our data provide genetic evidence suggesting that the non-phosphorylated form of IIA^{Ntr} is involved in negative regulation of *phbR* and *phbBAC* expression in *A. vinelandii*.

Key words: Nitrogen-related phosphotransferase system *ptsP*, *phbB*, PhbR, Enzyme I^{Ntr}, Npr, IIA^{Ntr}

Introduction

Azotobacter vinelandii is a nitrogen-fixing soil bacterium that accumulates poly- β -hydroxybutyrate (PHB) as carbon and energy reserve. PHB is a polymer of biotechnological interest because it is used as biodegradable thermoplastic. Regulation of PHB synthesis in *A. vinelandii* is complex. The activity of the β -ketothiolase activity catalyzing the first step of the PHB biosynthetic pathway is inhibited by Coenzyme A (CoA) [Senior and Dawes, 1973]. Under conditions of oxygen limitation and carbon excess, reducing power accumulates and inhibits the citrate synthase activity, lowering the entrance of acetyl-CoA to the TCA cycle. The high ratio of acetyl-CoA/CoA relieves the inhibition of the ketothiolase by CoA, allowing the entrance of acetyl-CoA to PHB synthesis [Senior and Dawes, 1973; Segura and Espin, 2004]. Synthesis of PHB is also controlled at the transcriptional level. The genes encoding the enzymes of the PHB biosynthetic pathway are clustered in the *phbBAC* operon [Segura et al., 2003], and are transcribed from two overlapping promoters, one of which is activated by PhbR, a transcriptional activator of the AraC family [Peralta-Gíl et al., 2002].

The nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) is present in several bacteria. It consists of the Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr}. These proteins are homologues of Enzyme I, HPr and Enzyme IIA^{Glu} of the phosphoenol pyruvate-sugar phosphotransferase system (PTS), which mediates the uptake and concomitant phosphorylation of glucose in a number of bacterial genera [Postma et al., 1993]. In *Escherichia coli*, Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} form the following phosphoryl transfer chain: phosphoenolpyruvate (PEP) \rightarrow Enzyme I^{Ntr} \rightarrow NPr \rightarrow IIA^{Ntr}, where IIA^{Ntr} appears to be the terminal phosphoryl acceptor in the pathway [Rabus et al., 1999]. Enzyme I^{Ntr} is encoded by *ptsP* [Reitzer et al., 1996; Segura and Espín, 1998; Tan et al., 1999]. The *ptsO* and *ptsN* genes, encoding NPr and IIA^{Ntr} respectively, form part of the *rpoN-orf95-ptsN-orf284-ptsO* gene cluster in several bacteria, where *rpoN* codes for the sigma factor σ^{54} of RNA polymerase

[Merrick and Coppard, 1989; Jones et al., 1994; Powell et al., 1995; Reitzer et al., 1995, Cases et al., 1999], and *orf95* and *orf284* code for proteins of unknown function.

Little is known concerning the function of the PTS^{Ntr} proteins. They seem to play multiple regulatory roles in several bacteria. In *E. coli*, a *ptsN* null mutant exhibited poor utilization of various amino acids as nitrogen source [Powell et al., 1995], and the dephosphorylated form of enzyme IIA^{Ntr} is required for derepression of the *ilvBN* operon [Lee et al., 2005]. In *Rhizobium etli*, inactivation of *ptsN* affected melanin production [Michiels et al., 1998]. A mutation in *ptsN* (ORF162) increases transcription from sigma 54 promoters in *Klebsiella pneumoniae* [Merrick and Coppard, 1989]. In *Pseudomonas putida*, IIA^{Ntr} controls sensitivity of the toluene-responsive Pu promoter to glucose repression [Cases et al., 1999], whereas in *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*, Enzyme I^{Ntr} is involved in virulence control [Higa et al., 2001; Tan et al., 1999].

In *A. vinelandii*, a *ptsP* mutation was shown to impair nitrogen fixation under low carbon and excess oxygen conditions and to reduce poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulation [Segura and Espín, 1998]. The control point at which PHB accumulation was affected by the *ptsP* mutation in *A. vinelandii* is not known. In this study we constructed and characterized strains carrying mutations in the *ptsN* and *ptsO* genes and investigated their effect on PHB accumulation and on transcription of *phbR* and *phbBAC* genes. Our results indicate that the non-phosphorylated form of IIA mediates repression of *phbR* and *phbBAC* transcription.

Results

The A. vinelandii rpoN-orf107- ptsN-orf284- ptsO gene cluster

In *E. coli*, Enzyme I^{Ntr}, Npr and IIA^{Ntr} proteins comprise a phosphoryl transfer chain [Rabus et al., 1999]. Inactivation of *A. vinelandii ptsP*, encoding Enzyme I^{Ntr}, reduced PHB accumulation

[Segura and Espín, 1998]. Therefore, the question of a role of NPr and IIA^{Ntr} proteins in the control of PHB synthesis was raised. In *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *P. putida*, the *ptsO* and *ptsN* genes, coding for Npr and IIA^{Ntr}, form part of a four gene cluster located downstream of the *rpoN* gene, encoding sigma 54 factor [Merrick and Coppard, 1989; Jones et al., 1994]. To clone and sequence the *A. vinelandii* *ptsO* and *ptsN* genes, we isolated a 5.4 kb *KpnI* fragment (Fig. 1), from cosmid clone pLV72; carrying part of the *rpoN* gene and its downstream region from strain UW136 [Toukdarian and Kennedy, 1986]. Nucleotide sequence of this fragment (Accession number AF077237) revealed four genes: 120 nt downstream *rpoN* and separated by 12 nt we found two orfs, one named *orf107* and a *ptsN* homolog; 95 nt downstream *ptsN*, and separated by 21 nt we found *orf284* and the *ptsO* homolog. Downstream *ptsO* and in opposite direction is *pmbA* (Fig. 1) a gene encoding a putative modulator of DNA gyrase, (www.azotobacter.org/wat). The *ptsN* and *ptsO* genes encode proteins of 154 and 90 amino acids sharing 83.41 and 82.12 % identity with the *P. aeruginosa* IIA^{Ntr} and Npr proteins respectively. Furthermore, *A. vinelandii* IIA^{Ntr} contains the conserved phosphorylatable histidine residue (position 68) [Bordo et al., 1998], and Npr contains the conserved phosphorylatable residues histidine 15 and serine 47. The *A. vinelandii* *orf107* and *orf284* encode polypeptides sharing 87.95 and 85.95% identity to their homologs in *P. aeruginosa*. We concluded that these four genes are homologues of the genes of the *rpoN* gene cluster described in *E. coli* and *P. putida*.

Effect of ptsO and ptsN mutations on PHB synthesis

In order to investigate the role of Npr and IIA^{Ntr} proteins on PHB accumulation, strains RN4, carrying a *ptsN*::Km^r, and strain RN6, with a *ptsO*::Sp^r mutation, were constructed as described in Materials and methods. Cells of wild type strain UW136 were shown to have an opaque appearance after 5 days growth on PY sucrose plates due to PHB accumulation [Segura and Espín, 1998]. The *ptsO* mutant RN6 showed a less opaque phenotype, similar to that of the *ptsP* mutant DS988 (Fig. 2A), and accumulated less PHB than the wild type UW136 when grown in

PY plates supplemented with 2% sucrose (Fig. 2B). In contrast, strain RN4, carrying the *ptsN* mutation, had a more opaque phenotype and accumulated almost twice as much PHB as the wild type (Fig. 2). To confirm that the PHB phenotypes were caused by the absence of the *ptsN* and *ptsO* gene products and not to polar effects, we carried out complementation of the *ptsN* and *ptsO* mutants. Plasmid pDS_{ptsN}, unable to replicate in *A. vinelandii* and carrying a promoter-less wild type *ptsN* copy, was transformed into RN4 for co-integration into the chromosome by means of a single recombination event with the chromosomal *ptsN*::Km^r copy. Similarly, pDS_{ptsO}, carrying a promoter-less wild type *ptsO*, was transformed into RN6 strain. Two types of transformants were selected for each strain: those that showed the wild type PHB phenotype, named DS4 and DS6 (Fig. 3A), in which integration of the plasmids occurred upstream the site of the Km^r or Sp^r insertions respectively, allowing the wild-type *ptsN* and *ptsO* genes to be transcribed from their own promoters (Fig 3B), and those with the RN4 and the RN6 phenotype (not shown). Integration of plasmids in the DS4 and DS6 strains was confirmed by Southern analysis (data not shown). These data confirmed that the PHB phenotype in strains RN4 and RN6 is due to the absence of *ptsN* or *ptsO* gene products. These results indicated that Npr and IIA^{Ntr} proteins are also involved in regulation of PHB accumulation, since in the absence of Npr, PHB accumulation is reduced, whereas the lack of IIA^{Ntr} has a positive effect on the accumulation of this polymer.

The ptsN mutation is epistatic on ptsP

Mutations in the *ptsP* [Segura and Espín, 1998] and *ptsO* on one hand, and mutations in *ptsN* on the other, have opposite effects on PHB accumulation, suggesting that in *A. vinelandii*, as in *E. coli*, a phosphorelay occurs between the PTS^{Ntr} proteins, and the non-phosphorylated IIA^{Ntr} protein, present in the *ptsP* and *ptsO* mutants, is responsible for the negative effect on PHB accumulation. Therefore, we investigated the effect of *ptsP-ptsN* and *ptsO-ptsN* double mutations on the accumulation of this polymer. We constructed strain RN7 carrying both *ptsP* and *ptsN*

mutations, and strain RN8, a *ptsO-ptsN* double mutant. As shown in Figure 2, PHB accumulation in strain RN7 was similar to that of the *ptsN* single mutant RN4. In mutant RN8, accumulation of PHB was higher than in *ptsO* mutant RN6 but lower than that observed in the wild type (Fig. 2). As expected, the *ptsN* mutation suppressed the negative effect of the *ptsP* and the *ptsO* mutations, although suppression in the *ptsO* was partial. In the *ptsP-ptsO* double mutant accumulation of PHB was similar to that of the *ptsO* mutant (Fig. 2). Taken together these results support that in *A. vinelandii* the IIA^{Ntr} protein in its non-phosphorylated state has a negative effect on PHB accumulation.

A H68A mutation in the phosphorylation site of IIA^{ntr} impairs PHB accumulation

IIA^{Ntr} contains the highly conserved phosphorylatable histidine residue H68. In order to test the effect of the phosphorylation state of IIA^{Ntr} on PHB accumulation, plasmid pALA8, carrying a promoter-less *ptsN* with a H68A mutation, was constructed. This plasmid was transformed into the wild type strain for co-integration into the chromosome by a single recombination event with the *ptsN* wild type chromosomal copy. Two types of kanamycin resistant transformants were isolated, those with a PHB phenotype similar to that of the *ptsP* or *ptsO* mutants, like strain UW136::pALA8a (Fig. 4A), in which recombination occurred upstream the histidine 68 codon leaving the *ptsN* H68A copy under the control of its own promoter and a promoter-less *ptsN* wild type copy (Fig. 4B); and those that retained the wild type PHB phenotype (strain UW136::pALA8b; not shown), in which recombination of the *ptsN* H68A occurred downstream the histidine 68 codon. Co-integration of the plasmid was confirmed by PCR in strains UW136::pALA8a and UW136::pALA8b (Data not shown). As expected, co-integration of plasmid pALA7, carrying a promoter-less *ptsN* wild type gene (phosphorylatable IIA^{Ntr}) in the UW136 chromosome resulted in a single type of transformants (UW136::pALA7) with wild type PHB phenotype (Fig. 4A). These results are in agreement with the proposal that, similar to the

ptsP or *ptsO* mutations, the H68A mutation should produce a non-phosphorylated IIA^{ntf} protein that has a negative effect on PHB accumulation.

The pts mutations affect transcription of phbBAC and phbR genes

To investigate whether of the *pts* mutations affected transcription of the *phbBAC* operon, the level of *phbB* mRNAs was determined by real time RT-PCR of the wild type and the *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* mutants, as described in Materials and methods. The level of the transcripts of the *gyrA* gene (encoding gyrase subunit A) was used to normalize the level of the *phbB* mRNA among the tested strains. To confirm that *gyrA* was constitutively expressed, the amount of *phbB* mRNA was also normalized using the transcription termination factor *rho* as internal control, and the expression profiles obtained with *gyrA* or *rho* as internal standards were almost identical (Data not shown).

Analysis of the data obtained from the real-time RT-PCR experiments (Fig. 5A) showed that the relative level of *phbB* mRNA was reduced to about 30% in the *ptsP* mutant, and to 40% in the *ptsO* mutant. In contrast, the *phbB* mRNA increased almost 2-fold in the *ptsN* mutant with respect to the wild type. Transcription of the *phbBAC* biosynthetic operon initiates from two overlapping promoters, pB1 and pB2. PhbR, a transcriptional regulator of the AraC family is required for pB1 activation [Peralta-Gil et al., 2002]. We investigated whether the effect of *ptsP*, *ptsN* and *ptsO* mutations also affected expression of *phbR*. As shown in Figure 5B, the *pts* mutations have similar effects on *phbR* mRNA levels than those observed for *phbB* mRNA. The activity of the pB1 and pB2 promoters in the *pts* mutants was analyzed by Nuclease SI-mapping. As shown in Figure 6, transcription from the pB1 and pB2 promoters was significantly reduced in the *ptsP* and *ptsO* mutants. In contrast, transcription from pB1 and pB2 seems to be higher in the *ptsN* mutant than in the wild type. These results indicated that the *pts* mutations affected PHB synthesis by controlling expression of the *phbR* and *phbBAC* genes.

Discussion

This study shows that in *A. vinelandii*, the genes encoding Npr and IIA^{Ntr} proteins are present downstream the *rpoN* gene. They are organized in the *orf107-ptsO-orf284-ptsN* gene cluster that is conserved in *A. vinelandii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. In *E. coli* these genes are transcribed as a single operon together with *rpoN* [Powell et al., 1995]. The complementation analysis of the *ptsN* and *ptsO* mutants carried out in this study, as well as the length of the intergenic sequences in the *rpoN-orf107-ptsN-orf284-ptsO* gene cluster, suggest that *ptsN* and *ptsO* are transcribed from different promoters in *A. vinelandii*, similar to the transcriptional organization observed in *P. putida* [Kohler et al., 1994] a close relative of *A. vinelandii* [Rediers et al., 2004].

The negative effect of the *ptsO* mutation on PHB accumulation is similar to the effect of the previously characterized *ptsP* mutation [Segura and Espín, 1998], whereas a positive effect of the *ptsN* mutation was observed. These results are compatible with a model on which a phosphorelay Enzyme I^{Ntr} → Npr → IIA^{Ntr}, similar to that observed in *E. coli* [Rabus et al., 1999], is present in *A. vinelandii*. According to this model, a non-phosphorylated form of IIA^{Ntr} is present in the *ptsP* and *ptsO* mutants, and is responsible for the negative effect on PHB accumulation. This proposal is supported by the fact that the removal of the IIA^{Ntr} protein in these mutants by inactivation of *ptsN* restored PHB synthesis, and by the negative effect of the *ptsN*-H68A mutation on PHB accumulation. The partial suppression of the PHB defective phenotype in the *ptsO* mutant by *ptsN*, suggests that Npr could play an additional positive role on PHB synthesis. Regulatory roles of Hpr proteins in transcription have been reported: a Hpr protein phosphorylated in a serine residue interacts with CcpA, a transcriptional regulator involved in carbon catabolic repression in Gram-positive bacteria [Warner and Lolkema, 2003].

The effect of the PTS^{Ntr} system on PHB accumulation was determined to be at the *phbB* and *phbR* transcriptional level. The mechanism by which the IIA^{Ntr} protein affects transcription of the *phbR* and *phbB* genes remains to be investigated. The effect of the *pts* mutations on the *phbB* pB1 promoter can be explained by its effect on *phbR* transcription, since this promoter was shown to be inactive in a *phbR* mutant [Peralta-Gil et al., 2002]. Although the mechanism by which the pB2 promoter activity is controlled is not known, this study suggests that pB2 is under PTS^{Ntr} control. Given that no DNA binding motifs are present in the IIA^{Ntr} protein, we propose that other regulatory elements must mediate signal transduction between the IIA^{Ntr} protein and the *phb* promoters.

A model for the control of transcription of *phbBAC* by PTS^{Ntr} is proposed in Figure 7, where Enzyme I^{Ntr} autophosphorylates using phosphoenolpyruvate, Enzyme I^{Ntr} in turn phosphorylates Npr, which transfers the phosphate to the terminal phosphoryl acceptor IIA^{Ntr}. The non-phosphorylated IIA^{Ntr} protein exerts, in an indirect manner, a negative effect on expression of *phbR* and, as a consequence, on *phbBAC* genes. The phosphorylation state of IIA^{Ntr} could work as a metabolic signal of carbon/energy availability.

The involvement of PTS proteins in the regulation of PHB metabolism has also been reported in *Cupriavidus necator* (formerly *Alcaligenes eutrophus*). Mutations in either *ptsI* (*phbI*) or *ptsH* (*phbH*) genes (encoding Enzyme I and Hpr homologs) resulted in a lower PHB accumulation. However, this phenotype seems to be related with a higher rate of PHB degradation in the stationary growth phase [Pries et al., 1991], and not to an effect on the transcriptional control of PHB synthesis. In addition it is not clear whether the PtsI and PtsH are homologs of the PTS^{Ntr} proteins.

Similar to this study, the involvement of PTS^{Ntr} proteins in regulating gene transcription was reported recently in *E. coli*, where the IIA^{Ntr} protein in its de-phosphorylated form is required for activation of the *ilvBN* operon [Lee et al., 2005]. Also, in *P. putida* the phosphorylated IIA^{Ntr}

form mediates carbon source inhibition of the Pu promoter of the TOL plasmid [Cases et al., 1999]. Therefore, both the phosphorylated and non-phosphorylated forms of IIA^{Ntr} can mediate activation or repression of gene expression. In fact, multiple regulatory functions for the IIA^{Ntr} protein were revealed in a proteomic analysis carried out with a *P. putida ptsN* mutant, where the expression of 108 proteins was influenced positively or negatively by the loss of IIA^{Ntr} [Cases et al., 2001]. The mechanism by which the IIA^{Ntr} protein exerts its effect on gene expression remains to be determined. Identifying the intermediaries acting on the PTS^{Ntr} regulated promoters would help to unveil this mechanism.

Materials and methods

Bacterial strains, media, enzyme and microbiological methods

A. vinelandii strains used and constructed in this study are listed in Table 1. *E. coli* DH5 α was used for the isolation and maintenance of plasmids. *A. vinelandii* cells were grown on PY rich medium supplemented with 2% sucrose. The antibiotics and concentrations used in $\mu\text{g/ml}$ were: spectinomycin, 50; kanamycin, 3; tetracycline, 10. PHB content of bacteria was determined by the spectrophotometric method of [Law & Slepecky, 1961] as previously reported [Segura & Espin, 1998].

Nucleic acid procedures

DNA isolation, cloning, sequencing and Southern blotting procedures were carried out as described by Sambrook et al. [1989]. Transformation of *A. vinelandii* was carried out as described by Bali et al. [1992]. SI-mapping experiments were carried out using primers phbBS1F and phbBS1R (Table 2), as previously described [Peralta-Gil et al., 2002].

Real-Time PCR

Total RNA extraction was performed as reported by Barry et al. [1992]. To eliminate genomic DNA, RNA was treated with DNase (DNA-freeTM, Ambion) and its concentration measured by 260/280 nm ratio absorbance. cDNA was synthesized using Revert AidTM H First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Inc.) and a mixture of the specific DNA primers. The sequences of the primers used for cDNA synthesis and for the Real-Time PCR assays, are listed in Table 2. The cDNA obtained was used as template for Real-Time PCR assays.

Real-Time PCR was performed with the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems) using SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Amplification conditions were 10 min at 95°C, and a two steps cycle at 95 °C for 15 s and 60°C for 60 s for a total of 40 cycles. The size of all amplimers was 100-101 bp. The final primer concentration was 250 nM. All Real-Time PCR reactions were performed in triplicate for each gene of each strain, obtaining very similar values (differences of <0.3 SD). The level of the *gyrA* and *rho* mRNAs, were used as internal controls to normalize the results obtained for the *phbB* and *phbR* mRNAs among the tested strains. A non-template control of each reaction was included for each gene. The quantification technique used to analyze data was the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method reported by Livak and Shmittgen [2001]. Reproducibility of the whole procedure was determined by performing cDNA synthesis and Real-Time PCR experiments from two separate RNAs extracted for each strain. Similar results were obtained for the transcription of all measured genes in the repetitions.

Construction of mutant strains used in this study

A 5.4 kb *KpnI* DNA fragment containing the four genes downstream *rpoN* was isolated from cosmid pVL72 [Toukdarian and Kennedy, 1986] and cloned into plasmid pBluescript KS. The resultant plasmid pRN1 (Fig. 1) was digested with *EcoRI* and *HindIII*, blunt ended, and religated

eliminating a 1636 bp fragment to produce plasmid pRN2 (Fig. 1). The Ω -Km cassette from plasmid pBSL99 [Alexeyev et al., 1995] was cloned into the *Cla*I site of pRN2 to produce plasmid pRN4, with the Ω -Km cassette inserted into *ptsN* (Fig. 1). The *ptsO* gene was cloned by PCR using oligonucleotides ptsOFwd and ptsORev (Table 2), and plasmid pRN2 as template. The PCR fragment of 273 bp was cloned into plasmid pMOSBlue (Amersham) to give plasmid pRNO. A Ω -Sp cassette from plasmid pHP45 Ω -Sp [Fellay et al., 1987] was introduced into the *Sma*I site of plasmid pRNO within *ptsO* to produce plasmid pRN6 (Fig. 1). Plasmids pRN4 and pRN6, that are unable to replicate in *A. vinelandii*, were introduced by transformation into strain UW136. Transformants resistant to kanamycin (strains RN4) or spectinomycin (strain RN6) respectively, were isolated. For the construction of *ptsN-ptsP* double mutant (RN7), plasmid pDS20A, carrying a *ptsP::Tc^r* mutation [Segura and Espin, 1998], was transformed into strain RN4 and the transformants were selected on tetracycline. For *ptsO-ptsN* mutant (RN8), plasmid pRN4 was transformed into strain RN6, selecting for transformants on Km. For strain *ptsP-ptsO* (RN9), strain DS988 carrying a *ptsP::Tn5* mutation [Segura and Espin, 1998] was transformed with plasmid pRN6, and the transformants were selected on spectinomycin. Gene replacements by double crossover events in all strains constructed in this study were confirmed by Southern blot analysis (data not shown).

Complementation of ptsO and ptsN mutants

For the complementation experiments, suicide plasmids pDSptsO and pDSptsN, containing the complete coding sequences of *ptsO* and *ptsN* respectively, were used. pDSptsO was constructed by inserting the Ω -Kanamycin cassette from pBSL97 [Alexeyev et al., 1995] into the *Pst*I site of plasmid pRNO to allow for selection of *A. vinelandii* isolates with co-integrates. This plasmid was transformed into strain RN6 and Sp-Km resistant transformants were selected. One transformant, confirmed by Southern blot (data not shown) to have co-integrated pDSptsO

upstream the spectinomycin resistance cassette as expected (Fig. 3B), was selected and named DS6. For plasmid pDSptsN, oligonucleotides ptsNFw and ptsNRev (Table 2) and plasmid pRN1, were used to amplify the *ptsN* gene by PCR. The resultant 488 bp fragment was cloned into the unique *SmaI* site of pBlueScriptKS plasmid producing plasmid pRN3 (Fig. 1). The Ω -spectinomycin cassette from pHP45 Ω -Sp [Fellay et al., 1987] was introduced into the *HindIII* site of pRN3 producing plasmid pDSptsN. This plasmid was transformed into strain RN4 and Sp-Km resistant transformants were selected. One transformant was selected and confirmed by Southern blot (data not shown) to have co-integrated pDSptsN upstream the kanamycin resistance cassette as expected (Fig. 3B). This strain was named DS4.

Construction of a H68A mutation in the phosphorylation site of IIA^{Ntr}

To test the role of the phosphorylation state of IIA^{Ntr} on PHB accumulation, residue histidine 68 of this protein was changed to an alanine by PCR mediated megaprimer mutagenesis of the *ptsN* gene. Two amplification rounds were used: the first one with primer ptsNup1, which introduces a *NdeI* restriction site, and the mutagenic primer ptsN-H/A (Table 2), that contained a substitution of codon 68 (CAT) for GCG; the second with the purified PCR product (200bp) obtained from the first round as megaprimer, together with primer ptsNlow2 (Table 2), which introduces a *XhoI* restriction site. The 486 bp DNA fragment obtained was digested with *NdeI* and *XhoI* and cloned into *NdeI-XhoI* digested plasmid pET24a (Novagen), yielding plasmid pALA8. This plasmid was confirmed to encode the ptsN-H68A mutation by sequencing the complete cloned fragment. As a control, the IIA^{Ntr} phosphorylatable version was constructed using the primers ptsNup1 and ptsNlow2 to amplify a 486 bp PCR product from *A. vinelandii* wild type DNA. The digested fragment was cloned into *NdeI-XhoI* digested pET24a producing plasmid pALA7. *A. vinelandii* wild type strain was transformed with plasmids pALA7 and pALA8, unable to replicate in *A. vinelandii*, and kanamycin resistant recombinants were selected and confirmed by PCR to have

co-integrated these plasmids into the chromosome. The recombination site (before or after codon 68) was confirmed by PCR amplification and sequencing of both the upstream and downstream *ptsN* gene copies resulting from the co-integration, using oligonucleotides complementary to *ptsN* and to pET24a (data not shown).

Acknowledgements

This research was founded in part by PAPIIT grant IN208805. We thank Maricela Olvera for her technical assistance.

References

Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP: Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 1995;160:63-67.

Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C: Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:1711-1718.

Barry T, Geary S, Hannify S, MacGearailt C, Shalloo M, Heery D, Gannon F, Powell R: Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Res* 1992;20:4940.

Bordo D, van Montfort RLM, Pijning T, Kalk KH, Reitzer J, Saier MH Jr, Dijkstra BW: The three-dimensional structure of the nitrogen regulatory protein IIA^{Ntr} from *Escherichia coli*. *J. Mol Biol* 1998;279:245-255.

Cases I, Perez-Martin J, de Lorenzo V: The IIA^{Ntr} (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the σ ₅₄-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J Biol Chem* 1999;274:1032-1037.

Cases I, Lopez JA, Albar JP, de Lorenzo V: Evidence of multiple regulatory function for the PtsN (IIANtr) protein of *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 2001;183: 1032-1037.

Fellay R, Frey J, Krisch H: Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. Gene 1987;52:147-154.

Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli*. J Mol Biol 1983;166:557-580.

Higa F, Edelstein PH: Potential virulence role of the *Legionella pneumoniae ptsP* ortolog. Infect Immun 2001;69:4782-4789.

Jones DHA, Franklin FCH, Thomas CM: Molecular analysis of the operon which encodes the RNA polymerase sigma factor σ_{54} of *Escherichia coli*. Microbiology 1994;140:1035-1043.

Kohler T, Alvarez JF, Jarayama S: Regulation of *rpoN*, *orf102*, and *orf154* genes in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol Lett 1994;115: 177-184.

Law JH, Slepecky RA: Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol.1961;82:33-36.

Lee CR, Koo BM, Cho SH, Kim YJ, Yoon MJ, Peterkofsky A, Seok YJ: Requirement of the dephospho-form of enzyme IIANtr for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. Mol Microbiol 2005;58:334-344.

Livak K, Shmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-($\Delta\Delta C(T)$) method. Methods 2001;25:402-408.

Martínez-Salazar JM, Moreno S, Nájera R, Boucher JC, Espín G, Soberón-Chavez G, Deretic V: Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. J Bacteriol 1996;178:1800-1808.

Merrick MJ, Coppard JR: Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding σ_{24}) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from σ_{24} -dependent promoters. Mol Microbiol 1989;3:1765-1775.

Michiels P, Van Soom T, D'Hooghe I, Dombrecht B, Benhassine T, de Wilde P, Vanderleyden J: The *Rhizobium etli rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN* and *ptsA* mutants. J Bacteriol 1998;180:1729-1740.

Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín-González L, Espín G: 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. J Bacteriol 2002;184: 5672-5677.

Postma PW, Lengeler JW, Jacobson G R: Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. Microbiol Rev 1993;57: 543-594.

Powell BS, Court DL, Inada T, Nakamura Y, Michotey V, Cui X, Reizer A, Saier MH, Pries A, Priefert N, Krüger H, Steinbüchel A: Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(β -hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to the *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1991;173: 5843-5853.

Rabus R, Reizer J, Paulsen IT, Saier MH Jr: Enzyme I^{nt} from *Escherichia coli*: A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, Npr. J Biol Chem 1999;274:26185-26191.

Rediers H, Vanderleyden J, De Mot R: *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? Microbiology 2004;150:1117-1119.

Reizer J: Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. J Biol Chem 1995;279:4822-4839.

Reizer J, Reizer A, Merrick MJ, Plunkett III G, Rose DJ, Saier, M.H Jr: Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: A chimeric gene encoding an enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. Gene 1996;181:103-108.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 Cold Spring Harbor, N Y

Segura D, Espín G: Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol 1998;180:4790-4798.

Segura D, Cruz T, Espín, G: Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. Arch Microbiol 2003;179: 437-443.

Senior PJ, Dawes EA: The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem J 1973;134: 225-238.

Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tomkins RG, Ausubel FM: *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2408-2413.

Toukdarian A, Kennedy C: Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. EMBO J 1986;5:399-407.

Warner JB, Lolkema JS: CcpA-Dependent carbon catabolite repression in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2003;67:475-490.

Table 1. Strains and plasmids used in this work.

<i>Strain or plasmid</i>	<i>Relevant characteristics</i>	<i>Source or reference</i>
A. vinelandii		
UW136	ral <i>algU</i> mutant strain, Nal ^r Rif ^r	Artínez-Salazar et al., 199
DS988	36 with a <i>ptsP</i> ::Tn5 mutation	Segura and Espín, 1998
RN4	36 with a <i>ptsN</i> ::Km ^r mutation	This work
RN6	36 with a <i>ptsO</i> ::Sp ^r mutation	This work
RN7	with a <i>ptsP</i> ::Tc ^r mutation	This work
RN8	with a <i>ptsN</i> ::Km ^r mutation	This work
RN9	38 with a <i>ptsO</i> ::Sp ^r	This work
DS4	with pDSptsN co-integrated	This work
DS6	with pDSptsO co-integrated	This work
UW136::pALA8a	36 with pALA8 co-integrated expressing a non-phorylatable IIA ^{Ntr}	This work
UW136::pALA8b	36 with pALA8 co-integrated expressing a phorylatable IIA ^{Ntr}	This work
UW136::pALA7	36 with pALA7 co-integrated expressing a phorylatable IIA ^{Ntr}	This work
li		
DH5 α	<i>44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i>	Hanahan, 1983
nids		
pVL72	mid clone with the <i>A. vinelandii rpoN-ptsN-ptsO</i>	kdarian and Kennedy, 19
pRN1	escriptKS+, carrying an <i>A. vinelandii</i> 5.4 kb <i>KpnI</i> nent containing <i>rpoN orf107-ptsN-orf284-ptsO</i>	This work
pRN2	1 derivative, carrying a 3.8 kb fragment containin <i>orf284-ptsO</i>	This work
pRN3	escriptKS+ carrying a 488 bp fragment containing	This work
pRN4	2 derivative carrying a <i>ptsN</i> ::Km ^r	This work
pRN6	0 derivative carrying a <i>ptsO</i> ::Sp ^r mutation	This work
pRNO	SBlue carrying a 273 bp fragment containing <i>ptsO</i>	This work
pBSL99	ce of the kanamycin resistance cassette	Alexeyev et al., 1995
pHP45Ω-Sp	ce of the spectinomycin resistance cassette	Fellay et al., 1987
pDS20A	19 carrying a <i>ptsP</i> ::Tc ^r mutation	Segura and Espín, 1998
pBlueScriptKS	mid used for subcloning DNA; unable to replicate <i>vinelandii</i>	Stratagene
pMOSBlue	mid for cloning PCR products	Amersham
pET24a	ing and expression vector; Km ^r	Novagen
pALA7	!4a containing <i>ptsN</i>	This work
pALA8	!4a containing <i>ptsN</i> with a H68A mutation	This work
pDSptsO	0 containing a kanamycin cassette	This work
pDSptsN	3 containing a spectinomycin cassette	This work

Table 2. Primers used in this study

Name	Use	Sequence (5' to 3')
w	-time PCR of <i>rho</i>	AATGGCCGAACAGATGG
ev	A synthesis, real-time PCR of <i>rho</i>	TTCCTCGCCGCTTTTCG
FW	-time PCR of <i>gyrA</i>	GCAAGGGCAAGGTCTA
Rev	A synthesis, real-time PCR of <i>gyrA</i>	TCCAGCGGCAACAGGT
3FW	-time PCR of <i>phbB</i>	GCAATCCAAACGCAAAG
3Rev	A synthesis, real-time PCR of <i>phbB</i>	CTCTCCCAATCGGTAC
4FW	-time PCR of <i>phbR</i>	CATGCGTTTGGTTTCTTG
4Rev	A synthesis, real-time PCR of <i>phbR</i>	GCCCTAAGCGTCTCCTC
Fwd	gene amplification for pRNO plasmid truction	GATCCATGCCCGCCTGCGAAGT
Rev	gene amplification for pRNO plasmid truction	GATCCAGCGTCATTCGTCTTCGTCG
Fw	gene amplification for pRN3 plasmid truction	.ATTCATGATCAGACTCGAAGACATTC
Rev	gene amplification for pRN3 plasmid truction	.TCCGGTGGAAACTTTACAGGCTCT
up1	aprimers mutagenesis; construction of pALA7TTCATATGATCAGACTCGAAGACAT pALA8 plasmids	
low2	aprimers mutagenesis; construction of pALA7AACTCGAGCAGGCTCTTCTGTGC pALA8 plasmids	
-H/A	agenic primer for megaprimer mutagenesis; pCAGGCGGCA <u>CGC</u> CAGGAATGGCCATG truction of pALA8 plasmid	
3S1F	3 S1 mapping	GCCCATAGGCCTTGAGC
3S1R	3 S1 mapping	TGCTGTCCCGATTCCGC

^a The codon changed (complementary strand) is underlined.

Figures

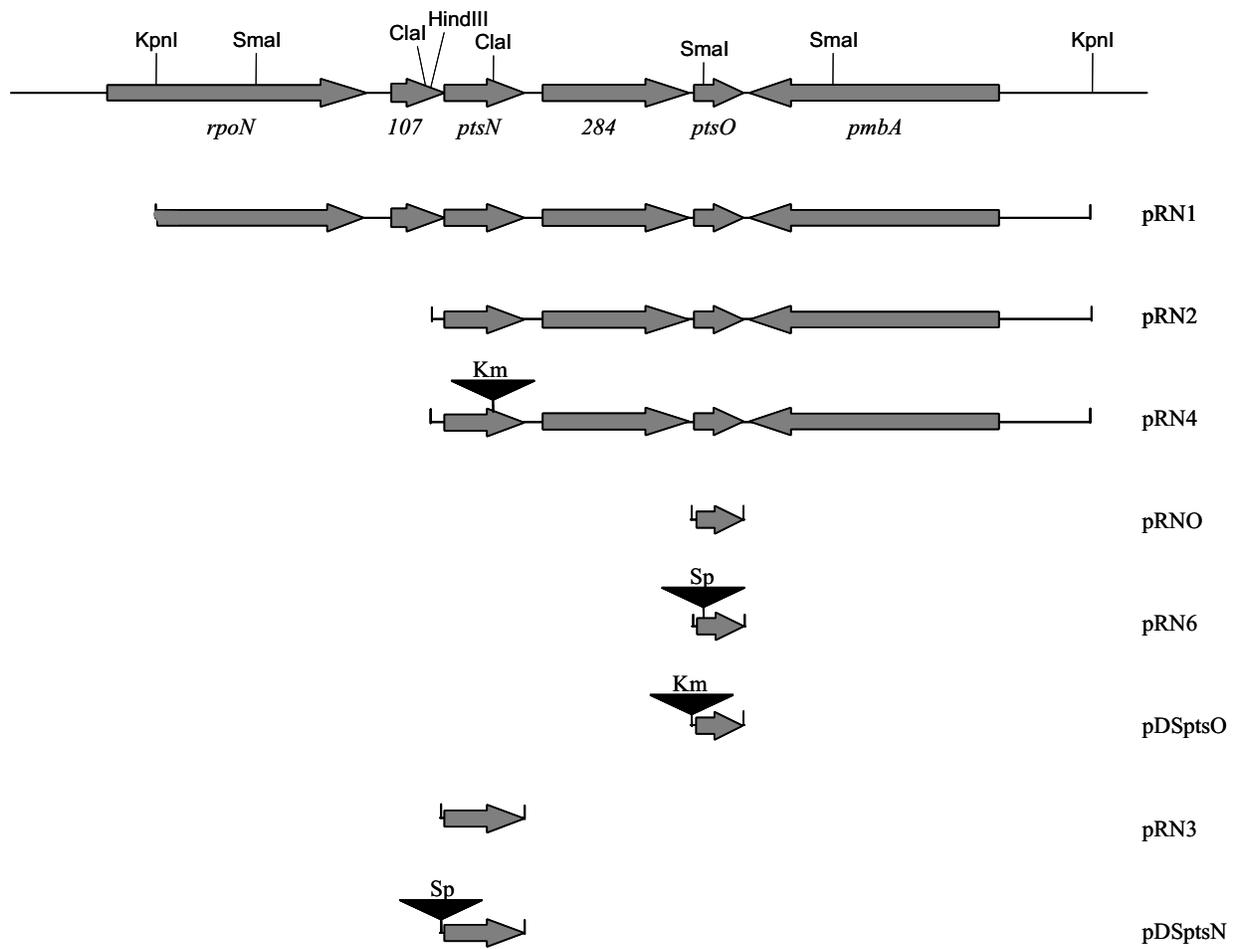


Figure 1. Physical map of the *A. vinelandii* *rpoN* chromosomal region and plasmids constructed in this study. The arrows represent genes. Relevant restriction sites are shown.

Triangles represent insertion of antibiotic resistant cassettes.

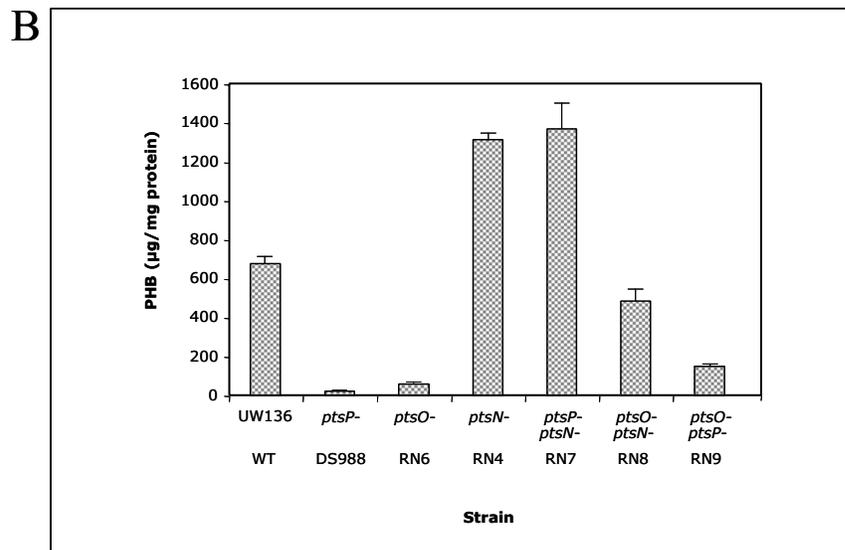
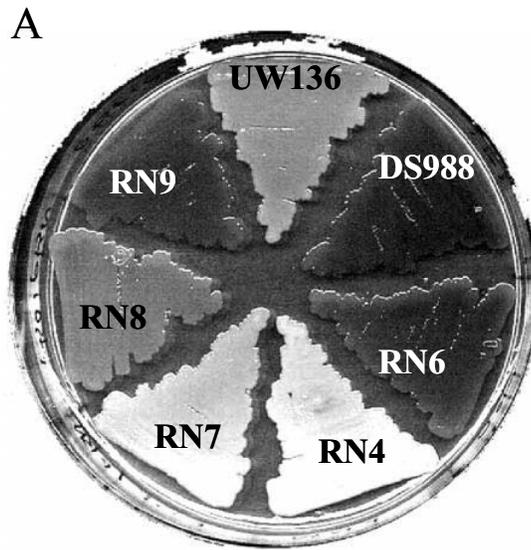


Figure 2. Opacity phenotype (A), and PHB accumulation quantification (B), of UW136; DS988 (*ptsP*); RN6 (*ptsO*); RN4 (*ptsN*); RN7 (*ptsP*-*ptsN*); RN8 (*ptsO*-*ptsN*); RN9 (*ptsO*-*ptsP*) strains, at 120 h of growth on PYS medium.

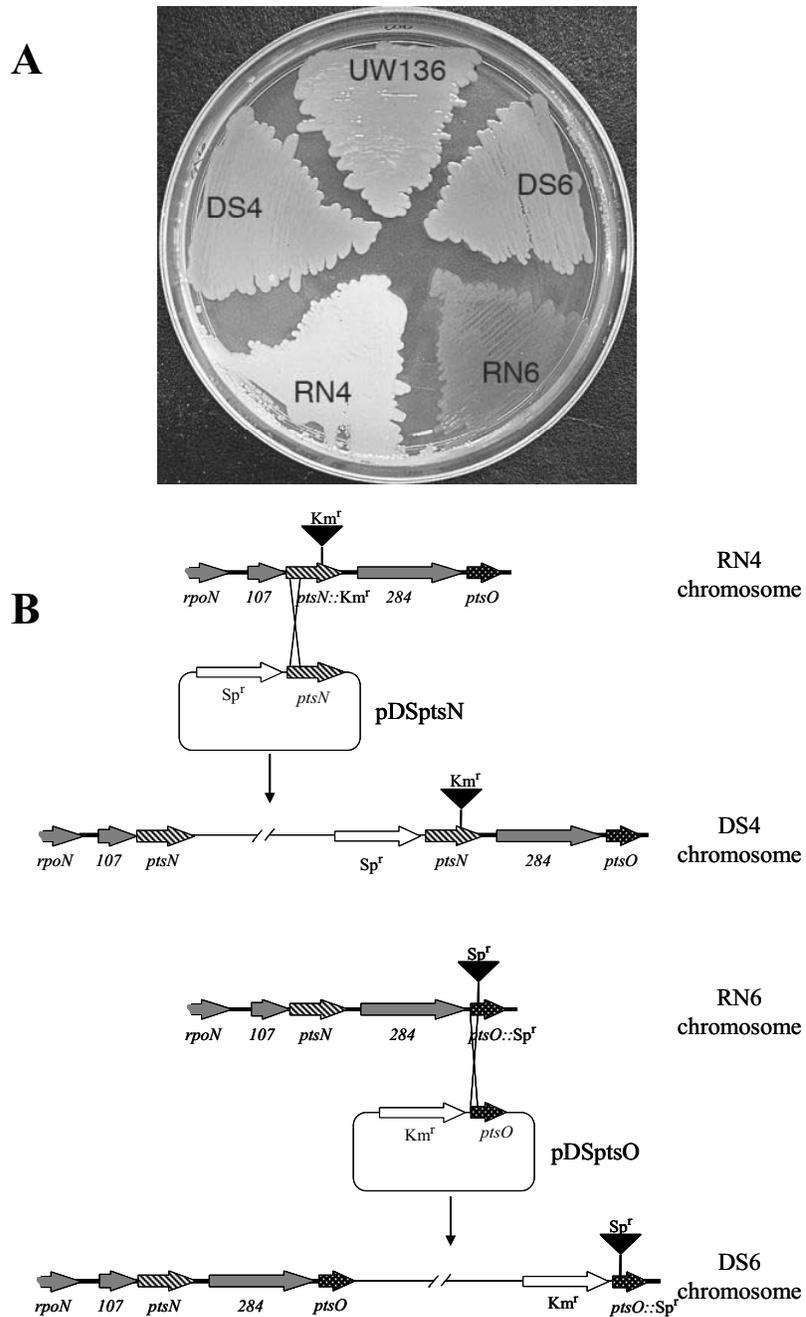


Figure 3. Complementation of RN4 and RN6 mutant strains by co-integration of plasmids pDSptsN and pDSptsO, carrying *ptsN* and *ptsO* genes respectively. (A), Opacity phenotype (PHB accumulation) of UW136, RN4 and RN6 and the corresponding complemented strains DS4 and DS6. (B), Schematic representation of the integration of plasmids pDSptsN and pDSptsO into the chromosome for complementation of strains RN4 and RN6 respectively.

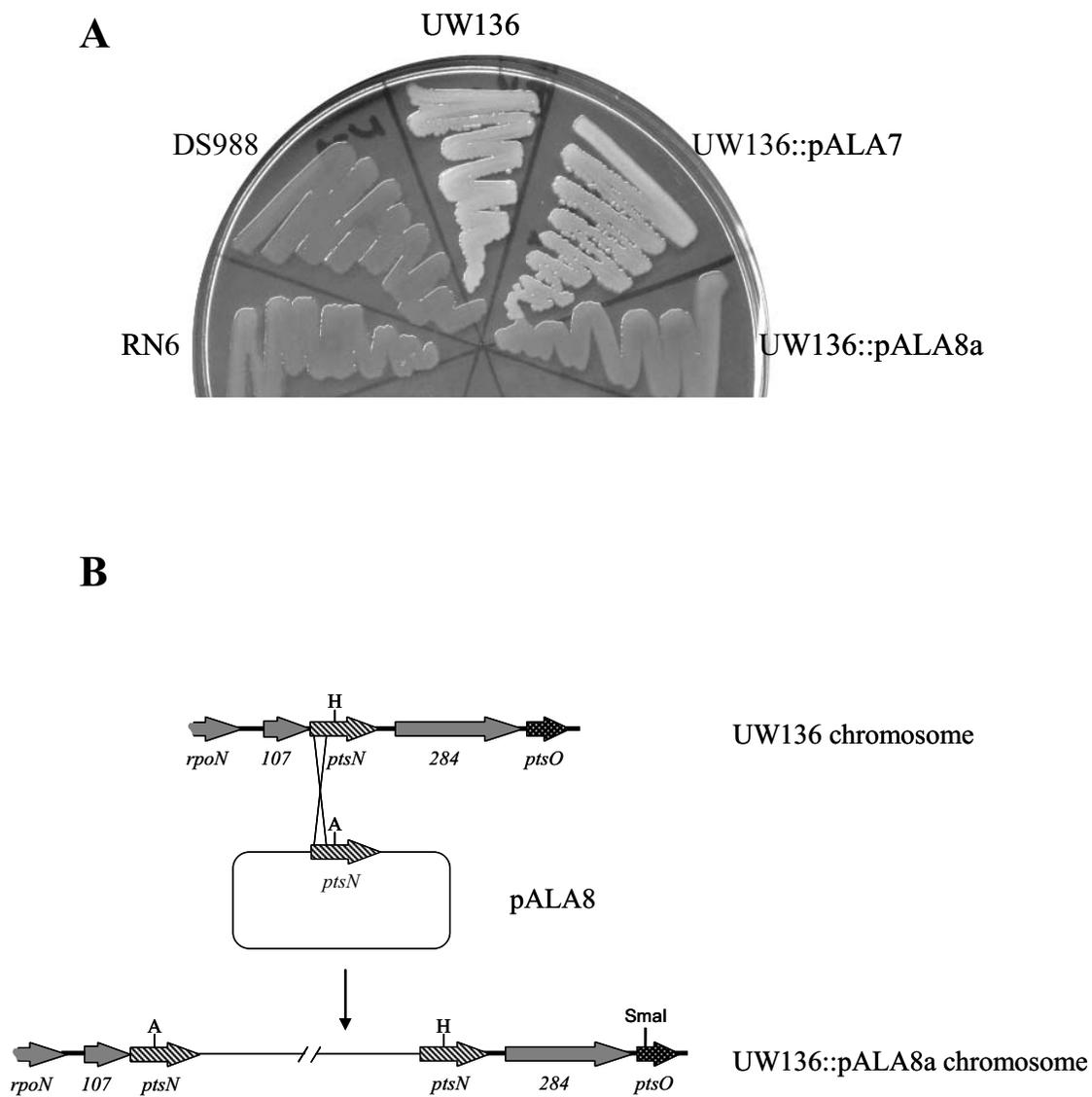


Figure 4. Effect of a H68A mutation in the phosphorylation site of IIA^{Ntr} on PHB accumulation. (A), Opacity phenotype (PHB accumulation) of UW136 wild type strain and its derivatives encoding a non-phosphorylatable (UW136::pALA8a) and a phosphorylatable (UW136::pALA7) IIA^{Ntr} proteins, obtained by co-integration of plasmids pALA8 and pALA7 respectively. RN6 (*ptsO*) and DS988 (*ptsP*) mutant strains are included for comparison. (B), Schematic representation of the integration of plasmid pALA8 into the chromosome of strain UW136 and

the resulting genotype.

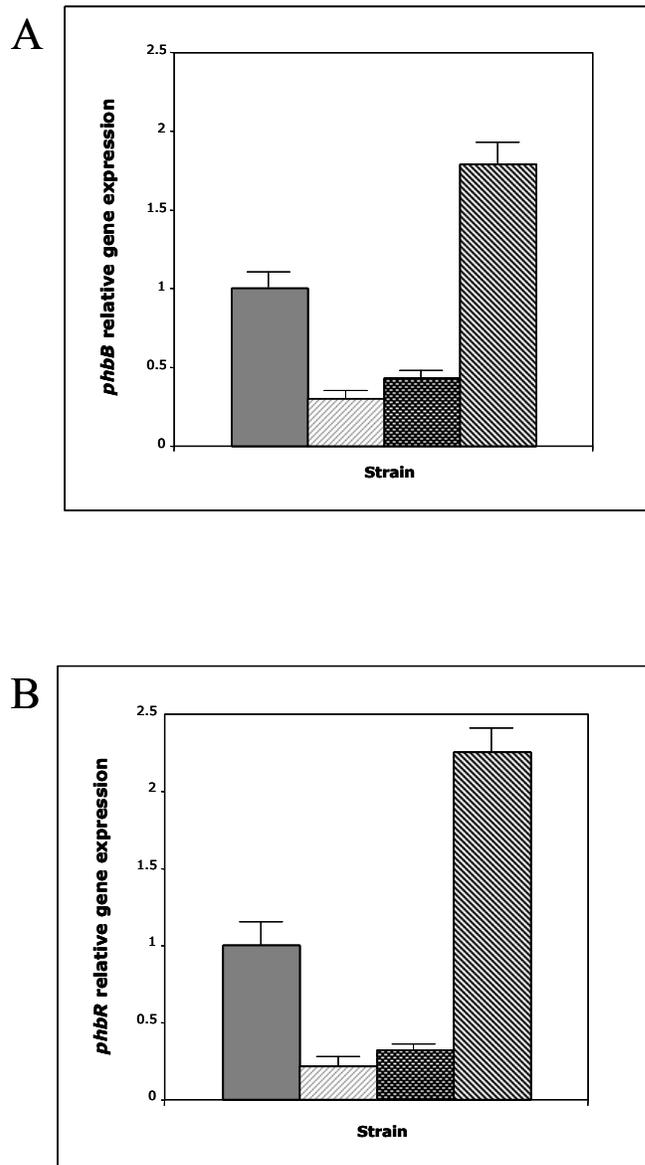


Figure 5. Real-time RT-PCR analysis of *phbB* (A), and *phbR* (B) gene expression by PTS^{Ntr} mutants. The level of the *phbB* and *phbR* transcripts was normalized according to the level of the *gyrA* mRNA, and the data are presented as fold changes of mRNA levels of DS988 (*ptsP*,); RN6 (*ptsO*,); and RN4 (*ptsN*,) mutant strains relative to those of the wild type (). These data represent the mean of triplicates, and the error bars represent the standard deviations.

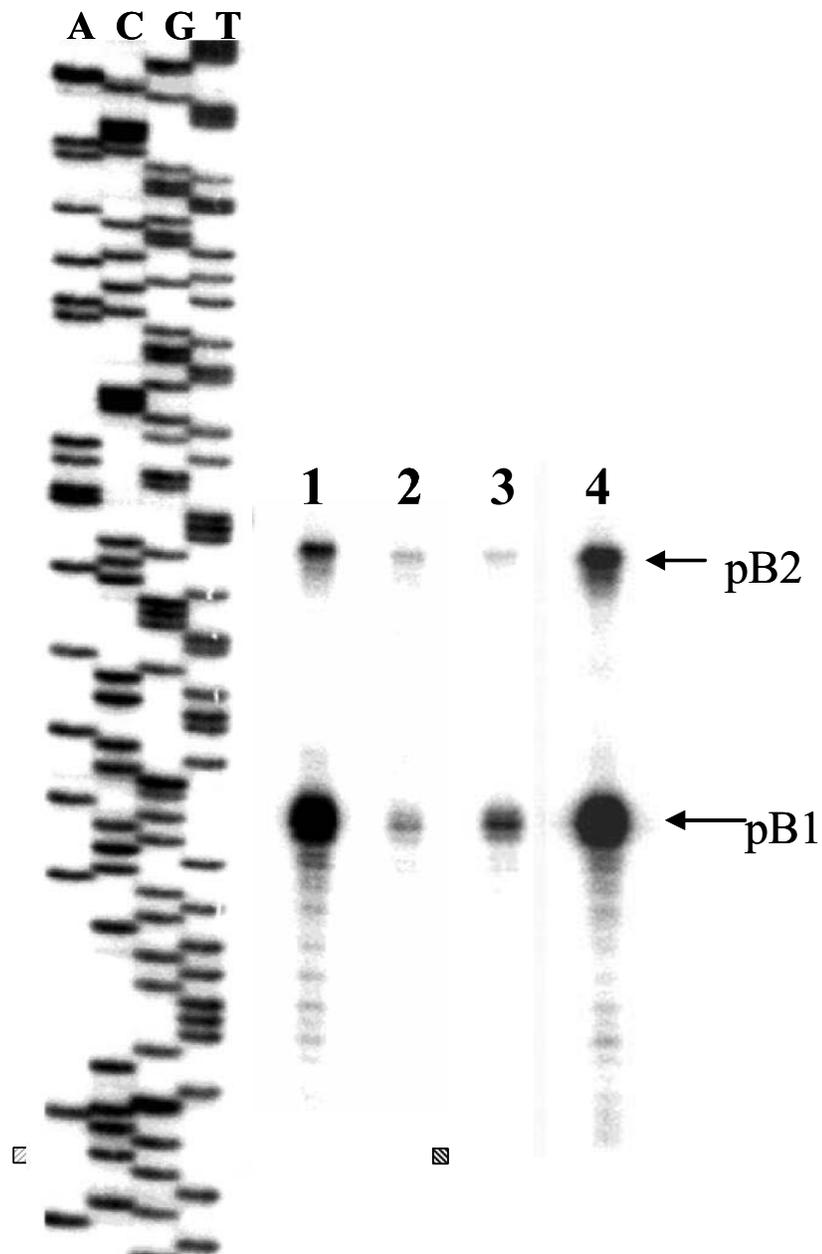


Figure 6. S1-mapping of the *phbB* promoters pB1 and pB2 in UW136 (lane 1) and derivatives carrying the *pts* mutations: *ptsP* (lane 2), *ptsO* (lane 3), and *ptsN* (lane 4). 50 μ g of RNA isolated from cells after 48 h growth on PY sucrose plates were hybridized to the *phbB* probe as previously reported [Peralta-Gil et al., 2002].

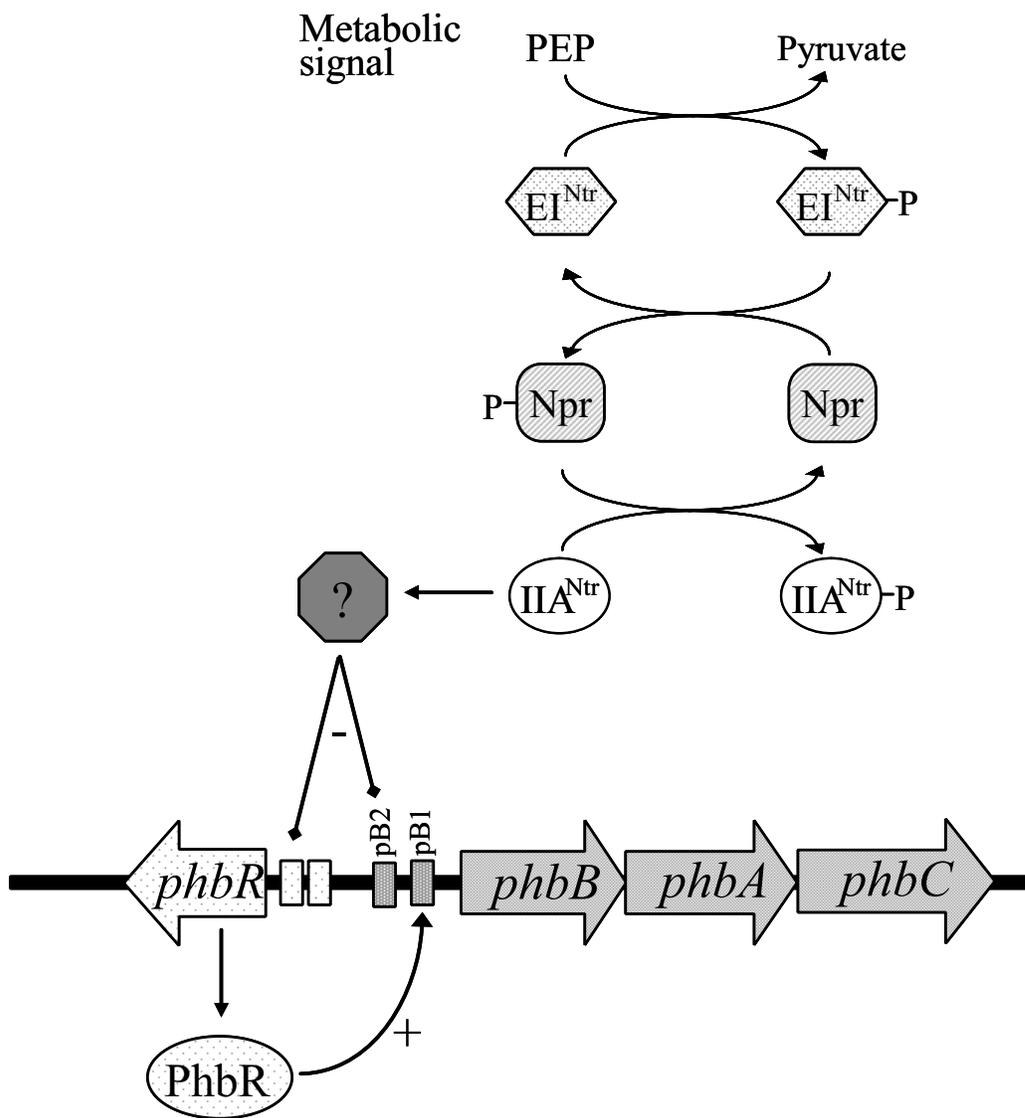


Figure 7. Proposed model for the control of the *phbBAC* biosynthetic genes by the PTS^{Ntr} proteins, in which Enzyme I^{Ntr}, Npr and IIA^{Ntr} form a phosphoryl transfer chain, where IIA^{Ntr} is the terminal phosphoryl acceptor and the non-phosphorylated IIA^{Ntr} protein has a negative effect on the activity of the *phbR* and *phbBAC* promoters.

VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE II (resultados de clonación).

VII.- Clonación del gen *rpoN* en el vector pM100.

Debido a que se había reportado en diversas bacterias que los genes que codifican para las proteínas σ^{54} y σ^{32} y *ptsN* y *ptsO* respectivamente se encuentran formando un operón junto con *rpoN* decidimos buscar la secuencia en la región río abajo de este gen en *A. vinelandii*. Utilizando como sonda un fragmento de *EcoRI*-*ClaI* de 0.5 kb del plásmido pM100 reportado anteriormente. En la figura 10 se puede ver la región correspondiente al gen *rpoN*. En experimentos tipo Southern identificamos un fragmento de 0.5 kb *EcoRI*-*ClaI* de 0.5 kb y un fragmento *KpnI*-*EcoRI* de 0.5 kb del cósmido pM100 el cual incluye el fragmento *EcoRI*-*ClaI* de 0.5 kb de *W. coli* y *W. coli*. El fragmento de 0.5 kb fue clonado en el plásmido pB19 y posteriormente secuenciado (figura 11).

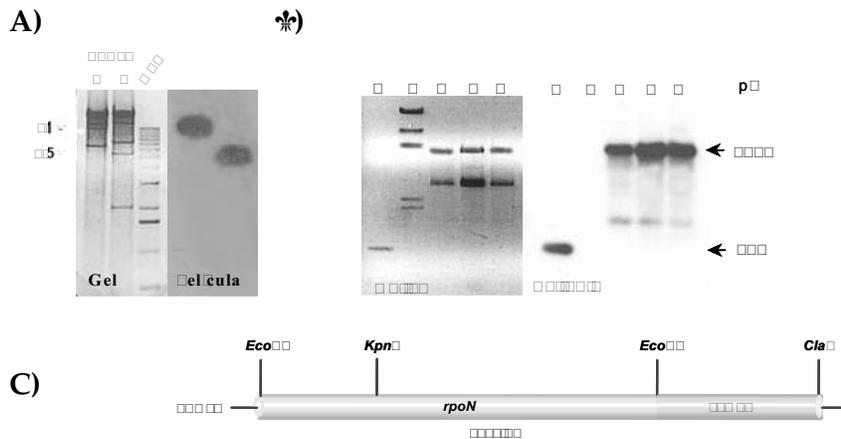


Figura 11. Clonación del gen *rpoN*. A) El ADN de *A. vinelandii* digerido con *EcoRI* y *KpnI* y probedo con el fragmento *EcoRI*-*ClaI* de 0.5 kb del plásmido pM100. B) El ADN del cósmido pM100 digerido con *EcoRI* y *KpnI* y probedo con el fragmento *EcoRI*-*ClaI* de 0.5 kb del plásmido pM100. C) Mapa del gen *rpoN* con los sitios de clonación *EcoRI* y *KpnI*.

La secuencia completa del fragmento *KpnI* de *A. vinelandii* es de 0.5 kb. Se encontró que en el extremo del gen *rpoN* hay un fragmento de lectura abierta de 0.5 aminoácidos que previamente se había reportado (Merric *et al.*) hacia el extremo 5' se encuentra el σ^{54} el cual presenta identidad a la proteína σ^{54} . La proteína deducida tiene un peso molecular de 0.5 kDa y un punto isoeléctrico pI de 0.5. Río abajo de *ptsN* se encuentra el σ^{32} el cual está separado por una región intergenética de 0.5 pb. Por último se encontró el σ^{32} que presenta identidad con la proteína *Npr* de otros organismos la secuencia de aminoácidos deducida sugiere que esta proteína tiene un peso molecular aproximado de 0.5 kDa y un pI de 0.5. Cabe destacar que en la región río abajo del σ^{54} se encuentra un σ^{54} que se orienta en sentido convergente y presenta un 50% de similitud y un 20% de identidad al gen *pmbA*. El gen *pmbA* ha sido involucrado en la maduración y secreción del antibiótico

micromicina B^oasí como un regulador de la segregación del cromosoma y la división celular en *E. coli* **igura 8** **odrigue** **ain** **et al** **Murayama** **et al**

GAATTCGACATGAAACGCTCCACAGAATGGGATAGACCAGTCAAATTCGGTTATAATCAGGCATAGAATTTGCTTTAAGAGGGCCGATC 90

GTCGCCTCGTAGTGATTGACCGGAATGCTTCGGCAAATATGGTCTTCTCAATAATGAAACCATCGTAGTCTTAAAGATGGGGCAGCA 180

GCTGACGATGACCCCGCAGCTGCAACAAGCCATCCGCTCGTTCACCTGTCGACCCCTGGATCTGCAGCAGGAAATCCAGGAGCCCTCGA 270

L T M T P Q L Q Q A I R L L L Q L S T L D L Q Q E I Q E A L D

CTCCAATCCCATGTGGAACGTCAGGAGGACGCCGAGGACTACGACAGCCCGGATATGCTGGGGAGCATGGAGACCAGTGCAGCGCTCGA 360

S N P M L E R Q E D A E D Y D S P D M L G E H G D Q S T L D

CACCACGCCGGCTCTTACCAGGAAGGCTACGAGAGCGGGGGCGCCAGGAGGATGGCCGTACCCCTCGAAGAGGGGACTGGCACGAGCG 450

T T P G S Y Q E G Y E S G A A S E D G G T L E E G D W H E R

GATTCCCCAGCGAGCTGCGGTTGGATACCCTGCGAAAGACATCCAGACCAGTGCAGCAACCTGCCCAGCACCAGTGAAGACGAGT 540

I P S E L P V D T A W E D I Y Q T S A S N L P S T D E D E W

GGATTCACCACCCGCACTCCAGGGCAGAGCCTGCAGAGCCATCTGCTTGGCAGTTGAACCTGACCCTGATGCGGATACCCGATCG 630

D F T T R T S T G E S L Q S H L L W Q L N L T P M S D T D R

CCTGATCGCCGTCCTGATCGACAGCATCAACAGCAGCGGATCTGGAGGCGCGCCCTGGAGAAATCCTCGCTCTCTGGACCCGGA 720

L I A V T L I D S I N S D G Y L E A A L E E I L A S L D P E

ACTGGVATCGAATCGAGAGTGGAAATGGTGTGGCCGCAATCGAACCAGCCGGATCGTGGCCGCACTCAGCGA 810

L G V E L D E V M V L R R I Q Q F E P A G I A A R D L S E

ATCGCTGTGTGCAACTGCGCCAGTACCGCCGATACCCCGTGGTGGAAAGAGGGCAAAACGACTGGCCAAAGGACTATCTCGACTGT 900

S L L Q L R Q L P P D T P W L E E A K R L A K D Y L D L L

GGTAACCCGCACTTCAACAGTTGATGCGACGCATGAAACTCAAGGAAGAAAGATTCGCTCCGGTGAATCGAGTGTATCCAGCCCTCAA 990

G N R D F T Q L M R R R M K L K E E L R P V I E L I Q S L N

CCCTCGTCCCGGGCCAGATCGAGAGCAGCGAGCCGAATATGCTGCTGACGTCATCGTGGCAAGCAACACGACCGCTGGCTGGT 1080

P R P G A Q I E S S E Y V P D V I V R K H N D R L V

GGAGTCATCAGGAGCGGTGCCGCGCTGCGCATCAACCCGCAATACCGTGGCTTATCAGACGCGCCGACGCGCAGCCGACAAAC 1170

E L N Q E A V P R L R I N P H Y A G F I R R A D A S A D N T

CTTCATCGCCAACTGCAAGAGGCGCGCTGGTTCATCAAGAGCCGCAAGATCGCAACGAAACCCCTGATGAAAGTTTCGACCCAAAT 1260

F M R N Q L Q E A R W F I K S L Q S R N E T L M K V S T Q I

CGTCGAGCACCAGCGGGCTTCTCGACTACGGGAAGAGCCATGAAACCGTGGTGTGCAGCATATCGCCGAGGCTGTGGCATGCA 1350

V E H Q R G F L D Y G E E A M K P L V L H D I A E A V G M H

CGAATCGCACTCCAGGGTCAACCCAGAAATACATGCACACTCCACGGGTATTTACGAGCTGAAGTACTTCTTTCCAGTCAAGT 1440

E S T I S R V T T Q K Y M H T P R G I Y E L K Y F F S S H V

CAGTACCCGCAAGCGGTGAGTGTCTCGTCCAGCGCCATCAAGAAATGATTGCGCGGAAATCCGAAAAGCCAT 1530

S T A E G G E C S S T A I R A I I K K L I A A E N P K K P L

GAGCGACGCAAGATCGTGGTTACTGGAAGAACCAAGGCATACAGGTCGCTGCGCGTACAGTTGCCAAATACCGGGATCGCTAGTAT 1620

S D S K I A G L L E E Q G I Q V A R R T G A K Y R E S L S I

TGCGCTTCCAGCGAACGAAAGCGGTTATGTAAGCGGATCGGGTGTGCCATTCGCTGGCAGCAACCGCCCGCCCTCACTCGAAG 1710

A P S E R K R L M

CAGCGTATACCGGTAGCAGCGCTCAGCTGCATCAATAGAACAAGGAGAGCGGTATGCAAGTCAACATCAGTGGACATCAACTGG 1800

M Q V N I S G H Q L D

ATGTGACCCGCGCTCGCGACTATGTCGAGGAGAAGATCAGCGGCTCGAACGCCATTTCCAGCGCATCACCAGTGTCCAGTGATCA 1890

V T D A L R D Y V E K I S R L E R H F D R I T S V Q I M

TGACCGTCCGAGAAGCTCAAGCAAAGATCGAAGCGACCTCGCATGCTCCGGGGCCGAAAGTGGTGCCTCAATGCCGAGCAGGAAAGCAT 1980

T V E K L K Q K I E A T L H V S G A E V V A N A E H D M Y

ATCGCGCATCGATCTGCTGGCGACAAGCTTGTGCAACTGATCAAGCACAAAGGAAAGCAGATCGAACCGCAGCAGCGCCAGCC 2070

A A I D L A D K L D R Q L I K H K E K Q I E R Q G A T A

CCCGCTCGACTCTCCTGTCCCATGATCAGACTCGAAGACATTTGACCCCGCGCGTCTCCTGGTGAACGTGCCGGGAGGAAAGCA 2160

R

M I R L E D I L T P G R S L V N V P G G S K K R

GCCTCTCGAATACATAGCCCAATCTGGTGCAGCGAAATGCCGATCTGAAATCAGCAGACGATTTTCGAGAACCTTGCCCGTGAAA 2250

A L E Y I A N L V A R E M P D L N Q Q T I F E N L I A R E K

AACTGGGCTCGACCGCTTCCGGTAAACGGCATTCTCTCATTTCCGCGCTCGCCGCTGTCTGCGCCGATCAGTCTCTCTCGCGG 2340

L G S T G F G N G I A I P H C R L P G C P A P I S V L L R L

TGGATCGCCGATCGACTGCCATCGATGGCGCTCCGCTGACCTTCTGTTCTGCTGCTGGTCCGGAAGCCGCGCACCGGAGC 2430

D A P I D F D A I D G A P V D L L F V L L V P E A A T D E H

ATTTGCAATTTGCTTCCAGATTGCCAGCATGCTCGATCGTAGCGAGTGGCGGAGCGCTGCGCCAGTCCGAGCAGCGAGCCCTTT 2520

L Q L L R Q I A S M L D R S E V R E R L R Q V E S E A L Y

ACCAGTGGTCCGCGACGACAGAAAGCCCTGTAAGATTTCACCGGAATCGCGAGGTTCTGCTCGCCGTAACAGGCAAAATGGCAACCC 2610

Q V V A D A Q K S L

AGCTTTCGCGCATTCATGCTGACGACGAAAAGCTCTCATCTGCTCGTATCATCGTCAAGTGGCGGCTTGGCTCCGGTAAAAGCACCG 2700

M L V I I V S G R S G S G K S T A

CCTCAACGTGCTGGAAGACAACGGCTTCTTCTGCAACCACTGCGCGCGTCTGCTTCCCGAGCTGGCCGAGCGGGCGCTGTGCA 2790

L N V L E D N G F F C I D N L P A V L L P E L A E R A L L H

TACCGAATCGTFCGAGCCACAGGTCGCGGATCCATCGACGCAACCTGCCCAGCAGTTGAAACGCTTCCCGGAATCGTTCGCGCA 2880

T E L L E P Q V A V S I D A R N L P S Q L K R F P E L A E

AGTGGCACCCTTATCTCTGCGACTGTCTACCTGGAATGCGGACGACAAACCTGCTCAAGGCTTCTCGGAACCCGCGGGC 2970

V R T R Y I L C D L L Y L D A D D K T L L K R F S E T R R R

CCACCGCTGACCAATGAGATCGCTCGCTGGCCGAGCGATCCGCGACGAGGCGGTTGCTACACCGATCAAGGATCGGCCGATCT 3060

H P L T N E N R S L A E A I R D E G R L L L T P I K D L A D L

GAAGATCGACACGCCATCTCAATCTTTACCAGTGGCGGACCGTCAAGTGGCTGCTGTAACAGCCGGAACCGGGAACCGGCTT 3150

K I D T H L N L Y Q L R D L K L R L L N K P E P G T A F

CTGATCGAATCCTTCGGTTTCAAGAAGGAAATGCCGGTGGATCGGATCTGGTATTCGATGTGCGCTGTGCCCCAACCCCTACTGGAA 3240

L I E S F G F K K G M P V D A D L V F D V R C L P N P Y W K

ACCGGATCTGCGCGACTTTCGGCTGACCAACCGGTCGCGGACTACCTCGCCGTCAGCCGAGCTCGAAGAGATGTATCAGGACAT 3330

P D L R D F S G L D Q P V A D Y L A V Q P D V E E M Y Q D I

CCTGACCTATTTGCAGAAATGGCTGCCCGCTTCCCGCCGCAACCGGCTTATGTCACCATCGCGATCGGATGACCCGCGGCCACCA 3420

L T Y L Q K W L P R F A A S N R A Y V T I A I G C T G G H H

CCGTTCGGTCTACCTGCGGATCGGCTCGGCAAGCTTGAAGCAGTCACTCAAGAACGTTCCAGGTTCCGCCACCGGCACTTTGCGA 3510

R S V Y L A D R L G Q A L K Q S L K N V Q V R H R D L C

CTGAAGTGGATAACGCGATGCGCCGCTGCGAAGTCAACATCAACAAGCTCGGGCTGTCATGCCCGGCGAGCCGCAAGTCTGCTCG 3600

M P A C E V T I I N K L G L H A R A A A K F V G

CATCGCCGACGCTATGCTCGCGGTCAGCATCGGCGCGCTCCGAGAACTGGTTCGATGGCAAGAGCATCATGGCGTCTGATGCT 3690

I A G G R Y A C A V R I G R A P E N L V D G K S I M A V M M L

GGCTCGCCGAAGAACGGTCACTCAGTACGGAAGCGGACGAGCAGGAGGCGCTGGAGGCTTGGTCAACTGATCAACAA 3780

A A G K G T V I H L H T E G E Q D R E A L E A L V Q Q I A N N

TCGCTTCGACGAAAGCAATGACCGCTGCCCACTACCGCGGGAGCCCGACGCTAGCCATTCGCTGCGGCCACCCCGCTCAGCTTC 3870

R F D E D E

rpoN. E**clul**lo*OR**rpoN*OR*ptsN**d OR****ptsO. S*

rcul lo**co**c**c**ro b lo**co**l**t**c**

El análisis de la organización del locus *rpoN* de *A. vinelandii* reveló que existe una conservación en la organización estructural respecto a las bacterias del grupo de las γ -proteobacterias tales como *E. coli*, *P. putida* y *P. aeruginosa* entre otras (figura 1000) (Eiserich et al. 1999) (Jin et al. 2000). Esta organización genética no siempre es igual en algunas bacterias del mismo grupo de las γ -proteobacterias como: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* y del grupo de las δ -proteobacterias como lo es *Geobacter metallireducens* que tienen duplicado a *ptsN* y además de los ya mencionados se encuentran otros dos más uno con identidad a otro llamado por análisis de secuencia y otro con identidad a *ptsI* que codifica para σ^{54} . En las α -proteobacterias tales como *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* entre otras la *ptsN* no está formando parte del mismo operón con *rpoN* además de tener un que presenta identidad a *ptsP*, *ptsN* se encuentra agrupado junto con un parecido a *hprK* (posiblemente codifica para una quinasa) y con otro que tiene identidad a otro pero forma un nuevo grupo por eso se le llamó (figura 1000) (Arner et al. 2000).

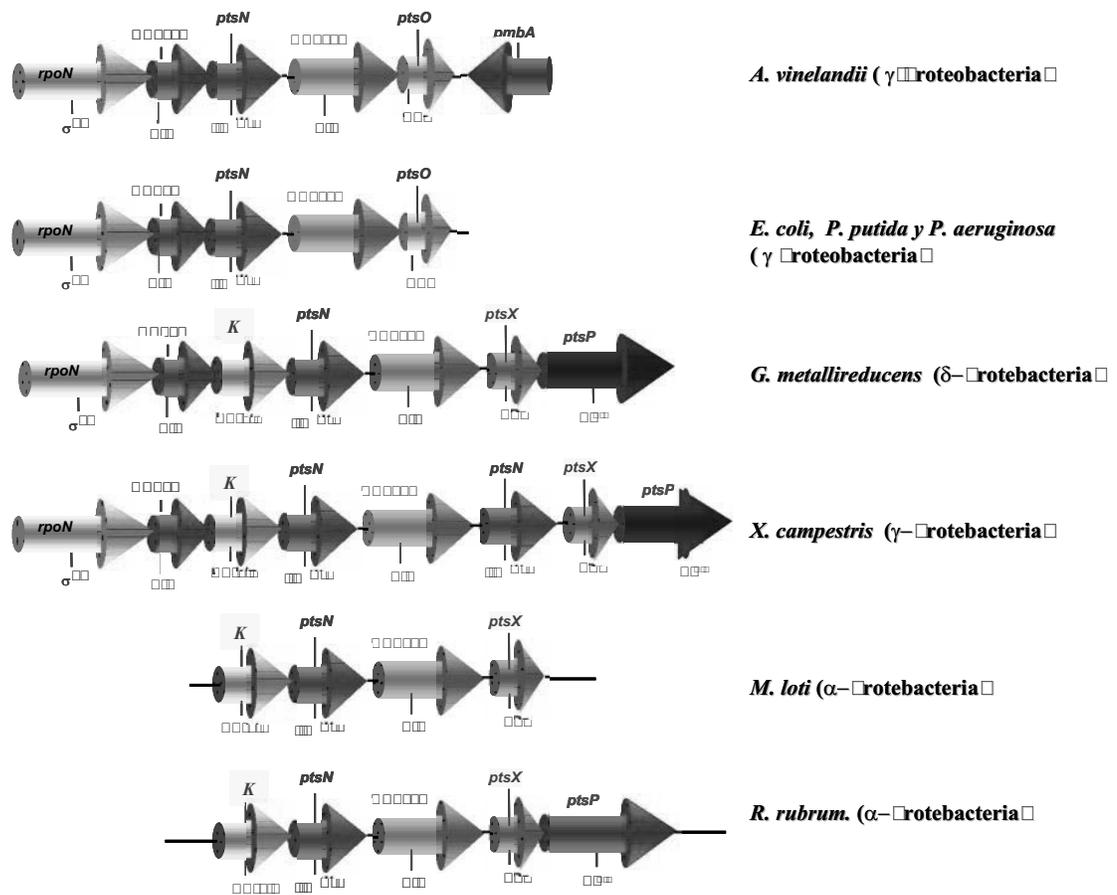
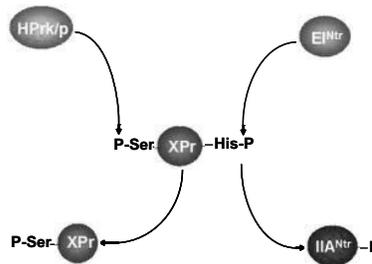


Figura 1000. Organización genética del locus *rpoN* en bacterias. El locus *rpoN* en bacterias γ -proteobacterias incluye a *rpoN*, σ^{54} , *ptsN*, *ptsO* y *hprA*. En bacterias δ -proteobacterias se encuentran *rpoN*, σ^{54} , *K*, *ptsN*, *ptsX* y *ptsP*. En bacterias α -proteobacterias se encuentran *rpoN*, σ^{54} , *K*, *ptsN*, *ptsX* y *ptsP*.

Debido al papel regulatorio que desempeña la quinasa y en virtud de la organización genética se ha sugerido que en las proteobacterias podría tener un papel

en la regulación de la enzima XPr^{Ntr} figura *Arner et al.* debe mencionarse que en base a la organización genética y a que no se ha encontrado en *A. vinelandii* una secuencia con identidad a XPr^{Ntr} pensamos que este mecanismo de regulación no existe en *A. vinelandii* ni tampoco en otras bacterias tales como *Pseudomonas* y *E. coli* donde no se ha encontrado dicha secuencia *Arner et al.*

Se ha encontrado que la fructosa es el aceptor más ampliamente utilizada en diversos géneros bacterianos y el sistema PTS^{Ntr} es el que presenta una mayor distribución por lo que se piensa que el PTS^{Ntr} es el más antiguo desde el punto de vista evolutivo. El sistema XPr^{Ntr} ocuparía un segundo lugar en cuanto a su distribución en diferentes géneros bacterianos respecto a otros sistemas PTS . Por su identidad en las secuencias de aminoácidos por el plegamiento de la estructura secundaria y tridimensional de las proteínas esta forma parte de la familia Man^{Ntr} . Mientras las Man^{Ntr} participan en el transporte específico de azúcares las proteínas XPr^{Ntr} se especializó en la señalización del estatus carbono-nitrógeno en la célula. El hecho de que *Avi* se parezca más a la Man^{Ntr} de *Pseudomonas* que a las XPr^{Ntr} de otras bacterias sugiere que durante la evolución esto antes de la separación de estos géneros hubo una duplicación y especialización de las secuencias correspondientes a XPr^{Ntr} . Para el caso de *A. vinelandii*, donde no se ha encontrado una XPr^{Ntr} la secuencia pudo ser perdida después de haberse separado evolutivamente del género *Pseudomonas*.



Murphy - Posición de XPr^{Ntr} en α -Proteobacterias. La proteína XPr^{Ntr} (XPr^{Ntr}) es un cofactor estructural de la enzima C^{Ntr} del sistema PTS^{Ntr} . Se encuentra en *A. vinelandii*, *Pseudomonas* y *E. coli*. Para más información véase el capítulo 10 de *Proteobacteria* de *Arner et al.* (*Arner et al.*).

VII.- Análisis de los datos de secuencia de aminoácidos de las proteínas de los sistemas PTS^{Ntr} y XPr^{Ntr} de *A. vinelandii*

En general los dendrogramas de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de los sistemas PTS^{Ntr} y XPr^{Ntr} de *A. vinelandii* indican una relación más estrecha a las proteínas correspondientes al género *Pseudomonas* respecto a las demás secuencias reportadas en la figura 10 y 11.

VII. Aminoácidos conservados en la proteína IIA^{Ntr} de *A. vinelandii*.

Las secuencias correspondientes a las proteínas IIA^{Ntr} reportadas en el banco de datos GenBank presentan una identidad arriba del 60% (Litschul *et al.*). En particular la secuencia de IIA^{Ntr} de *A. vinelandii* es más parecida a la secuencia de IIA^{Ntr} de *P. auroginosa* con un 80% de identidad y un 85% de similitud respecto a IIA^{Ntr} de *P. putida* que presenta un 70% de identidad y un 75% de similitud (Eier *et al.*, Gases *et al.*, Jin *et al.*). O obstante que esta proteína presenta una moderada identidad y similitud con las secuencias de *E. coli* y *K. pneumoniae* (60% y 65% respectivamente) se encuentra conservado el residuo 105 el cual se ha sugerido que es el sitio probable de fosforilación (Bordo *et al.*) con excepción en *Hemophilus influenzae* en el cual este residuo se encuentra sustituido por una asparagina (Leischman *et al.*).

A)

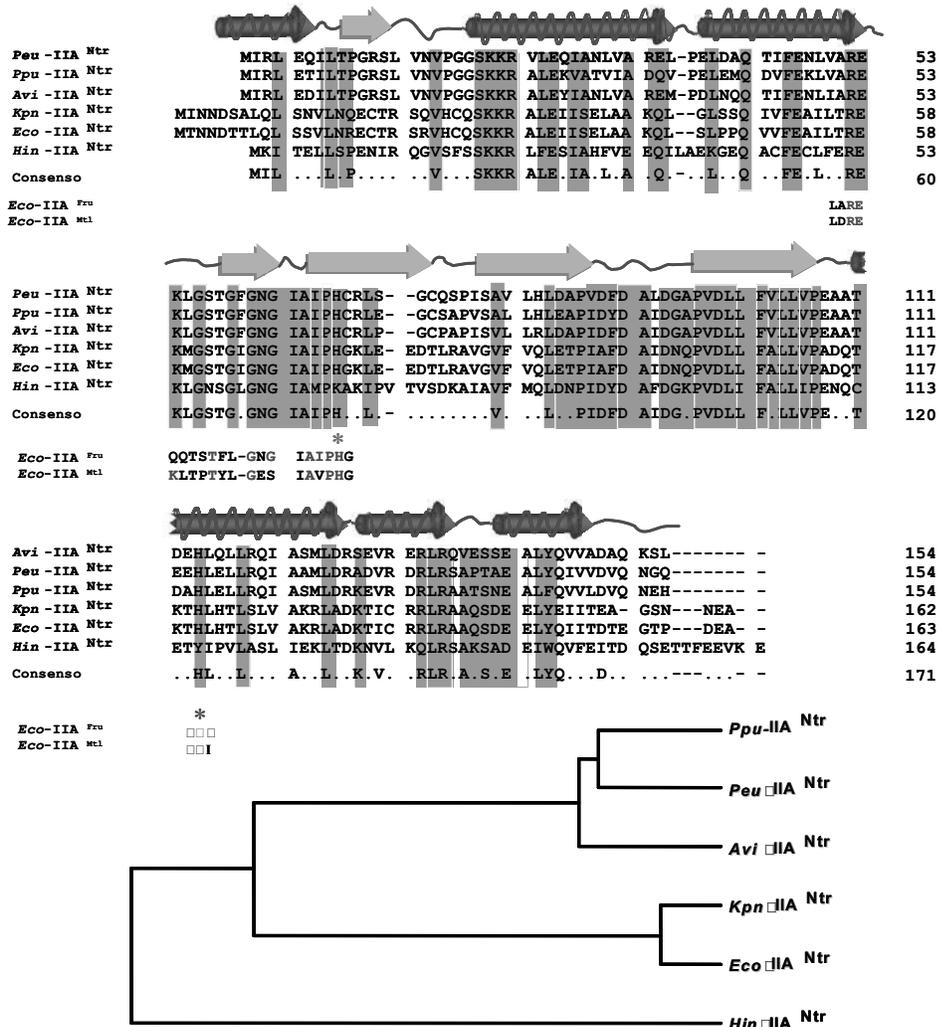


Figura 7. A) Algoritmo de alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína IIA^{Ntr} de *A. vinelandii* con las secuencias de aminoácidos de la proteína IIA^{Ntr} de *P. auroginosa*, *P. putida*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *H. influenzae*. El árbol filogenético muestra la relación evolutiva entre las especies. Los números indican la posición de los residuos en las secuencias. Los asteriscos (*) indican los residuos conservados en todas las especies. Los cuadrados blancos (□) indican los residuos conservados en algunas especies. Los cuadrados grises (■) indican los residuos no conservados.

1.1. Estructura secundaria de la proteína II^{Ntr} de *A. vinelandii*.

La enzima α -tr de *A. vinelandii* presentó una buena correlación en la estructura secundaria y tridimensional a la enzima α -tr de *E. coli*. Esta se caracteriza por una mezcla de cinco estructuras tipo β paralelas-antiparalelas que forman una lámina las cuales están flanqueadas por α -hélices a ambos lados (Figura 1). La lámina β está formada por dos pares de cadenas β que corren en direcciones opuestas (1) y (2) respectivamente y por una cadena β corta (3) la cual corre en dirección antiparalela a la cadena (1). Los α -hélices (C) y (D) se empaquetan en un lado de la lámina β mientras que las otras cuatro α -hélices están localizadas al otro lado (A) e (E). El empaquetamiento de las estructuras secundarias da como resultado una forma esférica irregular (Bordo et al., 1998; Montfort y Ojstra, 1998).

Al igual que la enzima α -tr de *E. coli* el residuo His 100 en α -tr de *A. vinelandii* se encuentra en la parte central de la cadena β (4) es el sitio propuesto que recibe el grupo fosfato de la γ -P este residuo está ubicado en una depresión poco profunda con características hidrofóbicas y flanqueada por las α -hélices D y E. La pared de esta depresión está formada por las cadenas laterales de Arg 100, Ile 101, Leu 102, Leu 103 y por los grupos metilo Thr 104 y Thr 105. La excepción de todos estos residuos están conservados en las secuencias de las α -tr incluyendo en la α -tr de *A. vinelandii*. Los residuos Arg 100 y Leu 103 generan una región con un potencial electrostático positivo y se ha sugerido que éste puede estar involucrado en la estabilización de un estado de transición penta-coordinado en la reacción de transferencia del grupo fosfato o del grupo fosforil cuando está covalentemente unido al residuo His 100 (Bordo et al., 1998; Montfort y Ojstra, 1998).

De la misma manera a la α -tr de *E. coli* la α -tr de *A. vinelandii* presenta otro grupo local que está formado por los residuos equivalentes a Tyr 106, Tyr 107, Leu 108, Leu 109, Tyr 110, Leu 111 y Ser 112. Estos residuos se encuentran en la superficie del lado opuesto del sitio activo. Su conservación sugiere que pueda tener una función importante en la interacción con otras proteínas como podrían ser aquellos factores desconocidos que afectan la expresión de los promotores dependientes de σ^{54} (Bordo et al., 1998; Montfort y Ojstra, 1998).

Una característica muy importante es que el residuo His 100 de α -tr de *E. coli* His 100 de α -tr de *A. vinelandii* está localizado en la superficie de la molécula mientras que el residuo equivalente His 100 de las enzimas α -Mtl⁺ y α -ac forma parte del sitio activo. En base a estudios de mutación en las enzimas α -lc de *B. subtilis* y *E. coli* se ha propuesto que esta segunda histidina es esencial para la reacción de transferencia del grupo fosfato a la α -lc (Resper et al., 1998; Eider et al., 1998) por analogía a las enzimas α -lc y α -Mtl se ha propuesto que His 100 de la enzima α -tr puede jugar un papel en la transferencia del grupo fosfato a proteínas no identificadas. En las estructuras de las α -tr la histidina está localizada en la vecindad del sitio activo de la α -hélice (1) sin embargo His 100 se encuentra en la parte de atrás de la α -hélice y apuntando hacia afuera del sitio activo por lo cual una rotación de 180° de la α -hélice o un desenrollamiento local de una parte del α -terminal tendría que ser necesario para acercarse al residuo His 100 al sitio de fosforilación aunque los residuos del 101 al 105

VII. **L** **tro** **NPr** **A. vinelandii.**

La proteína *pr* presenta en lo general una conservación de más del 60% en secuencia de aminoácidos con las secuencias relacionadas. Especialmente significativas son las homología con las proteínas *pr* de *P. aeruginosa* de identidad de similitud y de *P. putida* con un 60% de identidad y 65% de similitud. Cabe señalar que el sitio propuesto de fosforilación está conservado en la proteína de *A. vinelandii* y en todas las proteínas analizadas (figura 10) (ases *et al.*). Adicionalmente se encontró que la serina 20 se encuentra conservada en todas las secuencias analizadas. Basados en la organización genética del operón *rpoN* de la presencia del gen *hprK* que codifica *pr* cinasa y de la identidad de las proteínas y del plegamiento de las proteínas homólogas a *pr* *pr* y *pr* se ha propuesto que la *pr* puede ser un blanco posible de fosforilación por la *pr* cinasa y por lo tanto puede tener un papel regulatorio en enzimas *pr* de algunas bacterias del subgrupo de las γ y α proteobacterias (figuras 10 y 11) (Arner *et al.*)

A)

<i>Ppu-NPr</i>	----MPARE	----ITTIINKLGL	----HARAAAKFVG	----VAGRFPCQVP	----VGRAPDKLVD	48
<i>Pae-NPr</i>	----MPALE	----ITTIINKLGL	----HARAAAKFVG	----VAGRYPCQVR	----VGRNPESCVD	44
<i>Avi-NPr</i>	----MDNAMPACE	----VTIINKLGL	----HARAAAKFVG	----IAGRYACAVR	----IGRAPENLVD	44
<i>Kpn-NPr</i>	----MTVKQ	----TVEISNKLGM	----HARPAMKLF	----LMQNYDAEVL	----LRNDEGTVAE	45
<i>Eco-NPr</i>	----RIGINMTVKQ	----TVEITNKLGM	----HARPAMKLF	----LMQGFDAEVL	----LRNDEGTVAE	50
<i>Hin-NPr</i>	----MYSKD	----VEIIASNGL	----HTRPAAQFVK	----EAKAFSSEIT	----VTSG-GKSAS	43
Consenso	----M....	-----V.IINKLGL	----HAR.AAKFV.	----.A.....V.	50
			*			
<i>Ppu-NPr</i>	GKSIMAVMML	AAGKGTQVHL	HTXGEQSDA	MDALVELINN	FFDEGE	94
<i>Pae-NPr</i>	GKSIMAVMML	AAGKGTNLHL	HTEGEQEDEA	LNALVELINN	RFDEGE	90
<i>Avi-NPr</i>	GKSIMAVMML	AAGKGTVIHL	HTEGEQDREA	LEALVQLINN	RFDEDE	90
<i>Kpn-NPr</i>	ANSVIALML	DSAKGRQIEI	EANGPQEVEA	LAAVIALFNA	GFDED-	90
<i>Eco-NPr</i>	ANSVIALML	DSAKGRQIEV	EATGPQEEEA	LAAVIALFNS	GFDED-	95
<i>Hin-NPr</i>	AKSLFKLQTL	ALTQGTILTI	SADGEDEQQA	VEHLVALIPT	-LE---	85
Consenso	.KS..A..ML	A..KGT....	...GEQE.EA	L.ALV.LIN.	.FDE..	96
		*				

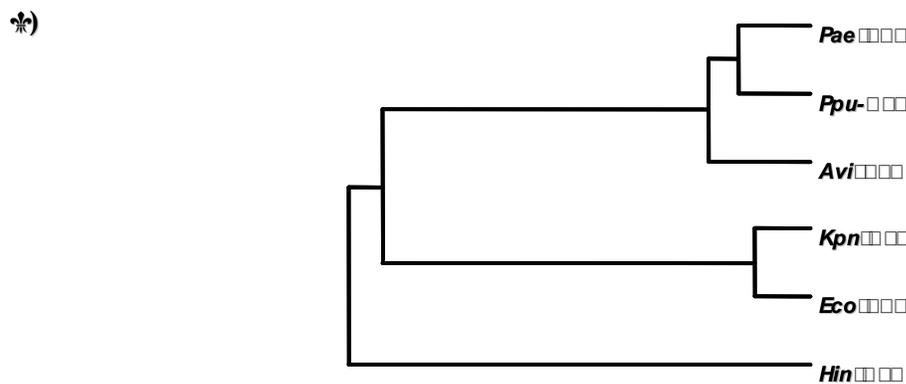


Figura 10. A) Algoritmo de alineamiento de secuencias de aminoácidos de las proteínas NPr de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *A. vinelandii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *H. influenzae*. El árbol filogenético muestra la relación entre las proteínas NPr de las especies mencionadas. B) Algoritmo de alineamiento de secuencias de aminoácidos de las proteínas NPr de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *A. vinelandii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *H. influenzae*. El árbol filogenético muestra la relación entre las proteínas NPr de las especies mencionadas.

VI. El ORF de *Azotobacter vinelandii*.

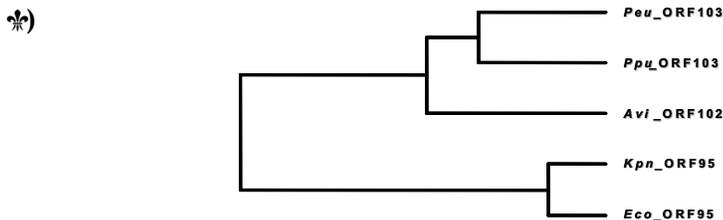
La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del ORF de *A. vinelandii* presentó una mayor identidad al género *Pseudomonas*. En particular el ORF de *A. vinelandii* presentó una identidad de 100% y 99% de similitud con el ORF de *P. aeruginosa* de 100% de identidad y 99% de similitud al ORF de *P. putida* de 100% de identidad y 99% de similitud al ORF de *K. pneumoniae* y 99% de identidad y 99% de similitud con el ORF de *E. coli*.

Se ha encontrado que en muchas bacterias las secuencias homólogas al ORF se encuentran conservadas en la organización dentro del operón se ha sugerido que pueden tener un papel en la modulación del factor σ^{54} . Aunque se ha encontrado que el ORF presenta alrededor de 100% de identidad al N-terminal de una proteína hipotética de 100% a 100% de *B. subtilis* la cual forma parte de una familia de proteínas que se han encontrado asociadas a la subunidad 30S del ribosoma y que modulan la traducción al unirse al sitio aminoacil. No se ha encontrado que mutantes en estos genes tengan algún fenotipo en los procesos tales como en la degradación de tolueno en *P. putida* o en el metabolismo del nitrógeno y carbono en *E. coli*.

A)

<i>Ppu</i> -ORF103	MQVNI SGHQLDVTDA LRDYVGEKLS RLERHFDRIT NVQVIMEVEK LKQKIIEATL	□
<i>Pae</i> -ORF103	MQVNI SGHQLDVTDA LRDYVGEKLS RLERHFDRIT NVQVIMEVEK LKQKIIEATL	□
<i>Avi</i> -ORF102	MQVNI SGHQLDVTDA LRDYVEEKIS RLERHFDRIIT SVQVIMTVEK LKQ-KIEATL	□
<i>Eco</i> -ORF95	MQLNI TGNVVEITPA LREFVTAKFA KLEQYFDRIN QVYVVLKVEK VTH-TSDATL	□
<i>Kpn</i> -ORF95	MQLNI TGHNVEITPA MRDFVTAKFS KLEQYFDRIN QVYVVLKVEK VTH-TADANL	□
Consenso	MQVNI SGHQLDVTDA LRDYV.EK.S RLERHFDRIT .VQVIM.VEK LKQ-IIEATL	□

<i>Ppu</i> -ORF103	RIAGGEIVAN AEHEDMYAAI DLLIDKLDRO LIKHKEKYLE RQQGVGAR	113
<i>Pae</i> -ORF103	RIAGGEIVAN AEHEDMYAAI DLLIDKLDRO LIKHKEKYLE RQQGVGAR	113
<i>Avi</i> -ORF102	HVSGAEVVAN AEHEDMYAAI DLLADKLDRO LIKHKEKYLE RQQGATAR	112
<i>HVNGGEIHAS</i>	AEGQDMYAAI DGLIDKLARQ LTKHKDKLKO H-----	9□
<i>Kpn</i> -ORF95	HVNGGEIHAS AEGQDMYAAI DGLIDKLARQ LTKHKDKLKO H-----	9□
Consenso	HV.GGEIVAN AEHEDMYAAI DLLIDKLDRO LIKHKEK..E RQQG..AR	113



A) Al comparar el ORF de *A. vinelandii* con el ORF de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *K. pneumoniae* y *E. coli* se encontró una alta similitud con el ORF de *P. aeruginosa* y *P. putida*. Esto sugiere que el ORF de *A. vinelandii* podría estar relacionado con el ORF de *P. aeruginosa* y *P. putida*.

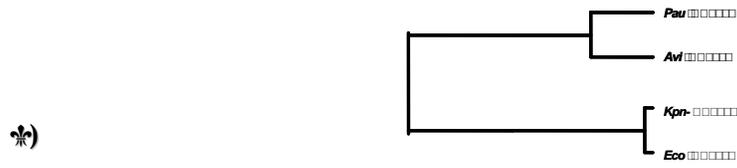
VII. El ORF de *Azotobacter vinelandii*.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos del ORF de *A. vinelandii* con las secuencias del ORF en *Ban* arroja un saldo de 100% de secuencias homólogas. Estas presentan arriba del 100% de identidad y de la misma manera como en los casos anteriores la secuencia *Avi* presenta una mayor conservación con las bacterias del género *Pseudomonas*: especialmente significativas son *P. aeruginosa* que tiene 100% de

identidad y de similitud de *P. putida* con de identidad y de similitud. En moderada conservación presenta la secuencia *Avi* respecto a las secuencias de *E. coli* y *K. pneumoniae* de identidad y de similitud en ambos casos. Cabe destacar que la función de los genes homólogos al no se ha identificado en ninguna bacteria sin embargo debido a la conservación en la organización dentro del operón de *rpoN* en diferentes grupos de bacterias gramnegativas se ha sugerido que tiene un papel en la modulación de la actividad del factor σ^{54} . Es importante también mencionar que las secuencias homóloga a *Avi* presentan una buena correlación de estructura primaria y secundaria que forman parte del dominio de unión a de proteínas cinasas dependientes de aunque no se ha demostrado su función (Marchaler *et al.*).

A)

<i>Avi</i> -ORF284	ML-VI---IV SGRSGSGKST ALNVLEDNGF FCIDNLPVAVL LPELAERALL HTELLEPOVA VSIDARNLPS QLKRF	71
<i>Pae</i> -ORF284	MR-LI---IV SGRSGSGKST ALDVLEDNGF YCIDNLPAGV LPQLAENALI NTELLOPKVA VSIDARNLPS HLMRF	71
<i>Kpn</i> -ORF284	MV-IM---IV SGRSGSGKSV ALRALEDMGF YCVDNLPVVL LPELAR-SLA DRNI---SAA VSIDVRMPPE S----	63
<i>Eco</i> -ORF284	MV-IM---IV SGRSGSGKSV ALRALEDMGF YCVDNLPVVL LPOLAR-TLA DREI---SAA VSIDVRMPPE S----	63
Consenso	M.-IM---IV SGRSGSGKSV ALRALEDMGF YCVDNLP.VL LP.LA.-.L. .E.---SVA VSID.RN.P. S----	75
<i>Avi</i> -ORF284	PELLAEVR-- -TRYILCDLL YLDADKTKLL KRFSETRTRRH PLTNENRSLA FAIRDEGRLL TPIKDLADLK IDTTH	143
<i>Pae</i> -ORF284	PELLAEAR-- -ARHIQCDVL YLDADEVLL KRFSETRTRRH PLTNENRSLA FAIRVESDILL GPIADLADLK IDTIN	143
<i>Kpn</i> -ORF284	PEIFEQAMKN LPAEFSPQLL FLDADRNTLI RRYSDTRRLH PLSSKNLSLE SAIDDESILL EPLRSRADLI VDTSE	138
<i>Eco</i> -ORF284	PEIFEQAMSN LPAEFSPQLL FLDADRNTLI RRYSDTRRLH PLSSKNLSLE SAIDKESDILL EPLRSRADLI VDTSE	138
Consenso	PE.LEQA...L.....LL FLDADR.TLI RRYSDTRRLH PLS.KNLSLE .AID.ESDILL EPL...ADLI .DTT.	150
<i>Avi</i> -ORF284	LNLVQLRDTL KLRLLNKPEP GFAFLIESFG FKKGMFVDAD LVFDVRCLEP PYWKPDLRDF SGLDQPVDY LAVQP	218
<i>Psp</i> -ORF284	LNLVQLRDSI KLRLLNQPEP GFAFLVESFG FKRGMFVDAD LVFDVRCLEP PYWKPELREH SGLDQPVIDY LAAQP	218
<i>Kpn</i> -ORF284	MSVHELAEML RTRLLGKRER ELIMVFESFG FKHGIPIDAD YVFDVRFLEP PHWDPKLREM TGLDKPVAAF LDRHT	213
<i>Eco</i> -ORF284	MSVHELAEML RTRLLGKRER ELIMVFESFG FKHGIPIDAD YVFDVRFLEP PHWDPKLREM TGLDKPVAAF LDRHT	213
Consenso	LS.H.LAE.L.R.RLLGK.E.EL....ESFG FK.GIP.DAD YVFDVRFLEP PHWD.P.LREM TGLD.PVA.F.L..HT	225
<i>Avi</i> -ORF284	DVEEMYQDIL TYLQKWLRF AASNRAYVTI AIGCTGGHHR SVYLADRIQG ALKQSLKNVQ VRHRDL----	284
<i>Psp</i> -ORF284	DVEDMYNDIS SYLLKWLRF AASNRAYVTI AIGCTGGHHR SVYITERLGR QLQQLKNVQ VRHRDL----	284
<i>Kpn</i> -ORF284	EVHNFYQTR SYLELWLEML ETNNRSYLIV AIGCTGGKHR SVYIAEQIAD YFRSRGKNVQ SRHRTLEKRR S	284
<i>Eco</i> -ORF284	EVHNFYQTR SYLELWLEML ETNNRSYLIV AIGCTGGKHR SVYIAEQIAD YFRSRGKNVQ SRHRTLEKRR P	284
Consenso	EV.FTY.TR SYL..WLEML E.NNRSYLIV AIGCTGGKHR SVYIAEQI.G.YF...GKNVQ .RHR.LE..K.	296



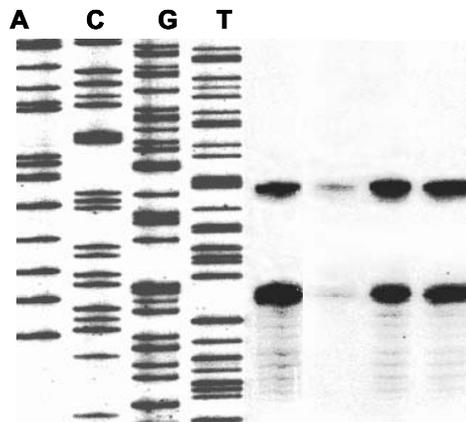
*) A) Al inicio del operón de *A. vinelandii* se encuentra un elemento regulador que actúa como un promotor. Este elemento regulador está formado por una secuencia de 100 nucleótidos que se encuentra en el extremo 5' del operón. Este elemento regulador actúa como un promotor para la transcripción de los genes biosintéticos de la ruta de la *phbBAC* en *A. vinelandii*.

VII. El elemento PTS^{Ntr} regulador de la transcripción del operón biosintético *phbBAC* en *A. vinelandii*.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se había detectado los inicios de transcripción para los genes biosintéticos de la ruta de la *phbBAC*. El análisis de las secuencias indican la presencia de dos posibles promotores que es activado por el regulador transcripcional de la familia *rpoN* y el promotor que presenta

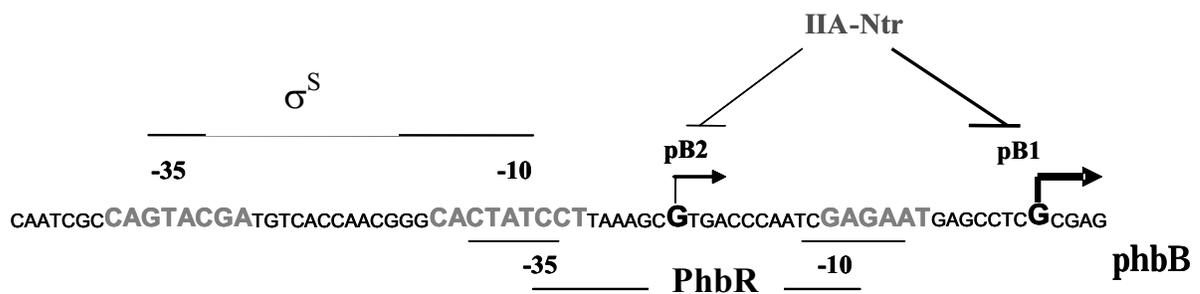
identidad a promotores que responden a σ^S generalta en el objeto de saber cómo se afectan estos promotores en las diferentes mutantes se realizaron experimentos de enucleasa. La cepa silvestre y las mutantes sencillas *ptsN* y *ptsP* así como la doble mutante *ptsP/ptsN* fueron crecidas durante 6 horas en 20°C con sacarosa al 0.5%. Después de este tiempo se les cosechó y extraíó el RNA para realizar estos experimentos. Los resultados fueron que la mutante *ptsP* presentó una disminución en los dos inicios de transcripción figura 100 mientras que la cepa *ptsN* presentó ambos inicios de transcripción. La doble mutante *ptsP* recupera la capacidad de generar los dos transcritos cuando se le hace una segunda mutación en *ptsN* figura 101. Lo anterior sugiere que cuando la mutante *ptsP* que carece de la enzima E^{tr} no puede asociar a σ^P y esta a su vez a la σ^S de tal manera que la σ^S en un estado no asociado reprime el inicio de transcripción en ambos promotores. Lo anterior es apoyado por que la mutante en *ptsN* que carece de la enzima σ^S los inicios de transcripción en ambos promotores son observados e incluso la tasa de transcripción es mayor a la cepa silvestre ver figura 10 del artículo de este trabajo. Adicionalmente la mutante *ptsP* que carece de la proteína σ^P es rescatada en su capacidad para iniciar la transcripción en los dos inicios de transcripción cuando se le hace una mutación en el gen *ptsN* σ^S . Todos estos resultados indican que el producto del gen *ptsN* σ^S en un estado no asociado genera represión en ambos promotores de los genes biosintéticos de σ^S B figura 102.

A)

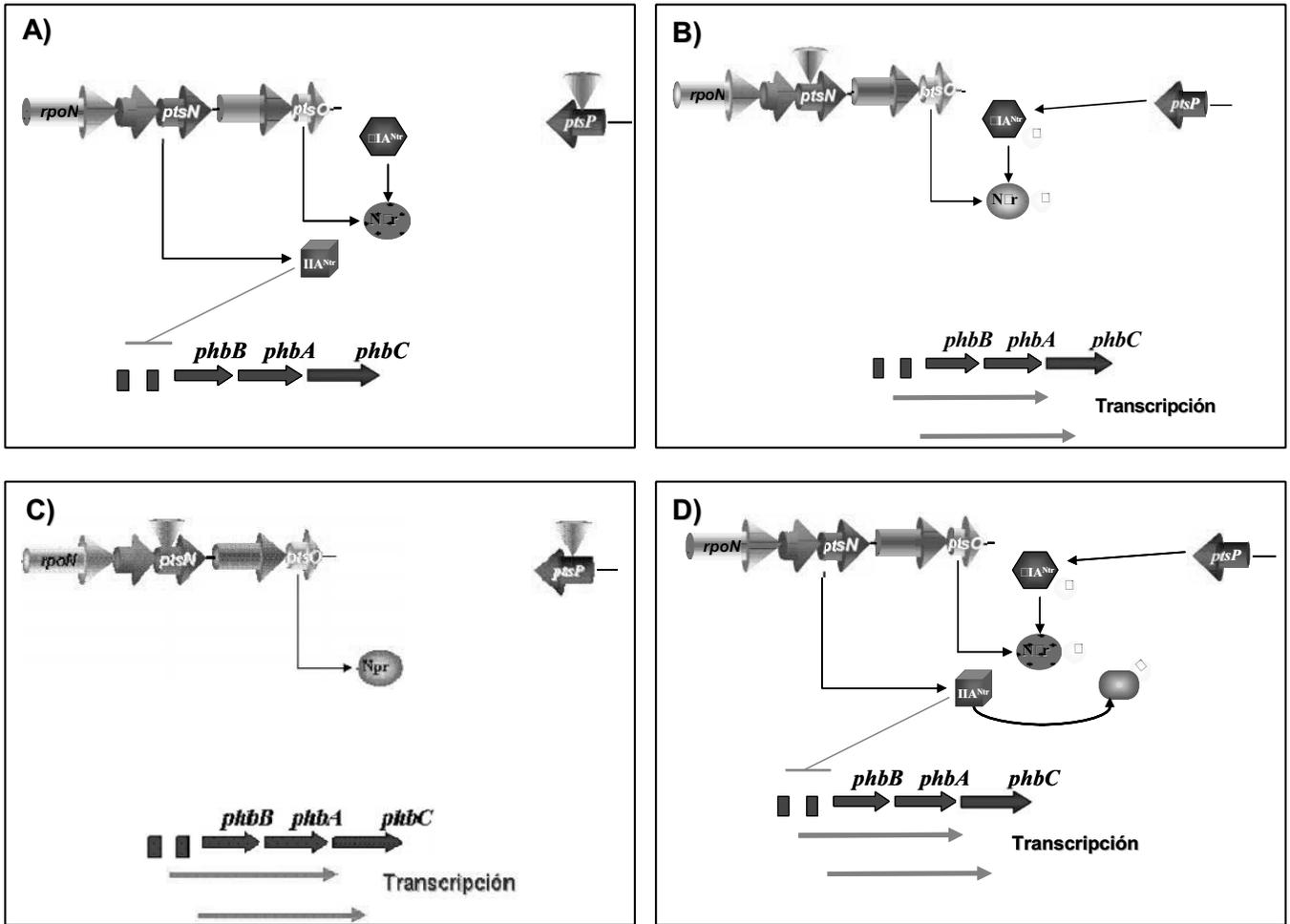


UW136 *ptsP* *ptsN* *ptsP-ptsN*

B)



Mur- A ***h***h ***cto ***l*** utic b***l*** lo***h*** h*** ***PTS^{Ntr} ***u ***h ***l***tr***cr***c***h*** h*** ***phbR***A. *vinelandii*. A) A ***h***h *** S*** ***o***ucl***h*** *) ***u***tr*** l*** ***cu***c*** *** co***tr*** h*** o***h*** ***phbBAC***lo*** ***c***b*** tr***cr***c*** ***lo***to***to***h***h***ro***otor***



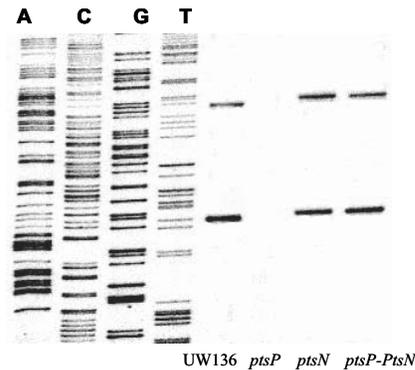
ur- o do ******r d lcto ***l*** utcb*** ***PTS to r l*
 tr***c*** lo ******co *** A. vinelandii. L* ut*** ptsP A) l*
 * ut***ptsN *) l* to d** ut***ptsP ptsN * l* l* c*** l***r*

VII.- El *** PTS^{Ntr} r*** lo* to* ***b* ** tr***c*** d r***or tr***c*** d phbR ** A. vinelandii.

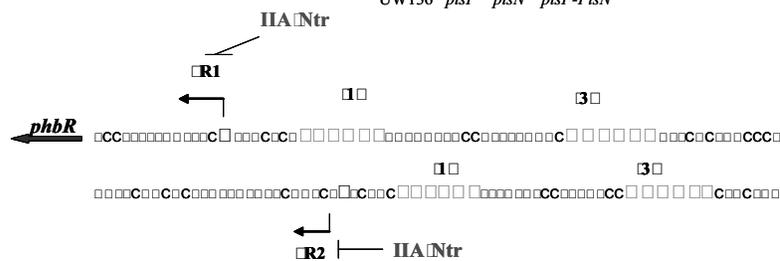
Como se mencionó anteriormente en nuestro laboratorio se clonó y caracterizó el gen *phbR* que codifica para un posible regulador transcripcional de la familia de *ra* *sil*. El gen *phbR* se localiza hacia arriba del gen *phbB* y en sentido divergente. También se demostró que mutaciones en este gen afectan negativamente la transcripción del promotor *phbB* y se incrementa ligeramente la transcripción del promotor en ciertas condiciones *alta* con el objeto de saber cómo se afectaba la transcripción del gen *phbR* se realizaron experimentos de *monoclonación*. Los resultados indican que la mutación en *ptsP* afecta la transcripción de ambos promotores del gen regulador *phbR*. Mientras la mutante *ptsN* presenta los dos inicios de la transcripción similar a la silvestre y la mutante *ptsP* recupera la capacidad de transcribir los dos promotores cuando se le introduce una segunda mutación en *ptsN* figura todos estos resultados indican que el producto del gen *ptsN* *tr* en un estado no

El regulador es un regulador negativo de los inicios de la transcripción en ambos promotores del gen *phbR*. Debido que los genes biosintéticos son regulados en los dos posibles promotores: el regulado por *phbR* y el independiente del factor σ^{70} proponemos que existe dos vías por las cuales la proteína *phbR* regula la transcripción de los genes biosintéticos una a través de regular la transcripción del gen regulador *phbR* y la otra independiente del regulador y es dependiente del inicio de transcripción del promotor que tiene consenso con σ^{70} .

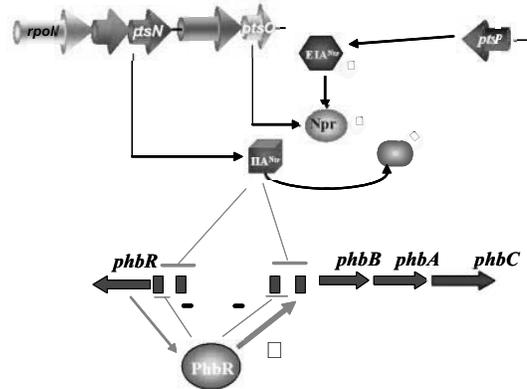
A)



B)



Murphy - A. v. *phbR* regulador para el sistema PTS^{Ntr} de *A. vianaIndii*. A) *phbR* transcrita desde el promotor R1. B) *phbR* transcrita desde el promotor R2. C) *phbR* transcrita desde el promotor R1 y R2.



Murphy - El sistema PTS^{Ntr} regulador de *phbBAC* para el sistema PTS^{Ntr} de *A. vianaIndii*. El sistema PTS^{Ntr} regulador de *phbBAC* para el sistema PTS^{Ntr} de *A. vianaIndii*. El sistema PTS^{Ntr} regulador de *phbBAC* para el sistema PTS^{Ntr} de *A. vianaIndii*. El sistema PTS^{Ntr} regulador de *phbBAC* para el sistema PTS^{Ntr} de *A. vianaIndii*.

VII. El sistema PTS^{Ntr} regulador de *phbBAC* para el sistema PTS^{Ntr} de *A. vianaIndii*.

Para saber si el gen *ptsO* participa en la acumulación de B se hicieron mutantes *ptsO::Sp*. Las mutaciones fueron introducidas por transformación en la cepa silvestre

En la mutante $ptsP::Km^r$ y $ptsN::Km^r$ para generar dobles mutante $ptsP/ptsO$ y $ptsN/ptsO$ respectivamente. Estas mutaciones fueron ancladas en experimentos tipo Southern y seleccionadas por su incremento en el tamaño del fragmento que corresponde al tamaño del interposon (datos no mostrados) para ver el efecto de dichas mutaciones. Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo sólido suplementado con sacarosa al 10% durante 48 hrs. Los fenotipos de las cepas bacterianas fueron observados en su propiedad de opacidad y se les midió la capacidad de acumular B. Figura 3 muestra los resultados obtenidos fueron: la mutante $ptsO::Sp^r$ presenta disminución en la acumulación de B y en los inicios de la transcripción de los dos promotores en el operón biosintético respecto a la cepa silvestre (Figuras 3) sin embargo el fenotipo de la mutante $ptsO::Km^r$ que acumula poco B es revertido parcialmente al silvestre respecto al fenotipo de acumulación de B cuando se le hace una segunda mutación en gen $ptsN$. Sin embargo el comportamiento respecto a la transcripción en los dos inicios no es similar a la cepa silvestre ó a la doble mutante $ptsP/ptsN$. Estos resultados sugieren que el producto del gen $ptsO$ es un regulador positivo de la síntesis de B al participar no solamente asociando a la proteína σ^S si no también de alguna otra manera.

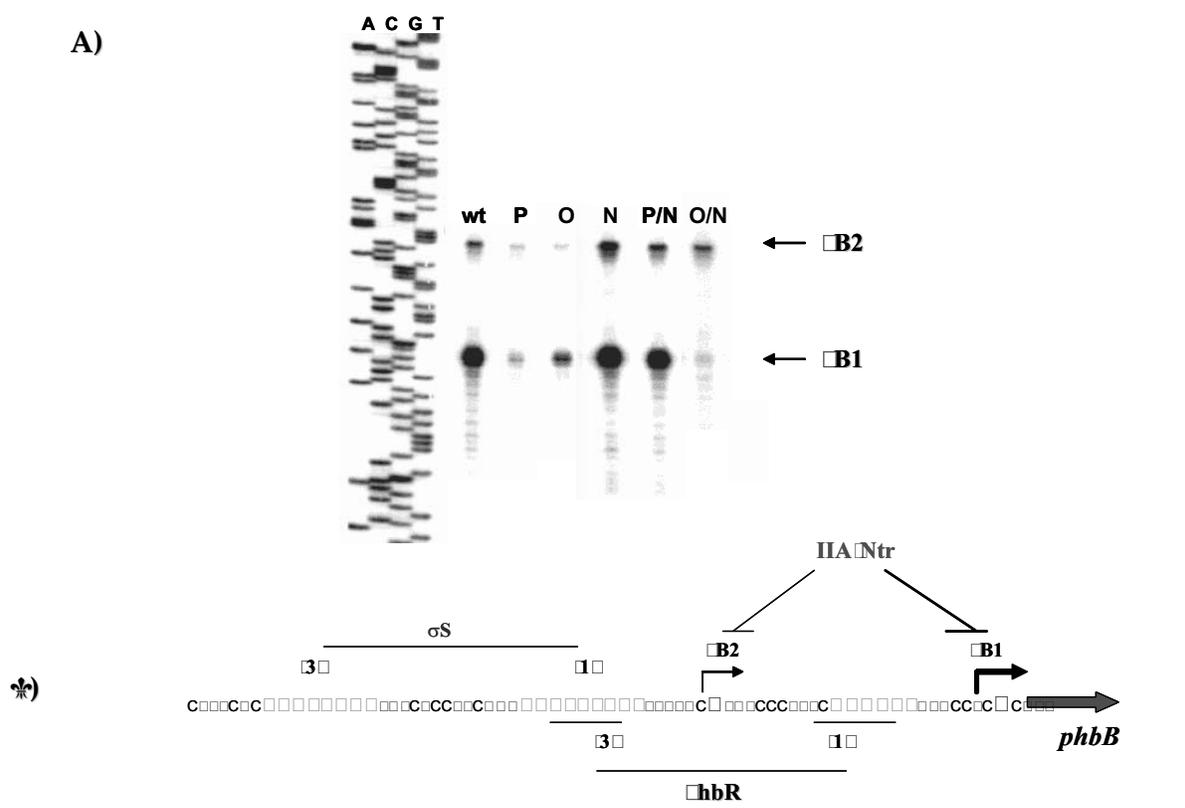


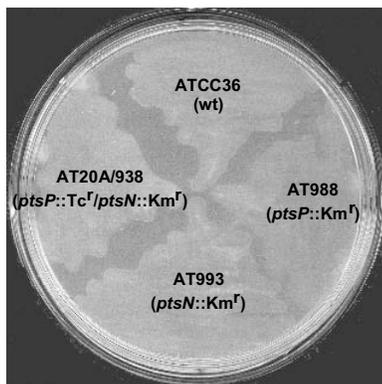
Figura 3. Southern blot analysis of the *phbB* operon. The blot shows bands for B1 and B2 in wt, P, O, N, P/N, and O/N strains. The schematic diagram shows the *phbB* gene with promoters σ^S , IIA, and Ntr, and the *hbR* gene.

VII. El efecto del sistema de regulación de la síntesis de B en *Azotobacter vinelandii*.

En este trabajo interrumpimos al sistema de regulación y al sistema de síntesis de B con el interposon ϕ m^r con el objeto de conocer su posible participación en la síntesis de B en *A. vinelandii*, generando las cepas AT20A/938 y AT988. Cuando estas cepas mutante son crecidas en medio con sacarosa al pH 7 durante 48 hrs. no presenta un efecto sobre la capacidad de acumular B (datos no mostrados). Estos resultados fueron corroborados midiéndole la acumulación de B en donde por tanto no tenemos ninguna hipótesis sobre la función de los sistemas de regulación en *A. vinelandii*.

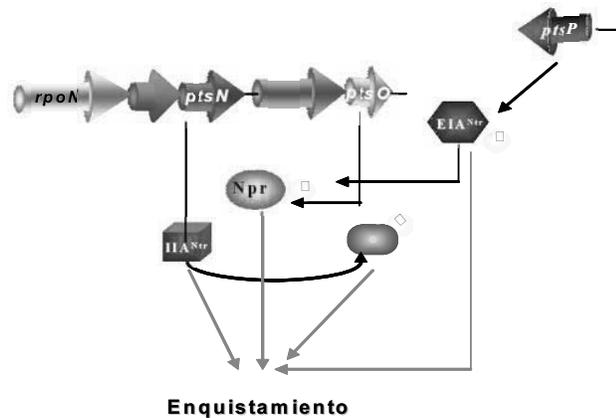
VII. El efecto del sistema de regulación de la síntesis de B en *Azotobacter vinelandii* en la formación de quistes.

Como se mencionó en los antecedentes la cepa AT988 de *A. vinelandii* que presenta una mutación en el gen *ptsP* el cual codifica para la enzima ϕ tr^r es incapaz de formar quistes resistentes a la desecación. La morfología de la mutante después de la inducción del enquistamiento las células presentaron forma esférica sin las capas de intina y eina y una menor cantidad de B (según los resultados anteriores inicialmente se pensó que la incapacidad de formar quistes resistentes a desecación era una consecuencia de la disminución en la síntesis de B el cual debería de ser utilizado como material de reserva y de energía para la síntesis de las capas de intina y eina que cubren al quiste pero este fue resultado al caracterizar la mutantes en el gen *phbC* que codifica para la B sintasa ya que esta mutante es capaz de formar quistes resistentes a desecación (según Espínola) lo cual indica que la enzima ϕ tr^r participa de otra manera en la formación del quiste. Con el objeto de conocer si la cascada de fosotransferencia del sistema ϕ tr^r estaba involucrada en la regulación de la formación del quiste se hicieron mutantes sencillas y dobles en *ptsN* y *ptsP*/*ptsN* y se midió la capacidad de formar quistes resistentes a desecación (según la mutante *ptsN* que tiene una capacidad de formar quistes resistentes a desecación 10 veces menos a la cepa silvestre) a diferencia de la mutante *ptsP* que es incapaz de formar quistes. Mientras que una la mutante AT988 cuando se le introduce una segunda mutación en el gen *ptsN* la mutante *ptsP*/*ptsN* recupera la capacidad de formar quistes resistentes a desecación en un 100% aproximadamente respecto a la cepa AT9046.



Cepa	% de enquistamiento
Tiempo silvestre ATCC9046	3.67
Mutante <i>ptsP</i> AT988	0.00
Mutante <i>ptsN</i> AT993	0.20
Mutante <i>ptsP</i> / <i>ptsN</i>	1.36

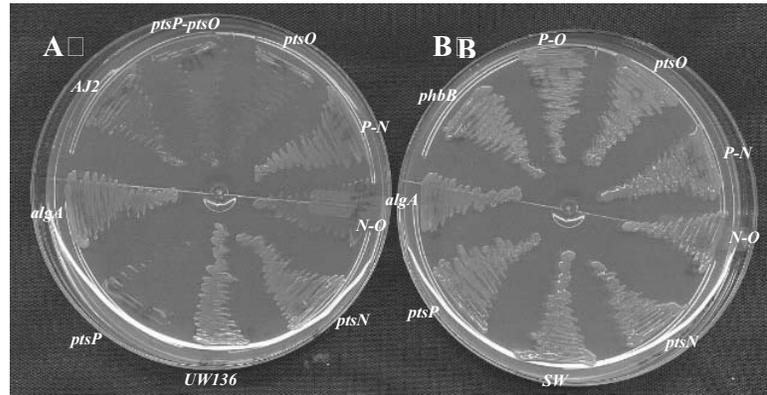
Estos resultados sugieren que la cascada de fosforilación está participando en la formación de quistes y que el producto de *ptsN* está en un estado no fosforilado participa de alguna manera en la regulación negativa de la formación de quistes resistentes a desecación. El hecho de que la mutante *ptsN* tenga una capacidad reducida respecto de la cepa silvestre en la formación de quistes sugiere que la proteína está se requiere para el enquistamiento. La mutante *ptsP* que no forma quistes resistentes a desecación es rescatada parcialmente en la capacidad de enquistamiento por la mutante *ptsN* lo que indica que la vía está participando en diferentes niveles es decir éstos resultados sugieren que la enzima está regula eventos del enquistamiento independiente de la proteína. Adicionalmente se requiere para el enquistamiento la presencia de la enzima EIA^{Ntr} como ya se mencionó ya que la mutante *ptsN* tiene una reducida capacidad de enquistamiento.



***- * odo ***o d ***PTS rult d ***to **A. vinelandii.

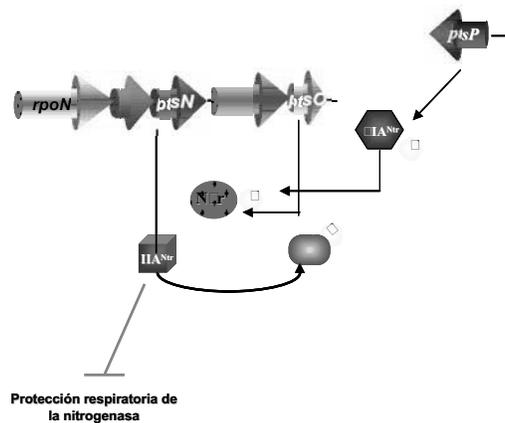
VII.- El sistema de PTS^{Ntr} de *A. vinelandii*.

En un trabajo previo se encontró que la mutante en el gen *ptsP* de *A. vinelandii* es incapaz de crecer en condiciones diazótróficas en concentraciones de 0.5 mM de glucosa y que el crecimiento es reestablecido al incrementar la concentración de glucosa o disminuyendo la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. Se demostró que no se encontró afectada la transcripción de *nifH* el gen que codifica para la proteína *nifH* que forma parte del complejo nitrogenasa con lo anterior se concluyó que *ptsP* participa en la protección respiratoria de la nitrogenasa. Segura y Espínola (1998) con el objeto de saber si los otros dos componentes del sistema están participando en este evento las mutantes sencillas *ptsO* y *ptsN* y las dobles mutantes *ptsNptsP* y *ptsOptsN* se probaron en su capacidad para crecer en condiciones de fijación de nitrógeno. Mientras que las cepas con mutaciones sencillas en *ptsO* y *ptsP* así como la mutante doble *ptsPptsO* fueron incapaces de crecer en condiciones de fijación de nitrógeno con 0.5 mM de glucosa como fuente de carbono (Figura 10) la mutante *ptsN* que porta una mutación en el gen *phbB* presenta disminuida la capacidad de crecimiento lo que indica que la acumulación de PHB participa en la protección respiratoria cuando la concentración de la fuente de carbono es baja que todas las mutantes crecen bien con 0.5 mM de glucosa (Figura 10).



Murillo et al. (2008) - A) Crecimiento de la cepa mutante de *A. vinelandii* U* en presencia de glucosa y nitrógeno (mutante de *ptsP* y *ptsO*) y de la cepa mutante de *A. vinelandii* (mutante de *ptsP* y *ptsO*) en presencia de glucosa y nitrógeno. B) Crecimiento de la cepa mutante de *A. vinelandii* U* en presencia de glucosa y nitrógeno y de la cepa mutante de *A. vinelandii* (mutante de *ptsP* y *ptsO*) en presencia de glucosa y nitrógeno.

Se ha sugerido que otra de las funciones del alginato como polisacárido extracelular es formar una barrera para la difusión de oxígeno y participa de esta manera en la protección a la nitrogenasa. Con el objeto de probar esta hipótesis se le introdujo el gen *algU* para restaurar la capacidad de sintetizar alginato a la cepa *ptsP ptsO* y a las mutantes en genes del sistema *pts*^{tr} y a la mutante en el gen *phbB* (Figura 2B). Las cepas fueron crecidas en condiciones diaotróficas con 10 mM de glucosa (Figura 2C). Todas las mutantes crecen bien en 10 mM de glucosa en condiciones de fijación de nitrógeno lo cual indica que tanto el sistema *pts*^{tr} como el alginato participan en la protección de la nitrogenasa al oxígeno y la síntesis de alginato suprime el efecto negativo de las mutaciones *ptsP* y *ptsO* sobre la protección respiratoria. El hecho de que la mutante *ptsP* revierta el fenotipo cuando se le hace una segunda mutación en *ptsN* indica que la proteína *pts*^{tr} en un estado fosforilado es un regulador negativo de la protección respiratoria de la nitrogenasa. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en un trabajo previo (Figura 2 y Espín et al., 2008).



Murillo et al. (2008) - Diagrama del sistema *pts*^{Ntr} y su rol en la protección respiratoria de la nitrogenasa en *A. vinelandii*.

VII. * - Proteo * * * * * ut * * * * * ptsP * * A. vinelandii.

Con el objeto de conocer como afecta la mutación *ptsP* la expresión global del genoma y darnos una idea mas clara de efectos de ésta mutación en la síntesis de B y la protección respiratoria se crecieron la cepa silvestre y la mutante *ptsP-* en medio suplementado con de sacarosa durante hrs. Después de este tiempo se cosecharon las células y se les extrae la proteína las cuales se corrieron en geles de dos dimensiones para ver el patrón de proteínas se analizó el patrón de proteínas en y se escogieron aquellas que presentaran cambios en la de expresión comparando la cepa silvestre con la cepa mutante figuras y B respectivamente. Las proteínas que presentaron diferencias en el patrón de expresión fueron cortadas del gel para identificarlas por espectrometría de masas de tiempo de vuelo asistida por matriz MALDI. Las proteínas identificadas se muestran en el cuadro.

Los resultados obtenidos son: en la mutante desaparece la enzima superóxido dismutasa esta enzima se ha identificado en muchos organismo y es importantes para resistencia al estrés oxidativo al reducir el peróxido de hidrógeno. Otras proteínas que pueden ser importantes para el estrés oxidativo y que se encuentra disminuidas en la mutante son *sp* y *glavin* oxidoreductasa. La primera es una chaperona que puede estar participando en el plegamiento de proteínas durante el crecimiento aeróbico y la segunda es una proteína que puede participar en la reducción de oxígeno durante la respiración. Todos estos datos sugieren que el sistema *tr* participa en la regulación del estrés oxidativo a través de regular la expresión de proteínas importantes para contender con el estrés oxidativo. Por otro lado a pesar que la mutante parece expresar una alilperoxidasa a diferencia de la cepa silvestre donde no esta presente parece ser suficiente para soportar el estrés oxidativo en condiciones de fijación de nitrógeno o que ésta proteína no se expresa en baja concentración de carbono.

Otros resultados del análisis de proteoma que es importante mencionar es que también existe una disminución en la expresión de proteínas en la mutante. Estas proteínas participan en el metabolismo del carbono y del nitrogeno ver cuadro. La asina es destacable por su nivel de importancia para la acumulación y regulación del gránulo de Bola cual está disminuida en la mutante respecto a la cepa silvestre. Los cambios en la expresión de muchas de las proteínas presentadas en el cuadro podrían ser más que de un modo directo del sistema *tr* un evento fisiológico generado por el estrés oxidativo de ésta mutante.

Table I.- Proteins identified for ALDI-TOF mass spectrometry in the culture supernatant of *U. maydis* (DS988) (ptsP-).

Spot/gene	WT	DS988	Product	PathwayFunction?
W19/sodB	+	-	Superoxide dismutase (cytoplasmic)	*
W37/oprD	+	-	Outer membrane porin	*
W41/hsp20	+	-	Heat shock protein	*Chaperone
W51/phoA	+	-	Phosphatase alkaline	*
W7/pgm	+	-	Phosphoglycerate mutase	
W36/	+	+/-	NADH:Flavin oxidoreductase	
W44/	+	+/-	Phasin	
W6/aglA	+	+/-	Alpha-glucosidase /sucrose synthase	
W9/	+	+/-	Alpha-amylase/sucrose isomerase	
W10/aglA	+	+/-	Alpha-glucosidase	
W27/gpm	+	+/-	Phosphoglycerate mutase	
W11/pho-like	+	+/-		
W50/gabT	+	+/-	4-aminobutyrate aminotransferase	
W52/gltB	+	+/-	Glutamate synthase GOGAT	
W40/phoU	+	+/-?		
W26/fecA	+	+/-?	TonB-dependent siderophore receptor	
W21	+	+/-?	Hypothetical	
DS44/ahpC	-	+	Alkyl peroxide reductase	*catalase activity
DS27	+/-	+	Metallo protein OMP	
DS39/fldB	+/-	+	Flavodoxin long chain	
DS19/pyrC	+/-	+	Dihydroorotase	
DS22/pgl	+/-	+	6-Phosphogluconolactonase	
DS25/fabA	+/-	+		
DS36/aceB	+/-	+	AcetylCoA biotin carboxyl protein	
DS40/entB	+/-	+	Isochorismatase	
DS42/jmjC	+/-	+	Jumanji transcription factor	
DS28	+/-	+	Hypothetical	
W47	+/-	+	Methylase/	ubiquinone/menaquinone biosynthesis

VIII.- Conclusiones:

- 1.- Clonamos y caracterizamos los genes que codifican para las proteínas IIA^{Ntr} y Npr.
- 2.- Estos genes se encuentran conservados en secuencias y organización genética al de muchas bacterias, principalmente con las γ -proteobacterias bacterias.
- 3.- El análisis genético indica que, las proteínas EI^{Ntr}, Npr IIA^{Ntr} participan en una cascada de fosforilación, como en la bacteria *E. coli*.
- 4.- La proteína IIA^{Ntr} es un regulador negativo de la transcripción del gen regulador *phbR* y los genes biosintéticos *phbBAC*.
- 5.- En *A. vinelandii* la proteína IIA^{Ntr} es un regulador negativo de la protección respiratoria y del enquistamiento.
- 6.- La enzima I^{Ntr} participa de en el proceso de enquistamiento de manera independiente de la enzima IIA^{Ntr}.
- 7.- La mutante *ptsP*- presenta un efecto en el patrón de expresión de proteínas que participan en la protección respiratoria, el metabolismo del carbono y nitrógeno.

X.- BIBLIOGRAFÍA

- Angelova N., Hunkeler D. (1999). Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* 17:409-421.
- Anderson A. J., Haywood G. W., Williams D. R., Dawes E. A. (1990). The production of polyhydroxyalkanoates from unrelated sources. Pp 119-129. In E. A. Dawes (ed). *Novel biodegradable microbial polymers*, vol 186. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Arellano C. T. J. (2000). Caracterización del gen *phbB* de *Azotobacter vinelandii*, involucrado en la producción del poliéster natural polihidroxibutirato. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
- Bordo D., van Monfort R. L. M., Pijning T., Kalk K. H. Reizer J., Saier M. H. Jr., Dijkstra B. (1998). The Three-dimensional structure of the Nitrogen Regulatory Protein IIA^{ntr} from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 279: 245-255.
- Cases I., Martín-Pérez J., de Lorenzo V. (1999). The IIA^{ntr} (PtsN) Protein of *Pseudomonas putida* Mediates the C Source Inhibition of the σ 54-dependent Pu promoter of the TOL Plasmid. *J. Biol. Chem.* 274(22) 11562-11568.
- Cases I., deLorenzo V. (2000). Genetic Evidence of Distinct Physiological Regulation Mechanisms in the σ 54 Promotor of the *Pseudomonas putida*. *J. Bac.* 182 : (2) 956-960.
- Castañeda M., Guzmán J., Moreno S., Espín G. (2000). The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182(9): 2624-2628.
- Cho K. S. H. W., Ryu C. H., Park R. C. H. , Goodrich P. R. (1997). Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Lett.* 19: (7-10).
- Choi J. y Lee S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng* 17:335-25.
- Dawes E. A. (1990). Novel Microbial polymers: an introductory overview. In *Novel Biodegradable Microbial polymers* ed. E. A. Pp, 3-16, Dordrecht , Kluwer Academic Publishers.
- Deutscher J., Reizer J., Fischer C., Galinier A., Saier M., Steinmetz M. (1994). Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 3336-3344
- De Koning G. J., Kellerhals M., van Meurs C., Witholt B. (1997). A Process for recovery of poly (3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 2 Process development and economic evaluation. *Bioprocess Eng.* 17:15-21.
- Deutscher J., Küster E., Bergstedt U. Charrier V., Hillen W. (1995). Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15:1049-1053.
- Doi Y., Kawaguchi Y. Koyama N., Nakamura S., Hiramitsu M., Yoshida Y. (1992). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS. Microbiol. Rev.* 103 1003-108.
- Faires N., Tobisch s., Bachem S., Martin-Verstraete I., Hecker M., Stülke J. (1999). The catabolic control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 141-148.
- Fardis Iberica SL (2004). Productos Biodegradables y compostables C/ San Martín, 57, Entlo. A 20007, San Sebastián, España. correo@fardis.org
- Fleischman *et al* (1995). Nitrogen regulatory IIA Protein Homolog. In: Whole -genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science.* 269 (5223) : 496-512
- Foster L., Zervas S., Lenz R., Fuller R. (1995). The biodegradation of poly-3-hydroxyalkanoates, PHAs, with long alkali substitutes by *Pseudomonas maculicola*. *Biodegradation* 6: 67-73.
- Fritz H.G., Seidenstucker T., Bolz U., Juza M., Schroeter J., Endres H. J. (1988). Production of thermoplastic and fibres based mainly on biological materials. In Meesters K. H. I. editor. *Producción de poly-(3-hidroxyalcanoates) from waste streams*. Delf: Tudelft Press. Pp 4-87.
- Fukui T., Doi Y. (1997). Cloning and analysis of the poly(3hydroxybutyrate-co 3-hydroxyhexanoato) biosynthesis genes of *Aeromonas cavia*. *J. Bacteriology.* 179.4821-4830.
- Fukui T., Shiomi N., Doi Y. (1998). Expression and characterization of (R)-Specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoates biosynthesis by *Aeromonas cavia*. *J. Bacteriology.* 180:667-673.
- Galinier A., Haiech J., Kilhoffer M. C., Jaquinod M., Stülke J., Deutscher J., Martin-Verstraete. (1997). The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:8439-8444.
- Green P.R. Kemper J., Schechtman L., Guao L., Satkowski H., Seki M., Fiedler S., Steinbüchel A., Rehm B. H. A. (2002). Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid beta-oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules.* 3. 208-213.
- Greenberg D., Stülke J., Saier M. (2002). Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res. Microbiol.* 153: 519-526.
- Gorke B. (2003). Regulation of the *Escherichia coli* antiterminator protein Bgl by phosphorylation at multiples sites and evidence for transfer of phosphoryl groups between monomers. *J Biol. Chem.* 278: 6219-46229

- Hein S., Tran H., Steinbüchel A. (1988).** *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 170:162-170.
- Henkin T.M. (1996).** The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.
- Huang R., Reusch R. N. (1995).** Genetic competence in *Escherichia coli* Poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complex and divalent cations. *J. Bacteriol.* 177:486-490.
- Jendrossek D., Knke I, Habibian R., Steinbüchel A., Schlegel H. (1993).** Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB by bacteria and purification of a PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *J. Environ. Polymer Deg.* 1: 53-61
- Johnstone B. (1990).** A throw away answer. *Far Eastern Econ. Rev.* 147(6):62-63.
- Jin S., Ishimoto K., Lory S. (1994).** Nucleotide sequence of the *rpoN* gene and characterization of two downstream open reading frames in *Pseudomonas aeruginosa*. (1994). *J. Bacteriol.* 176(5): 1316-1322.
- Jurasek L, Nobes GAR, Marchessault RH. (2001).** Computer simulation of *in vitro* formation of PHB granules: particulate polymerization. *Macromol Biosci.* 1:258-265
- Kalia V. C., Raizada N., Sonakya V., (2000).** Bioplastics. *J. Sci. Ind. Reserch.* 59:433-445.
- Kim B.S. (2000).** Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology.* 27:774-777.
- Kessler B., Withol B. (2001).** Factors in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. of Biotechnology.* 86:97-104.
- Kravanja M., Engelmann R., Dossonnet V., Bluggel M., Meyer H., Frank R., Galinier A. Deutscher J., Schnell N., Hengstenberg W. (1999).** The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol. Microbiol.* 31: 59-66.
- Kundig, W., S. Gosh, Roseman S. (1964).** Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:1067-1074.
- Langenbach S., Rehm B. H. A., Steinbüchel A. (1997).** Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 54:2924-2932.
- Lafferty R. M., Korsatko B., Korsatko W. (1990).** Microbial Production of Poly- β -hydroxybutyric acid. *En Rehm H. J. Red G. (Eds).* *Biotechnology.*
- Lee S. Y. (1996).** Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotch. Bioeng.* 49 1-14.
- Lee S. J., Boos W., Bouché J.P. Plumbridge J. (2000).** Signal transduction between a membrane bound transporter and soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 19:5344-5352.
- Lee C., Koo B., Cho S., Kim Y., Yoon M., Peterkofsky A., Seok, Y. (2005).** Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K12 *ilvBN* expression. *Mol. Microbiol.* 2005 Oct; 58(1):334-44.
- Lee C., Cho S., Yoon M., Peterkofsky A., Seok Y. (2007).** *Escherichia coli* enzyme IINtr regulates the K⁺ transporter TrkA. *PNAS.* In prensa.
- Lehninger A., Michael M. Cox, David L. Nelson. Principios de Bioquímica (2005.)** Editorial: Omega. 4ªEd.
- Luengo J. M., García B., Sandoval A., Narro G., Oliveira R. E. (2003).** Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology.* 6:251-260
- MacCool G., Cannon M. (2001).** PhaC and PhaR are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriology.* 183:14 4235-4243.
- Madison L; Huisman G. W. (1999).** Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbio. and Molec. Biol. Rev.* 63: (21-53).
- Manchak J., Page J. (1994).** Control of polyhydroxyalkanoates synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology.* 140:953-963
- Marchessault R. H. (1996).** Tender morsels for bacteria recent developments in microbial polyesters. *Trens Polym. Sci.* 4:163-168.
- Matsusaki A., Manji S., Taguchi K., Kato M., Fukui T., Doi Y. (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: 585-592.
- Michiels J., Van Soom T., D'hooghe I., Dombrecht B., Benhassine T., de Wilde P., Vanderleyden J. (1998).** The *Rhizobium etli* *rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypic characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. *J. Bacteriol.* 180 (7): 1729-1740.
- Miyake M., Kataoka K. Shirai M., Asada (1997).** Control of poly beta hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in cyanobacteria. *J., Bacteriol.* 179: 5009-5013.
- Miyamoto C., Sun W., Meighen E. (1988).** The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. *BBA Protein Struct. Mol Enzym.* 1384: 356-364.
- Merrick M., Gibbs J., Toukadarian A. (1987).** The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* (1987). 210: 323-330
- Merrick M., Taylor M., Saier M., Reizer J. (1995).** The Role of Genes Downstream of The σ^N Structural Gen *rpoN* in *Klebsiella*

- pneumoniae*. Tikhonovich Ed. In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Kluwer Academic Publisher. Printed in the Netherlands. Pp 189-194.
- Michiels J., Van Soom T., D'hooghe I., Dombrecht B., Benhassine T., de Wilde P., Vanderleyden J. (1998)** The *Rhizobium etli* *rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. *J. Bacteriol.* **180** (7): 1729-1740.
- Miwa Y., Nagura K., Eguchi S., Fukuda H., Deustcher J., Fujita J. (1997)**. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol. Microbiol.* **23**: 1203-1213.
- Miwa Y., Nakata A., Ogiwara A., Yamamoto M., Fujita Y. (2000)**. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Res.* **28**: 1206-1210.
- Murayama N., Shimizu H., Takiguchi S., Baba Y., Amino H., Horiuchi T., Sekimizu K., Miniki T. (1996)**. Evidence for involvement of *Escherichia coli* genes *pmbA*, *csrA* and a previously unrecognized gene *tldD*, in the control of DNA gyrase by *letD* (*ccdB*) of sex factor F. *J. Mol. Biol.* **256**(3):483-502.
- Oeding V., Schlegel H. (1973)**. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas utrophia* H 16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* **134**: 239-248.
- Page W. J. (1989)**. Production of poly-(3)-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotech. Lett.* **14**: (5) 385-390.
- Page W. J. (1993)**. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(12): 4236-4244
- Peoples O. P., Sinskey A. J. (1989)**. Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* **264**: 15293-15303.
- Peralta-Gil M., Segura D., Guzmán J., Servín-Gonzales L., Espín G. (2002)**. Expresión of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on Transcriptional Activator *phbR*. *J. Bact.* **184**(29): 5672-5677.
- Peralta-Gil M. (2004)**. Control transcripcional del operón divergente *phbBAC*, de polihidroxibutirato, mediado por los reguladores *GacA*, *RpoS* y *PhbR* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología de la UNAM. Av Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mex.
- Plumbridge J. (1998)**. Control of expression of the *manXYZ* operon in *Escherichia coli*: *Mlc* is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol. Microbiol.* **27**: 369-381.
- Plumbridge J. (2002)**. Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli* role and interactions of *Mlc*. *Current Opinion in Microbiol.* **5**: 187-193.
- Poirier Y, Nawrath C, Somerville C. (1995)**. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology.* **13**:142– 50.
- Potsma P. W; Lengeler J. W; Jacobson G. R. (1996)**. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* (cellular and molecular biology). Neidhardt F. C. N; Curtiss R; Ingraham J. L; Lin C. C; Brooks K. L; Magasanick B; Reznikoff W. S; Riley M; Schaechter M, Umberger E. (Editores). Impreso por American Society For Microbiology (ASM) 1325 Masschustts Ave., N. W. Washington D. C. 20005. pp 1149-1169
- Powell B. S., Court D L., Inada T., Nakamura Y., Michotey V., Cui X., Reizer A., Saier M. H. Jr., Reizer J. (1995)**. Novel Proteins of the Phosphotransferase System Encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**(9): 4822-4839.
- Prieto M., Buheler B., Jung K., Whitholt B., Kessler B. (1999)**. *PhaF*, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas aleovorans* *Gpo1* involved in regulatori expression system for *pha* genes. *J. Bacteriology.* **181**: 858-868.
- Pries A., Priefer H., Krüger N., Steinbüchel A. (1991)**. Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gen loci relevant to the poly(beta-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 5843-5853.
- Presecan-Siedel E., Galinier A., Longgin R., Deutscher J., Danchin A., Glaser P., Martin-Verstraete I. (1999)**. Catabolic regulation of the *pta* gene as apart of carbon flow pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 6889-6897
- Rabus R., Reizer J., Paulsen I., Saier M. H. Jr. (1999)**. Enzyme *Inte* from *Escherichia coli*, (a novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, *NPr*. *J. Biol. Chem.* **274**(37): 26185-26191.
- Reizer J., Reizer A., Merric M. J., Plunkett III G., Debra J. R. Saier M. H. Jr. (1996)**. Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an Enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene.* **181**: 103-108.
- Reddy CSK, Ghai R, Kalia RVC. (2003)**. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol.* **87**:137– 46.
- Rehm B. H.A., Krüger N., Steinbüchel A. (1998)**. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis –The *phaG* from *Pseudomonas putida* KT440 encodes a 3-hydroxyacyl carrier protein coenzyme A transferase. *J. Biol. Chem.* **273**:24044-24051.
- Rehm B. H. A. (2003)**. Polyester synthases: natural catalysis for plastics. *Biochem. J.* **376**:15-33.
- Reusch R. N., Sadoff H. L. (1988)**. Putative structure and functions of a poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4176-4180.

- Reusch R. N., Sparrow A. W., Gardiner J. (1992).** Transport of a poly- β -hydroxybutyrate in human plasm. *Biochim. Biophys. Acta.* **1123**: 33-40
- Rodríguez-Sainz M. C. Hernández-Chico C., More F. (1990).** Molecular characterization of *pmbA*, an *Escherichia coli* Chromosomal gene required for the production of the antibiotic peptide MccB17. *Mol Microbiol.* **4**(11): 1921-1932.
- Romano A., Saier M. (1992).** Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. Section I. Physiological and organismic considerations. Pp 143-170. In R. P. Mortlock (ed). *Evolution of metabolic function.* CRC. Press Inc., Boca Raton, Fla.
- Sadoff H, L. (1975).** Encystment and Germinación in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* **39**:516-539.
- Salehizadeh H., Van LossDrecht M. C. M. (2004).** Producción de polyhydroxyalcanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advance.* **22**:261-279.
- Seebach D., Brunner A., Bürger H. M., Reusch R. N. y Bramble L. L. (1996).** Channel-Forming activity of 3-hydroxybutanoic-acid in planar lipid bilayer. *Helv. Chim. Acta.* **79**: 507-517.
- Senior P. J., Dawes E. A. (1971).** Poly- β -Hydroxybutyrate biosynthesis and regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**:55-66.
- Segura D., Espín G. (1998).** Mutational Inactivation of Gene Homologous to *Escherichia coli ptsP* Affects Poly-(3)-Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation. *J. Bac.* **180**(18): 4790-4798.
- Segura D., Espín G. (2000).** Caracterización de locis involucrados en la síntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii*. Comunicación personal. Departamento de Microbiología Molecular. Instituto de Biotecnología UNAM. Ave Universidad 2002. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos Mex.
- Segura D., Espín G. (2004).** Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strain impaired in poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Arch. Microbiol.* **179**:437-443.
- Schiembri M., Bayly R., Davis J. (1995).** Degradation of poly-(3-hydroxyoctanoic acid [P(3HO)]) by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1220.
- Schulz S., Toft S. (1993).** Identification of a Sex Pheromone from a Spider. *Science.* **260**:1635-1637.
- Seniors P. J., Dawes E. A. (1973).** The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**: 225-238.
- Sielbold C., Flukiger K., Beutler R., Erni B. (2001).** Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett* **2001**. **504**: 104-111.
- Steinbüchel A., Fuchtenbusch B. (1998).** Bacterial and other biological systems for polyester production. *TIB TECH.* **16**:419-427.
- Steinbüchel A., Schlegel H. G. (1991).** Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxybutyric acid) shynthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **5**:
- Stülke J., Hillen W. (2000).** Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 849-880.
- Sun J., Peng x., Van Impe J., Vanderleyden J. (2000).** The *ntxB* y *ntxC* Genes envolved in the Regulation of Poly-3-hydroxybutyrate Biosynthesis by *Ammonia* in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriology.* **66**:1 113-117.
- Tchieu J., Norris V., Edwards J., Saier M. (2001).** The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol.* **3**: 329-346.
- Tigemeyer F., Hillen W. (2002).** Global control sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek.* **82**:59-71.
- Timm A., Steinbüchel A. (1992).** Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* **209**: 15-30.
- Tobisch S., Zühlke D., Bernhardt J., Stlke J., Hecker M. (1999).** Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 6996-7004.
- Toukadarian A., Kennedy C. (1986).** Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntn* and *glnA* genes and constrution of *ntn* mutants. *EMBO J.* **5**:399-407.
- Turinsky A., Moir-Blais T., Grundy F.,Henkin T. (2000).** Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J. Bacteriol.* **181**: 6996-7004.
- Valentin H. E., Dennid D. (1996).** Metabolic phatway from poly(3hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia coralline*: Inactivation de *mutB* bye chromosomal integration of a kanamicin resistance gene. *Appl. Enviromen. Microbiol.* **62**:372-379.
- Waener J. B., Lolkema J. S. (2003).** A Crh specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**:277-280-
- Williams M. R., Anderson A. J. Dawes E. A., Ewing D. F. (1994).** Production of co-polyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid bye *Rhodococcus rubber* biosynthetic considerations. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* **40**:717-713.
- Wray L., Pettengil F., Fisher S. (1994).** Catabolic repression of *Bacillus subtilis hut* operon requires a cis-acting site located downstream of transcription initiation site. *J. Bacteriol.* **176**: 1894-1902.

Yuan W., Jia Y., Snell K. D., Muh U., Sinskey A. J., Lambalot R. H. Walsh C. T. Stubbe J. (2001). Class I and III polyhydroxialkanoates synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*, characterization and substrate specificity studies. Arch. Biochem. Biophys. **394**:87-98.

Zinn M. (1998). Dual (C, N) Nutrient limited growth of *Pseudomonas aelovorans*. PH Thesis ETH. Zurich. Switzerland.

Zinn M., Witholt B., Egli T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv. Drug. Rev. **53**:5-21.

XI.-Abreviaturas

- AckA**.- Enzima acetato cinasa.
- AMP_c**.- Adenil Monofosfato Cíclico.
- ADN**.- Ácido desoxirribonucleico.
- ARN**.- Ácido ribonucleico.
- ARNm**.- Ácido ribonucleico mensajero.
- ARNr**.- Ácido ribonucleico ribosómico.
- ATCC**.-
- BglF**.- β-glucósido F. Proteína que tiene tres dominios II del sistema PTS (IIA,IIB y IIC).
- BglG**.- β-glucósido G. Proteína que funciona como un antiterminador de la transcripción que regula los genes que participan en el metabolismo de β-glucósidos.
- C_(n)**.- Cadena de un número determinado de carbonos.
- CcpA**.- Del ingles: Catabolic Control Protein A.
- ccr**.- Gen que codifica para la enzima I^{Glc}.
- CoA**.- Coenzima A.
- cre**.- Del inglés: catabolite responsive element (elemento de respuesta al catabolito).
- Crh**.- Del inglés: catabolite represión HPr-like protein (proteína semejante a Hpr que participa en la represión por catabolito)
- CRP**.- Catabolite Regulator Protein (Proteína reguladora por catabolito)
- C-ter**.- Carboxilo terminal.
- EI**.- Enzima I.
- EI^{Ntr}**.- Primera enzima del sistema PTS^{Ntr}.
- FrwB**.- Proteína que forma parte del sistema PTS-IIB^{Frw}.
- FrwC**.- Proteína que forma parte del sistema PTS-IIC^{Frw}.
- FrwD**.- Proteína que forma parte del sistema PTS-IID^{Frw}.
- FryA**.- Proteína EI^{Fry} que forma parte del sistema PTS-Fry, cuya función no ha sido probada.
- Hpr**.- Del Ingles: Histidine protein. Segunda enzima del sistema PTS^{Glc}.
- HprK/P**.- Del ingles: Histidine phosphate regulatory kinase/phosphatase.
- IIA^{Ntr}**.- Tercera enzima del sistema PTS^{Ntr}.
- IIB**.- Enzima IIB del sistema PTS.
- IIC**.- Enzima IIC del sistema PTS.
- Kb**.- Kilobases.
- Kg**.- kilogramo.
- LDL**.- Del ingles: Lower Density Lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).
- LuzR**.- Activador transcripcional del sistema del "corum sensing".
- manXYZ**.- Operón que participa en el metabolismo de manosa.
- miniTn5::lacZ**.- Tn5 modificado, de menor tamaño y lleva una fusión del gen reportero β-galactosidasa.
- Mlc**.- Represor transcripcional del sistema PTS^{Glu}.
- mM**.- Milimolar.
- NAD**.- Del ingles: Nicotin Adenin Dinucleotido.
- NADP**.- Del ingles: Nicotin Adenin Dinucleotid Phosphate.
- NBDs**.- Del ingles: Nucleotid Baining Domains (dominios de unión a secuencia de nucleótidos).
- NifA**.- Nitrogen Fixation A. Regulador transcripcional de acción positiva sobre los genes de fijación de nitrógeno.
- Npr**.- Segunda enzima del sistema PTS^{Ntr}.
- NR_I**.- Nitrogen Regulator I (regulador del nitrógeno I). Factor de transcripción que regula positivamente en un estado fosforilado a los genes necesarios para la asimilación del nitrógeno.
- NR_{II}**.- Nitrogen Regulator II (regulador del nitrógeno I). Proteína cinasa/fosfatasa de NR_I.
- N-terminal**.- Amino-terminal.
- ORF**.- Del ingles Open Reading Frame (fragmento de lectura abierta) ó región del ARNm que codifica para la proteína.
- P(3HB)**.- Poli-3hidroxibutirato.
- P(HB-HV)**.- Copolimero de Poli-hidroxibutirato-hidroxivalerato
- Pb**.- Pares de bases de ADN.
- PEP-PTS**.- Sistema de transporte y fosforilación de azúcares dependientes de fosfoenolpiruvato.
- PhaE**.- Subunidad de la PHAs sintasa.
- PhaF**.- Regulador transcripcional que participa en la síntesis de PHAs.
- PhaJ**.- Enzima enoil-CoA hidratasa.
- PhaP**.- Fasina. Proteína que regula la estructura, tamaño del gránulo de los PHAs.
- PhaR**.- Subunidad regulatoria de la PHA sintasa tipo III de *B. megaterium*.
- PHAs (scc)**.- Polihidroxialcanotatos de cadena corta.
- PHAs (smc)**.- Polihidroxialcanoatos de cadena media.
- PHAs**.- Poli-hidroxialcanoatos.
- PhaZ**.- Depolimerasa intracelular de PHAs.
- PHB**.- Poli-hidroxibutirato.
- phbA**.- Gen que codifica para la enzima CoA reductasa.
- phbB**.- Gen que codifica para enzima β-cetiolasa.
- phbC**.- Gen que codifica para la enzima PHB sintasa.
- PHV**.- Polihidroxivalerato
- PRDs**.- Del inglés: PTS Regulated Domains (dominios regulados por PTS).
- PtsG**.- Proteína IIB^{Glu}.
- ptsI**.- Gen que codifica para la enzima I^{Glu} del sistema PTS.
- ptsN**.- Gen que codifica para la enzima IIA^{Ntr}.
- PTS^{Ntr}**.- Sistema de de fosfotransferasa relacionado al nitrógeno.
- ptsO**.- Gen que codifica para la enzima Npr.
- ptsP**.- Gen que codifica para la enzima I^{Ntr}.
- RpoN**.- Factor sigma del nitrógeno.
- rpoS**.- Gen que codifica para el factor sigma (σS).
- S1 yS2**.- Del ingles: sugar transport (transportadores de azúcares en bacterias)
- Tn5**.- Transposón 5.
- TPr**.- Proteína HPr^{Fry} que forma parte del sistema PTS-Fry, cuya función no ha sido probada.
- Xpr**.- Proteína paróloga de Hpr que se encuentra en algunas bacterias Gram-negativas.
- μM**.- Micromolar.
- 3HV**.- 3-hidroxivalerato.