



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL  
Y POST-TRANSCRIPCIONAL DEL OPERON *phbBAC*  
Y DEL GEN *phbR* EN *Azotobacter vinelandii*

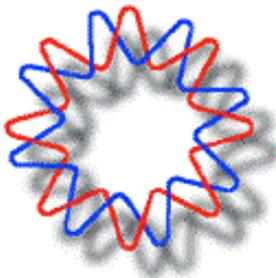
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A:

JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ ELIGIO



Tutor: DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

CUERNAVACA, MOR.

Enero 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO  
DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE  
BIOTECNOLOGÍA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ELDA  
GUADALUPE ESPÍN OCAMPO**

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, que siempre cifraron su confianza y apoyo en mi.

A mi querida esposa Ali.

A mis hermanos.

*“Te elogiaré porque de manera que inspira temor estoy maravillosamente hecho. Tus obras son maravillosas, como bien percibe mi alma” (Salmo 139:14).*

## AGRADECIMIENTOS

Le expreso mi sincero y total agradecimiento a mi jefa, la Dra. Guadalupe Espín, por su completo apoyo en mi formación académica y personal.

A mi comité tutorial integrado por los Drs., Juan Miranda Ríos, David Romero Camarena y Guadalupe Espín, por sus valiosas sugerencias e ideas aportadas durante el desarrollo de este trabajo.

A mi jurado integrado por los Drs.: Ernesto Pérez Rueda, Rosa María Gutiérrez, Claudia Martínez Anaya, Alejandro García de los Santos, Isabel López Lara y Roberto Carlos Muñoz Garay. Gracias por su revisión y discusión a este trabajo.

A Soledad Moreno, no solo por ayudarme a planear y realizar los experimentos; sino también por ser una fuente de estímulo.

Al Drs., Daniel Segura, Cinthia Núñez y Miguel Castañeda, por sus enseñanzas y su amistad. A Josefina Guzmán, por aportar su experiencia experimental y personal.

A mis compañeros de laboratorio: Yanet, Miguel Cocotl, Miguel Mejía, Mildred, Luis Felipe, Elva, Armando, Libertad, Deborah, Pablo, Cosme, Claudia, Adán y Ramses, por hacer mas ligera y divertida la estancia en el laboratorio.

Al Dr. Víctor Bustamante y a Luary Martínez, por su cariño y amistad.

A los Merinos: Enrique, Cristian, Mario, Zuemy, Viri, María Luisa y José Luis.

A la unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Este trabajo se financio con los proyectos IN222809-2, IT209411-3 y IN221809 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

## CONTENIDO

	Página
Resumen	1
<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b>	
1.1 Los polihidroxicanoatos	2
1.2 Ruta biosintética de PHB y su regulación a nivel enzimático	3
1.3 Operones de la biosíntesis de PHBs	4
<b>CAPÍTULO 2. Antecedentes</b>	
2.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
2.2 Función biológica del PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
2.3 Organización de los genes que participan en la biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	6
2.4 Sistema de dos componentes GacA/GacS y el factor RpoS	9
2.5 PhbR y la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS	12
2.6 Sistema CsrA/CsrB (RsmA/RsmZ)	13
2.7 Regulación de los RNAs regulatorios por el sistema de dos componentes	14
<b>CAPÍTULO 3. Efecto de los reguladores RpoS, PhbR, GacA y RsmA/RsmZ sobre la biosíntesis de PHB</b>	
3.1 Efecto de RpoS sobre la biosíntesis de PHB	15
3.2 PhbR y su papel en la biosíntesis de PHB	15
3.3 El sistema GacA/GacS y la biosíntesis de PHB	15

3.4 El sistema Csr (RsmA/RsmZ) en <i>A. vinelandii</i>	16
<b>CAPÍTULO 4. Hipótesis</b>	18
<b>CAPÍTULO 5. Objetivos generales</b>	19
<b>CAPÍTULO 6. Resultados y Discusión</b>	
<b>Parte I. Regulación transcripcional del gen <i>phbR</i> y del operón <i>phbBAC</i></b>	
6.1 Efecto de los reguladores PhbR y RpoS sobre la síntesis de PHB	20
6.2 Cuantificación de la expresión de <i>phbR</i> , <i>phbB</i> y <i>rpoS</i> en diferentes fases de crecimiento	21
6.3 Regulación transcripcional del gen <i>phbR</i> por RpoS y PhbR	22
6.4 Regulación transcripcional del operón <i>phbBAC</i> por RpoS y PhbR	24
6.5 PhbR activa la expresión de <i>phbB</i> de manera directa	26
6.6 Secuencias de unión a PhbR en la región promotora de <i>phbB</i>	29
6.7 Sitios de unión de PhbR en <i>A. vinelandii</i> y su posible localización en otras bacterias relacionadas	31
6.8 Búsqueda de consenso para RpoS en los promotores de <i>phbR</i> y <i>phbB</i> en <i>A. vinelandii</i>	33
6.7 Modelo de regulación transcripcional del gen <i>phbR</i> y del operón <i>phbBAC</i> por RpoS y PhbR	46

## **CAPÍTULO 7. Resultados y Discusión**

### **Parte II Regulación post-transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC***

7.1 Efecto de las mutaciones en el sistema “Rsm” en la producción de PHB	37
7.2 La expresión de <i>phbR</i> y <i>phbB</i> se afecta en las mutantes <i>rsmA</i> - y <i>rsmZ1</i> -	38
7.3 Diseño y construcción de fusiones génicas	40
7.4 El sistema Rsm controla post-transcripcionalmente la expresión del gen <i>phbR</i>	41
7.5 <i>phbB</i> es regulado a nivel transcripcional por el sistema Rsm a través de PhbR	43
7.6 Búsqueda de posibles sitios de pegado de RsmA sobre <i>phbR</i> y <i>phbB</i> , y análisis de plegamiento de RNAm mediante el programa Mfold	45
7.7 Experimentos de interacción <i>invitro</i> RNA-proteína y EMSA	48
7.8 Análisis de la estabilidad del RNAm de <i>phbR</i> y <i>phbB</i>	51
7.9 Fenotipo de la doble mutante <i>rsmA</i> -/ <i>gacA</i> -	53
7.10 Posible vía alterna de regulación controlada por GacS/GacA	54
7.11 Modelo de regulación post-transcripcional del gen <i>phbR</i> y del operón <i>phbBAC</i> mediada por el sistema GacA/Rsm	59
<b>CAPÍTULO 8. Conclusiones</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 9. Perspectivas</b>	<b>61</b>

**ANEXO 1**

Artículo publicado

**ANEXO 2**

Manuscrito del segundo artículo

## ÍNDICE FIGURAS

### CONTENIDO FIGURAS

	Página
Fig. 1. Productos elaborados a partir de los PHA's.	2
Fig. 2. Ruta biosintética de PHB.	3
Fig. 3. Organización génica de los diferentes operones de la biosíntesis de PHB en distintas bacterias..	5
Fig. 4. Ciclo de vida de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	6
Fig. 5. Región intergénica <i>phbR-phbB</i> en <i>A. vinelandii</i> .	8
Fig. 6. El sistema de dos componentes GacS/GacA en <i>A. vinelandii</i> .	10
Fig. 7. Comparación de secuencias reconocidas y transcritas por RpoD y RpoS.	11
Fig. 8. Modelo de regulación post-transcripcional mediado por el sistema CsrA/CrsB de <i>E. coli</i> .	13
Fig. 9. Modelo de regulación post-transcripcional del gen <i>algD</i> en <i>A. vinelandii</i> .	17
Fig. 10. Modelo hipotético de regulación transcripcional y post-transcripcional del operón <i>phbBAC</i> y del gen <i>phbR</i> .	19
Fig. 11. Fenotipo de opacidad (producción de PHB) de las cepas silvestre (UW136), <i>phbR</i> -, <i>rpoS</i> , <i>phbR</i> -/ <i>phbR</i> +, <i>rpoS</i> -/ <i>rpoS</i> +	20
Fig. 12. Expresión de los genes <i>phbR</i> , <i>phbB</i> y <i>rpoS</i> en la cepa UW136.	21
Fig. 13. Expresión del gen <i>phbR</i> en fase estacionaria.	23

## ÍNDICE FIGURAS

Fig. 14. Crecimiento (a) y actividad de $\beta$ -glucoronidasa (b).	23
Fig. 15. Expresión del gen <i>phbB</i> en fase estacionaria.	24
Fig. 16. Crecimiento (a) y actividad de $\beta$ -glucoronidasa (b).	25
Fig. 17. Región intergénica <i>phbR-phbBAC</i> (500 pb).	27
Fig. 18. Ensayo de retardo de la movilidad en gel EMSA de la región intergénica <i>phbR-phbB</i> .	27
Fig. 19. Ensayo de retardo de la movilidad en gel EMSA del Fragmento F2.	28
Fig. 20. Ensayo de protección a nucleasa de la región reguladora de <i>phbB</i> .	30
Fig. 21. Secuencia reguladora de <i>phbB</i> .	31
Fig. 22. Sitios de unión de PhbR en <i>A. vinelandii</i> , <i>Azotobacter</i> sp. FA-8 y <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3.	32
Fig. 23. Alineamiento de los sitios R1 y R2 de <i>A. vinelandii</i> con R1 y R2 de <i>Azotobacter</i> sp. FA-8 y <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3.	33
Fig. 24. Comparación del consenso de promotores dependientes de RpoD y RpoS con los promotores de <i>phbR</i> .	34
Fig. 25. Comparación del consenso de promotores dependientes de RpoD y RpoS con los promotores de <i>phbB</i> .	35
Fig. 26. Modelo de regulación transcripcional del gen <i>phbR</i> y del operón <i>phbBAC</i> en <i>A. vinelandii</i> .	36
Fig. 27. Fenotipo de opacidad de la cepa silvestre y mutantes <i>rsmA</i> -, <i>rsmZ1</i> - y <i>gacA</i> -.	37
Fig. 28. Cuantificación de la expresión de <i>phbR</i> (a) y <i>phbB</i> (b).	38

## ÍNDICE FIGURAS

Fig. 29. Representación esquemática de fusiones génicas con el gen reportero <i>gusA</i> .	40
Fig. 30. Fusión transcripcional $p_R1-2::gusA$ .	41
Fig. 31. Fusión traduccional <i>phbR-gusA</i> .	42
Fig. 32. Fusión transcripcional $p_B1-2::gusA$ .	43
Fig. 33. Fusión traduccional <i>phbB-gusA</i> .	44
Fig. 34. Posibles sitios de pegado de RsmA en la región líder de <i>phbR</i> (a) y <i>phbB</i> (b).	46
Fig. 35. Posibles estructuras secundarias de los RNAs líderes de <i>phbB</i> y de <i>phbR</i> .	47
Fig. 36. Ensayo de retardo de la movilidad en gel (EMSA) del líder de <i>phbR</i> .	49
Fig. 37. Ensayo de retardo de la movilidad en gel (EMSA) del líder de <i>phbB</i> .	50
Fig. 38. Estabilidad del RNAm de <i>phbR</i> (a) y <i>phbB</i> (b).	52
Fig. 39. Fenotipo de opacidad de la cepa doble mutante <i>rsmA-/gacA-</i> .	54
Fig. 40. Patrón de reconocimiento de la proteína GacA en <i>A. vinelandii</i> .	55
Fig. 41. Expresión relativa del gen <i>Avin08930</i> en la UW136 y <i>gacA-</i> .	56
Fig. 42. Fenotipo de opacidad en las cepas UW136, <i>gacA-</i> , <i>Avin08930-</i> , <i>Avin08960-</i> y <i>Avin08930-/Avin08960-</i> .	57
Fig. 43. Modelo de regulación post-transcripcional del gen <i>phbR</i> y del operón <i>phbBAC</i> en <i>A. vinelandii</i> .	59

## ÍNDICE TABLAS

### CONTENIDO TABLAS

	Página
Tabla 1. Producción de PHB en las cepas mutantes <i>rpoS</i> -, <i>phbR</i> , <i>rpoS</i> -/ <i>phbR</i> - y complementadas.	20
Tabla 2. Producción de PHB en las cepas mutantes del sistem Rsm	37

## RESUMEN

Los poli-hidroxicanoatos (PHAs) son una familia de polímeros sintetizado por una gran gama de microorganismos y son utilizados para sintetizar plásticos que son biodegradables, biocompatibles y no causan toxicidad. Uno de los PHAs mejor caracterizado es el poli-hidroxibutirato (PHB), el cual es producido por *Azotobacter vinelandii* principalmente en fase estacionaria. La síntesis de PHB en *A. vinelandii*, se da a partir de tres reacciones enzimáticas; las cuales, son llevadas a cabo por 3 enzimas que están codificadas en el operón *phbBAC*. El operón *phbBAC* es transcrito a partir de dos promotores sobrepuestos; río arriba y de manera divergente se encuentra el gen *phbR*, el cual codifica para un regulador del operón *phbBAC*. El sistema de dos componentes GacS/GacA activa la expresión de 2 RNAs regulatorios pertenecientes al sistema Rsm (RsmZ y RsmY), los cuales titulan a la proteína de unión a RNA RsmA. En años recientes, en este laboratorio y en *Azotobacter vinelandii* se encontró que mutaciones en los genes *phbR*, *rpoS* y *gacA* afectan de manera negativa la producción de PHB. En el presente trabajo se estudió la participación de los reguladores PhbR, RpoS y GacA en la producción de PHB, encontrando que:

- a) La expresión de los genes *phbB* y *phbR* se incrementa considerablemente en fase estacionaria.
- b) El gen *phbR* necesita del factor sigma RpoS, para su expresión en fase estacionaria.
- c) RpoS también activa la expresión de *phbB* en fase estacionaria.
- d) PhbR regula su propia expresión de manera positiva (autoactivador), aunque se desconoce si sea de manera directa.
- e) PhbR activa la expresión de *phbB* de manera directa, al posicionarse en las secuencias directo repetidas TGTCACCAA-N4-CACTA, localizadas en la región promotora del operón *phbBAC*.
- f) La inactivación en el gen *gacA*, afecta de manera negativa la cantidad de transcrito de *phbR* y *phbB*.
- g) GacA controla post-transcripcionalmente la expresión de *phbR* y *phbB*, a través del sistema Rsm.
- h) La proteína RsmA, se une a los RNAm de *phbR* y *phbB*, provocando su degradación.

Esos resultados, nos llevan a proponer dos modos de regulación. El primero a nivel transcripcional, donde PhbR y RpoS activan la expresión del gen *phbR* y del operón *phbBAC*. Y, el segundo a nivel post-transcripcional, donde el regulador de respuesta GacA activa la expresión de los RNA regulatorios (RsmZ y RsmY) que secuestran a la proteína RsmA, eliminando el efecto negativo que ejerce RsmA sobre los RNAm de *phbR* y *phbB*.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Los polihidroxicanoatos

Los poli-hidroxicanoatos (PHAs) son una familia de biopolímeros ampliamente distribuidos y sintetizados por una gran gama de géneros bacterianos y algunos miembros de la familia *Halobacteriaceae* de las Arqueas (Steinbuchel and Fuchtenbusch, 1998). Estos polímeros son sintetizados en exceso de carbono y limitación de nutrientes, acumulados en forma de gránulos intracelulares y utilizados como fuente de reserva por diversos microorganismos (Williams *et al.*, 1999, Zinn *et al.*, 2001).

El poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es el biopolímero mejor caracterizado de la familia de polihidroxicanoatos (PHA's), formado por monómeros repetidos de  $\beta$ -hidroxibutirato (CH-(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CO-O). El PHB es insoluble en agua, altamente cristalino y brillante con propiedades similares al propileno. Los PHAs se emplean para sintetizar plásticos que son biodegradables, biocompatibles y no causan toxicidad; por estas características estos compuestos se han utilizado para generar gran cantidad de productos de uso médico (Saad *et al.*, 1999; Zinn *et al.*, 2001). Se usan en suturas de cirugías, implantes, elaboración de material quirúrgico, liberación controlada de medicamentos (drogas, hormonas), ingeniería de tejidos e injertos vasculares (Williams *et al.*, 1999, Zinn *et al.*, 2001) (Fig. 1a).

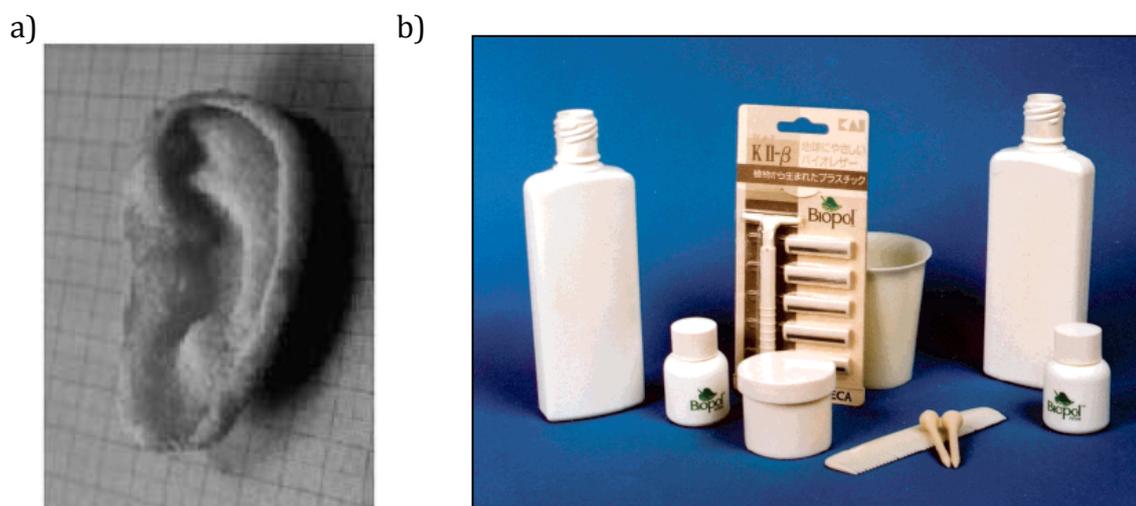


Fig. 1. Productos elaborados a partir de los PHAs. a) Implante hecho de PHA (imagen tomada de Chen and Wu, 2005). b) Material de empaquetamiento hecho de PHB (imagen tomada de Lenz and Marchessault, 2005).

El PHB es utilizado a nivel industrial en la elaboración de envases para cosméticos, aceite de motores, productos para el cuidado del cabello, rastrillos desechables y plásticos para la envoltura de alimentos (Madison y Huisman, 1999; Van der Walle *et al.*, 2001) (Fig. 1b).

## 1.2 Ruta biosintética de PHB y su regulación a nivel enzimático

En bacterias que producen PHB como *Ralstonia eutropha* y *Azotobacter sp.*, la biosíntesis de este polímero se lleva a cabo como una desviación del metabolismo central, unido a la acetil-CoA, que en lugar de catalizarse en el ciclo de Krebs se utiliza en la síntesis de PHB en tres etapas enzimáticas. La primera reacción se da por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, la cual es catalizada por la enzima  $\beta$ -cetotiolasa, obteniéndose como producto acetoacetil-CoA (Ritchie y Dawes, 1969). En el segundo paso enzimático, la acetoacetil-CoA es reducida por la acetoacetil-CoA reductasa, utilizando NADPH y produciéndose D- $\beta$ -hidroxibutiril-CoA, que es polimerizada por la PHB sintasa (Ritchie and Dawes, 1969) (Fig. 2).

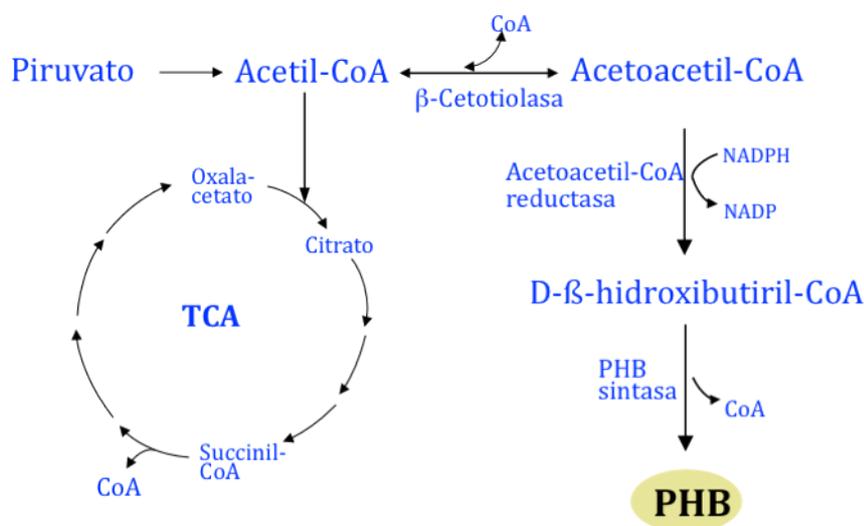


Fig. 2. Ruta biosintética de PHB.

Por estudios realizados en *Azotobacter vinelandii* y en *Azotobacter beijerinckii* se conoce que existe un control de la síntesis de PHB a nivel enzimático, controlando alostéricamente las enzimas de la vía de biosíntesis de PHB (Senior *et al.*, 1972). Un punto de control importante es la actividad de la enzima  $\beta$ -cetotiolasa. La  $\beta$ -cetotiolasa es activada cuando la relación acetil-CoA/CoA es alta, situación que se

puede dar cuando se acumula NADH o NADPH como respuesta a la baja concentración de oxígeno en el medio. Como NADH o NADPH inhiben las enzimas del ciclo de Krebs citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, se disminuye el flujo de carbono hacia este ciclo, lo que genera un incremento de la relación acetil-CoA/CoA y por lo tanto la estimulación de la actividad de  $\beta$ -cetotiolasa (Senior *et al.*, 1972). Estas condiciones también favorecen la actividad de la enzima que cataliza el segundo paso de la vía, la acetoacetil-CoA reductasa.

Otro ejemplo de la producción de PHB y su regulación a nivel enzimático, es a través del funcionamiento del ciclo de Krebs (TCA) mediante la inactivación del gen *pycA*. El gen *pycA* codifica para la enzima piruvato carboxilasa, la cual es una enzima que provee de oxalacetato al ciclo de Krebs. La inactivación de *pycA*, provoca que no se provea de oxaloacetato, disminuyendo la actividad del ciclo de Krebs, lo que resulta en un aumento en la disponibilidad de acetil-CoA y en la producción de PHB (Segura and Espin, 2004).

### 1.3 Operones de la biosíntesis de PHBs

En varias de las especies bacterianas productoras de PHB, los genes relacionados con la biosíntesis de estos polímeros se encuentran organizados en operones; por ejemplo, en *Pseudomonas* sp. 61-3, *Azotobacter* FA8 y *A. vinelandii* (operón *phbBAC*) (Peralta-Gil, 2004). Por otro lado, en bacterias como *R. eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Burkholderia cepacia* y *Acetivobacter* sp., los genes también se encuentran en operones, pero su organización dentro del operón cambia con respecto a *Pseudomonas* sp y *A. vinelandii* (Madison and Huisman, 1999; Maehara *et al.*, 2002; Rehm and Steinbuchel, 1999) (Fig. 3).

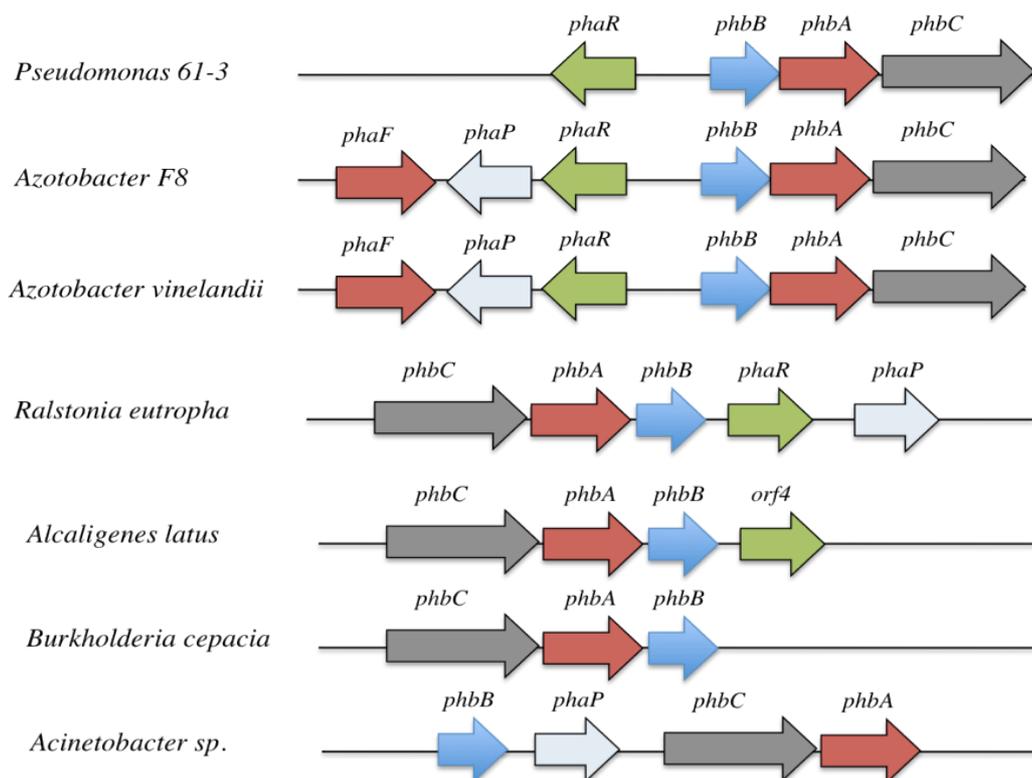


Fig. 3. Organización genética de los diferentes operones de la biosíntesis de PHB en distintas bacterias.

Los genes localizados en los operones de la biosíntesis de PHAs, codifican proteínas con diferentes funciones en la producción y acumulación de estos polímeros. La biosíntesis de PHB es iniciada por la enzima  $\beta$ -cetotilasa (codificada por el gen *phbA*), seguido por la actividad de la acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y terminada por la PHA sintasa (*phbC*). En algunas bacterias, como *Methylobacterium extorquens*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhodobacter sphaeroides* el gen *phbC* se encuentra separado del operón biosintético de PHA's, mientras que en bacterias como *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp 61-3* y *Pseudomonas aeruginosa* se ha determinado la existencia de dos sintasas (*phbC1* y *phbC2*) y una depolimerasa intracelular (*phaZ*) (Madison and Huisman, 1999; Maehara *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2002; Matsusaki *et al.*, 1998).

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* es una  $\gamma$ -proteobacteria, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. *A. vinelandii* es Gram negativa, de vida libre, que se mueve mediante flagelos peritricos, es aerobia obligada, fijadora de nitrógeno y puede tener múltiples copias de su cromosoma; en su ciclo de vida desarrolla un proceso de diferenciación por el cual forma quistes resistentes a la desecación (Sadoff, 1975) (Fig. 4). Desde el punto de vista biotecnológico, *A. vinelandii* es una bacteria interesante por su capacidad de producir dos polímeros de importancia comercial, el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB poliéster intracelular) y el alginato (polisacárido extracelular).

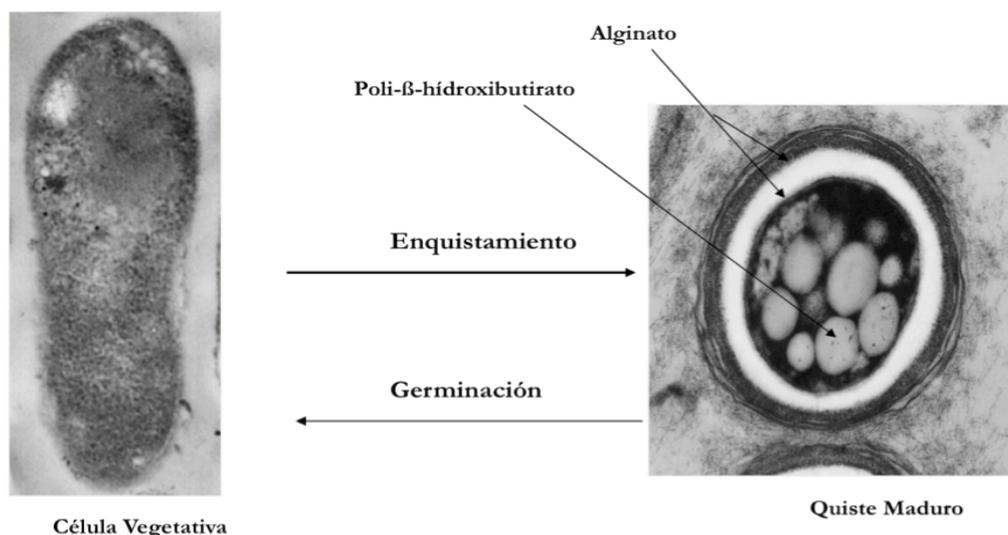


Fig. 4. Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*.

### 2.2 Función biológica del PHB en *Azotobacter vinelandii*

Son varias las funciones que se le atribuyen al PHB, la principal es de constituir un material de reserva de carbono y energía que puede ser utilizado en periodos de limitación de nutrientes en el medio, ya que este polímero almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Otra de las funciones que se le atribuyen al PHB en *A. vinelandii* está relacionada con la fijación biológica de nitrógeno, específicamente con la protección de la nitrogenasa ya que se propone que el PHB permite la protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono

exógena, al proveer a la célula de una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, permitiendo mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno contribuyendo así a la protección de la nitrogenasa (Segura and Espín, 1998; Senior *et al.*, 1972). Otro papel propuesto para el PHB es el de modulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno y existe una concentración de carbono alta, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. En *A. vinelandii*, la acumulación de NADH y NADPH inhibe varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs, y en estas condiciones se estimula la síntesis de PHB (Senior *et al.*, 1972). Por último, la síntesis de PHB está involucrada en el proceso de diferenciación celular, por ejemplo en algunas especies del género *Bacillus*, la acumulación de PHB sirve como fuente de carbono y energía para la formación de esporas, aunque la acumulación no es un prerrequisito para la esporulación (Anderson y Dawes; 1990). En *A. vinelandii* el metabolismo de PHB está íntimamente relacionado con el proceso de diferenciación que da como resultado la formación de quistes resistentes a la desecación, ya que los quistes contienen granulos de PHB; sin embargo, al igual que en *Bacillus*, el PHB no es indispensable para la formación de quistes resistentes a la desecación (Segura *et al.*, 2003).

### **2.3 Organización de los genes que participan en la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii***

Los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* codifican para las enzimas que participan en la ruta biosintética de PHB. Estos genes se encuentran organizados en una unidad transcripcional (*phbBAC*) que se transcribe a partir de dos promotores sobrepuestos  $p_{B1}$  y  $p_{B2}$ , los cuales se localizan 92 y 115 nucleótidos, respectivamente, del codón de inicio de la traducción. El sitio -10 del promotor  $p_{B2}$  sobrelapa el sitio -35 del promotor  $p_{B1}$ . Un análisis entre los dos promotores del operón *phbBAC* contra las secuencias consenso de *E. coli*, muestra que la secuencia del sitio -10 de  $p_{B1}$  y  $p_{B2}$  (GAGAAT y CTATCCT, respectivamente), presentan secuencias cercanas al consenso de  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^S$  respectivamente; el análisis también mostró, que las secuencias -35 de ambos promotores están poco conservadas (Fig. 5) (Peralta-Gil, 2004).

Hacia arriba del operón *phbBAC* y de manera divergente se encuentra el gen *phbR* que codifica para la proteína PhbR, la cual pertenece a la familia de activadores

transcripcionales AraC/XylS. El gen *phbR* se transcribe a partir de dos posibles promotores  $p_{R1}$  y  $p_{R2}$ , localizados 61 y 139 nucleótidos antes del codón de inicio de la traducción. El análisis de los posibles promotores muestra que la secuencia del sitio -10 del promotor  $p_{R1}$  (TAGAAT) está muy conservada en promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  en *E. coli*, mientras que la secuencia del sitio -10 del promotor  $p_{R2}$  tiene similitud de un promotor -10 extendido, cuya característica principal es el motivo TGTTG en las posiciones -15 a -18. Por último, las secuencias de los sitios -35 de ambos promotores se encuentra poco conservada (Peralta-Gil, 2004) (Fig. 5).

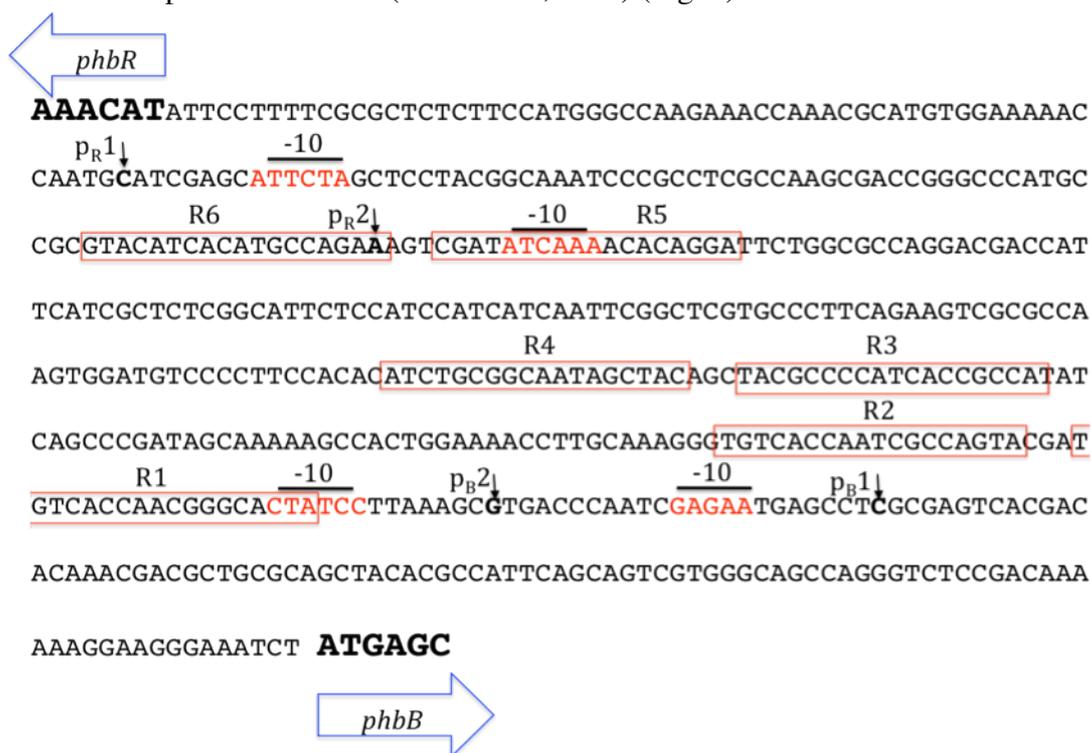


Fig. 5. Región intergénica *phbR-phbB* en *A. vinelandii*.  $p_{B1}$ ,  $p_{B2}$ ,  $p_{R1}$  y  $p_{R2}$  son los inicios de transcripción, y los nucleótidos marcados como -10 señalan los promotores. Las secuencias enmarcadas con un rectángulo muestran los posibles sitios de unión de PhbR (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

Río arriba del inicio de la traducción del operón *phbBAC* existen dos secuencias idénticas de 18 pb llamadas R1 y R2, centradas en las posiciones -134 y -155 respectivamente (5'-TGTCACCAAnnnnCANTA-3'). R1 y R2 se encuentran separadas por tres nucleótidos; R1 sobrelapa el -10 del promotor  $p_{B2}$ . Dado que estos sitios presentan características similares a las regiones reconocidas de los activadores transcripcionales de la familia AraC/XylS, se propone que R1 y R2 sean los sitios de unión a PhbR. Adicionalmente a los sitios R1 y R2, en la región intergénica *phbR-*

*phbBAC* de *A. vinelandii* se localizan otros 4 posibles sitios de 18 pares de bases menos conservados, los cuales son llamados R3 (-217), R4 (-239), R5(-361) y R6(-382) (Fig. 5) (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

#### **2.4 Sistema de dos componentes GacA/GacS y el factor RpoS**

El sistema GacA/GacS es un sistema de dos componentes utilizado por una gran variedad de bacterias para percibir y responder las diferentes condiciones ambientales. Este sistema de regulación global está formado por las proteínas GacS y GacA, donde la primera es una proteína detectora transmembranal perteneciente a la familia de histidín-cinasas y la segunda es el regulador de respuesta citoplasmático que por lo general es un activador transcripcional (Beijsmann and Groisman, 2003; Hellingwer *et al.*, 1995; Stock *et al.*, 2000).

Alineamientos de GacS de *A. vinelandii* con el banco de datos muestran que esta proteína en la región N-terminal presenta los dominios HAMP y de histidín cinasa; donde el primer dominio tiene un posible papel sensorial y regulatorio de la fosforilación, mientras que el segundo dominio participa en la autofosforilación en un residuo de histidina. En la región C-terminal contiene 3 dominios, 2 de los cuales son dominios de respuesta y el último es un dominio de fosfotransferasa (Castañeda *et al.*, 2000).

Por otro lado, los alineamientos de la proteína GacA de *A. vinelandii* revelan que esta proteína presenta un dominio de regulador de respuesta en la región N-terminal y un dominio de unión a DNA (HTH) en la región C-terminal (Castañeda *et al.*, 2001). En *A. vinelandii* el sistema GacA/GacS regula positivamente la producción de alginato y PHB; este sistema de dos componentes, también controla la expresión del gen *rpoS* que codifica para el factor RpoS en las cepas productoras de alginato ATCC9046 y AEIV, pero no así en la cepa no productora de alginato UW136 (Castañeda *et al.*, 2000 y 2001) (Fig. 6).

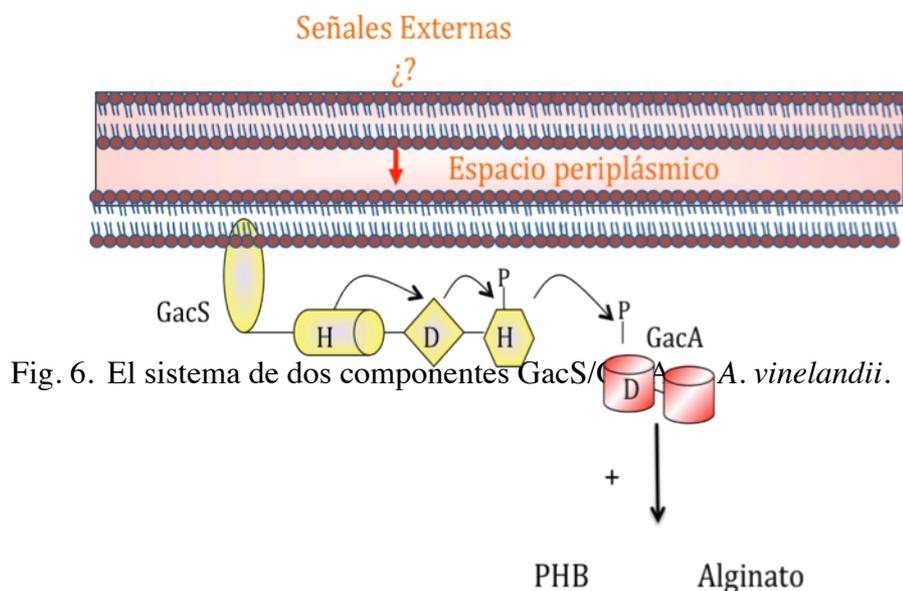


Fig. 6. El sistema de dos componentes GacS/GacA de *A. vinelandii*.

En *Escherichia coli* y en otras bacterias, el factor  $\sigma^S$  (RpoS) funciona como un regulador global y es el responsable de la activación de algunos genes expresados principalmente durante la fase estacionaria y bajo varias condiciones de estrés (Typas *et al.*, 2007). Durante crecimiento en fase exponencial, RpoS se encuentra en bajas concentraciones; sin embargo, se incrementa su concentración en fase estacionaria donde es reclutado por la RNA polimerasa para la transcripción del 10 % de los genes de *E. coli*. Gracias a lo anterior, la célula puede responder a una serie de estímulos y estrés ayudándola a sobrevivir.

En *E. coli* y en la mayoría de las bacterias, RpoS muestra un alto grado de similitud en secuencia con el factor  $\sigma^{70}$  (RpoD); especialmente en las regiones que son importantes para el reconocimiento de los elementos -10 y -35. Y, aunque *in-vitro* RpoS y RpoD reconocen idénticos elementos -10 y -35, existen otros elementos que hacen posible la correcta selección y utilización de factores sigmas por la RNA polimerasa. Gran número de experimentos donde se mapearon promotores dependientes de RpoS y una serie de análisis meticulosos sugieren las siguientes características de los promotores dependientes de RpoS:

1.-RpoS tiene un alto grado de tolerancia de cambios menores en la secuencia consenso a la que se une (-10 y -35).

2.-Para que RpoS pueda unirse a sus promotores, son importantes las secuencias localizadas alrededor de los elementos -10 y -35.

3.-Los promotores RpoS son modulares, en el sentido de que diferentes combinaciones en secuencia pueden llevar a cabo la selectividad de RpoS.

Las características de promotores dependientes de RpoS se resumen en la figura 7 (Typas *et al.*, 2007).

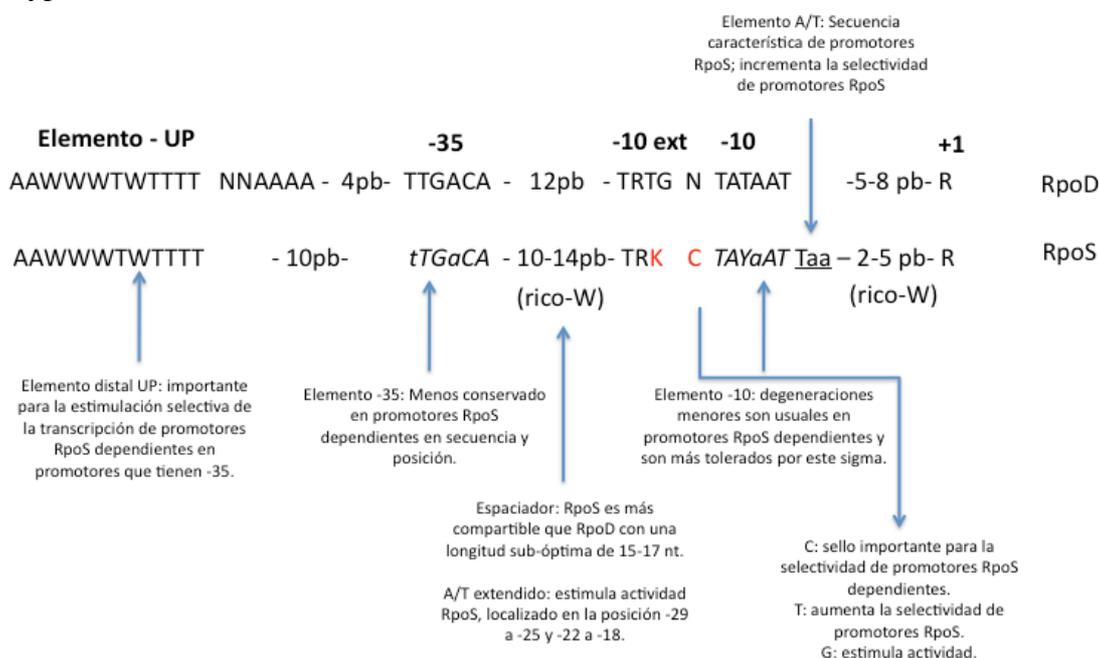


Fig. 7. Comparación de secuencias reconocidas y transcritas por RpoD y RpoS. En cursivas se muestra los nucleótidos que pueden estar degenerados en los elementos -10 y -35 en promotores RpoS degenerados (en minúsculas están los nucleótidos conservados). Las etiquetas señalan los elementos relevantes y su función en promotores RpoS dependientes. R y Y denotan purinas (A/G) y pirimidinas (C/T) respectivamente, K es T/G, W es A/T.

En varias especies bacterianas la expresión de RpoS es regulada por algún sistema de dos componentes; por ejemplo, en *Pseudomonas fluorescens* es regulada transcripcionalmente por GacA y en *E. coli*, por BarA (y su regulador de respuesta UvrY, homólogo de GacA) (Mukhopadhyay *et al.*, 2000; Whistler *et al.*, 1998); aunque, se desconoce si es de manera directa.

## 2.5 PhbR y la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS

La familia de reguladores AraC/XylS es una de las más comunes de reguladores positivos, y tiene principalmente tres funciones regulatorias: metabolismo de carbono, respuesta a estrés y patogénesis (Gallegos *et al.*, 1997; Tobes and Ramos, 2002).

Las proteínas de esta familia se caracterizan por una secuencia de aminoácidos que se extiende hasta unos 100 aminoácidos que constituye el dominio de unión a DNA, el cual se localiza principalmente en la región C-terminal de la proteína. La predicción de la estructura secundaria del dominio de unión a DNA sugiere la existencia de dos potenciales estructuras hélice-vuelta-hélice (HTH); evidencias experimentales muestran que la primer estructura HTH constituye el motivo de unión a DNA, mientras que de la segunda estructura se desconoce su función (Gallegos *et al.*, 1997).

Todas las proteínas de este sistema son activadores transcripcionales, excepto CelD el cual es un represor; sin embargo, AraC y YbtA pueden actuar como represores y reguladores positivos en diferentes promotores o en el mismo promotor dependiendo de la presencia o la ausencia de un efector. Por otro lado, aunque la familia AraC/XylS es muy grande, un subgrupo pertenece a la clase II (al sobreponerse sobre la región -35 del promotor) y en la presencia de inductores las proteínas reguladoras pueden formar dímeros que reconocen secuencias nucleotídicas de 18 a 20 pb para activar la transcripción (Gallegos *et al.*, 1997; Tobes and Ramos, 2002).

En *A. vinelandii*, la comparación de la secuencia de la proteína PhbR (348 aa) muestra una notable identidad con algunos reguladores de la familia AraC/XylS y la presencia de dos posibles motivos HTH en la región C-terminal (250-271 y 297-320). Debido a la localización del gen *phbR* (que codifica para el proteína PhbR) en el cromosoma y su homología con proteínas reguladoras de la familia AraC/XylS, se propuso que el producto de este gen es un activador transcripcional del operón *phbBAC* (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

## 2.6 Sistema CsrA/CsrB (RsmA/RsmZ)

Recientemente se encontró un nuevo sistema de regulación global presente en *E. coli* y en otras bacterias, el sistema de regulación para la reserva de carbono ("csr" por sus siglas en inglés "carbon storage regulatory"). El efector es una proteína pequeña de unión a RNA llamada CsrA. Estudios genéticos y moleculares de CsrA, muestran que esta proteína reprime la gluconeogénesis, catabolismo y biosíntesis de glucógeno. CsrA también activa la glucólisis y el metabolismo de acetato (Romeo and Grong, 1993; Sabnis *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996). La represión de la gluconeogénesis en *E. coli* por CsrA se debe a que esta proteína reconoce y se une específicamente al RNAm del operón *glgCAP* (que codifica para las enzimas de la biosíntesis de glucógeno) cerca del sitio de unión al ribosoma, impidiendo que el ribosoma se una al RNAm y lo traduzca, esto afecta la estabilidad del RNAm provocando su degradación (Babitzke and Romeo, 2007) (Fig. 7). En *E. coli*, existen dos RNAs pequeños no codificantes llamados CsrB y CsrC (de 369 y 242 nt, respectivamente) que contienen múltiples sitios de unión de CsrA y son capaces de unirse a CsrA. CsrA/CsrB o CsrA/CsrC, forman complejos ribonucleoproteicos donde CsrB y CsrC antagonizan la actividad de CsrA, titulando a esta proteína pequeña (Fig. 8). En *E. coli* y en todos los casos conocidos, los pequeños RNAs contienen varios sitios propuestos de unión de CsrA, por ejemplo CsrB 22 y CsrC 13.

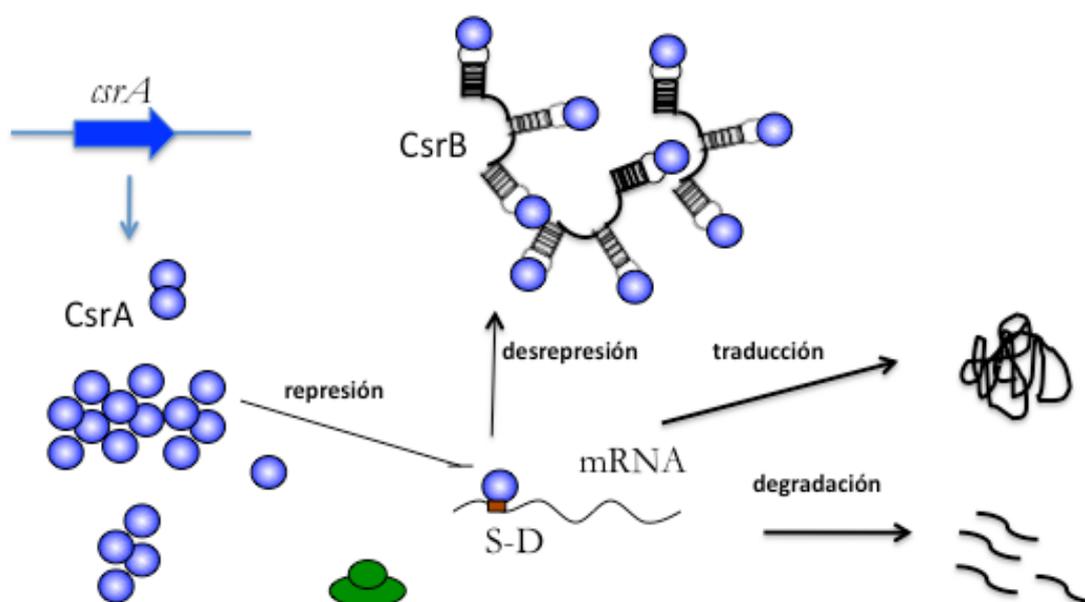


Fig. 8. Modelo de regulación post-transcripcional mediada por el sistema CsrA/CsrB de *E. coli*.

Por otro lado, se han identificado homólogos de CsrA, CsrB y CsrC en otras especies bacterianas. En *P. fluorescens*, una bacteria que coloniza raíces de plantas existen dos homólogos de la proteína CsrA llamados RsmA y RsmB; y, tres RNAs llamados RsmX, RsmY y RsmZ que antagonizan la actividad de RsmA y RsmB. En ésta bacteria, RsmA y RsmB reprimen la traducción de RNAm del gen *hcnA* (que codifica para la enzima cianidin hidrogeno sintasa) al unirse en tres sitios en la región líder del RNAm y sobrelapar el sitio de unión al ribosoma (Babitzke and Romeo, 2007). También, en *Erwinia carotovora* y en *P. aeruginosa* se ha identificado el sistema de regulación RsmA/RsmB que juega un papel importante en la síntesis de enzimas extracelulares y polisacáridos, motilidad, producción de metabolitos secundarios y quorum sensing (Babitzke and Romeo, 2007).

### **2.7 Regulación del los RNAs regulatorios por el sistema de dos componentes**

Una característica del sistema “Csr” es que un sistema de dos componentes es responsable de la activación transcripcional de los RNAs en respuesta a una(s) señal(es) desconocida(s). En cultivos bacterianos de *E. coli*, CsrA, CsrB y CsrC incrementan en fase estacionaria, y el sistema de dos componentes BarA/UvrY activa la transcripción de *crsB* y *csrC* (Suzuki *et al.*, 2002). En *P. flourescens* la expresión de RsmA y RsmE incrementa con el incremento en la densidad celular; por otro lado, la expresión de RsmX y RsmY incrementa en paralelo al crecimiento celular, mientras que la expresión de RsmZ se da al final del ciclo de crecimiento. El sistema de dos componentes GacS/GacA activa la transcripción de los tres RNAs regulatorios de *P. flourescens*, y aunque en *E. coli* se desconoce la señal que activa la transcripción de los RNAs, en preparaciones con diferentes compuestos que son señales de quorum sensing (producidos en fase exponencial) inducen la expresión de RsmX, RsmY y RsmZ (Valverde *et al.*, 2003). Adicionalmente, en *Erwinia carotovora* el sistema GacS/GacA activa la transcripción de RsmB; sin embargo, se han identificado otros genes que regulan la expresión de RsmA y/o RsmB pero aun no se ha identificado el mecanismo regulatorio, entre ellos están RsmC, KdgR y HexA (Babitzke and Romeo, 2007).

### **CAPÍTULO 3. EFECTO DE LOS REGULADORES RpoS, PhbR, GacA Y RsmA/RsmZ SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE PHB**

#### **3.1 Efecto de RpoS sobre la biosíntesis de PHB**

Una mutación en *rpoS* afecta de manera negativa la producción de PHB. Por medio de experimentos de protección a nucleasa S1 se observó que la mutación *rpoS* afecta de manera negativa el transcrito correspondiente a  $p_B2$  del operón *phbBAC* en fase estacionaria. Igualmente, el transcrito correspondiente a  $p_R2$  del gen *phbR* también se ve disminuido en fase estacionaria. Lo anterior, sugiere que RpoS controla la expresión del promotor  $p_B2$  del operón *phbBAC* en fase estacionaria, y aunque la secuencia -10 del promotor  $p_R2$  no presenta consenso para RpoS, éste podría controlar su expresión de manera indirecta (Peralta- Gil, 2004).

#### **3.2 PhbR y su papel en la biosíntesis de PHB**

PhbR es una proteína homóloga a las proteínas reguladoras de la familia AraC/XylS, las cuales en su mayoría son activadores transcripcionales. En *A. vinelandii*, la mutación en el gen *phbR* afecta de manera negativa la síntesis de PHB. Mediante experimentos de protección a nucleasa S1 se observa que la transcripción del operón *phbBAC* a partir del promotor  $p_B1$  disminuye drásticamente, mientras que la transcripción del promotor  $p_B2$  aumenta, comparada con la de la cepa silvestre (Peralta-Gil, 2004). Por lo que, se sugirió que PhbR es un activador del promotor  $p_B1$  y por solapamiento de promotores, también puede funcionar como un represor transcripcional del promotor  $p_B2$ .

#### **3.3 El sistema GacA/GacS y la biosíntesis de PHB**

En *A. vinelandii* se demostró que el sistema de dos componentes GacA/GacS está involucrado en la regulación de la síntesis de PHB (Castañeda *et al.*, 2001). Una mutación en el gen que codifica para el regulador de respuesta GacA afecta de manera negativa la producción de PHB, tal que la síntesis del polímero se abate casi en su totalidad. Cabe mencionar que mediante experimentos de protección a nucleasa S1 en esta mutante, la transcripción del operón *phbBAC* a partir de sus dos promotores ( $p_B1$

y  $p_B2$ ) disminuye drásticamente comparada con la de la cepa silvestre, sugiriendo que el sistema de dos componentes GacA/GacS controla la cantidad de transcritos para la biosíntesis de PHB. Estos resultados también muestran que la transcripción del operón *phbBAC* depende del sistema de dos componentes GacA/GacS (Peralta-Gil, 2004).

### 3.4 El sistema Csr (RsmA/RsmZ) en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii*, recientemente se encontraron los homólogos del sistema Csr de *E. coli* y Rsm de *Pseudomonas*. Este sistema consiste en un gen que codifica para una pequeña proteína llamada RsmA, y 9 genes que codifican para RNAs regulatorios (7 del tipo RsmZ y 2 del tipo RsmY) (Manzo *et al.*, 2011). La sobreexpresión de la proteína RsmA en las cepas productoras de alginato ATCC9046 y AEIV tiene un efecto negativo en la producción de alginato y PHB (Cocotl, 2007). También, tanto la mutación en *rsmZ1* o en *rsmZ2* en estas cepas tiene un efecto negativo en la producción de alginato. Es importante mencionar que el sistema GacS/GacA de *A. vinelandii* controla la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*, y posiblemente de los 7 Rsm restantes, ya que poseen en su región de regulación posibles sitios de unión de GacA (Manzo *et al.*, 2011) (Fig. 9).

Mediante experimentos tipo EMSA se encontró que la proteína RsmA se une *in-vitro* al RNAm del gen *algD* que codifica para la enzima GDP-manosa 6-dehidrogenasa (clave en la biosíntesis de alginato). Además, se propuso la secuencia AAAUAAGGACGA como el sitio de unión de RsmA en el RNAm de *algD*, donde la unión de RsmA sobre el RNAm afectaría su traducción y su estabilidad. Por otro lado, también se demostró que RsmA se une *in-vitro* a los RNAs RsmZ1 y RsmZ2, por lo que se sugirió que estos genes codifican para RNAs regulatorios que titulan a la proteína RsmA, liberando el efecto negativo que ejerce sobre el RNAm de *algD* (Manzo *et al.*, 2011) (Fig. 9).

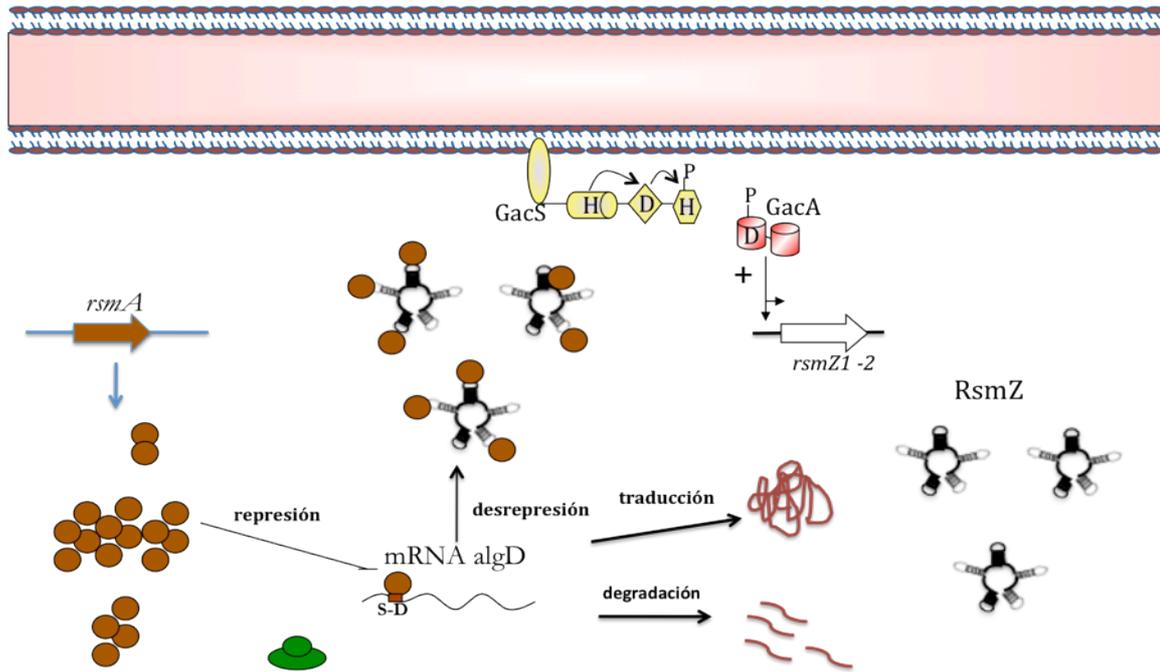


Fig. 9. Modelo de regulación post-transcripcional del gen *algD* en *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011).

## CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

Con base en lo anterior, en este trabajo se propone que en *A. vinelandii*:

A) Dado que en la región intergénica se localizan 6 secuencias directas repetidas que presentan consenso a secuencias reconocidas por activadores transcripcionales de la familia AraC/XylS, proponemos que son los sitios de unión de PhbR y que PhbR es un activador transcripcional del promotor  $p_{B1}$  y un represor del promotor  $p_{B2}$  del operón *phbBAC*. Por otro lado, en muchas especies bacterianas donde el gen que codifica para un regulador transcripcional se encuentra en sentido divergente de su gen blanco, dicho regulador transcripcional regula su propia expresión; dado lo anterior, cabría la posibilidad de que en *A. vinelandii* PhbR regule su propia expresión. Adicionalmente, dado que la mutación en *rpoS* afecta de manera negativa la producción de PHB, proponemos que este regulador controla la expresión de *phbR* y *phbBAC* en fase estacionaria y que RpoS es clave en la producción de PHB (Fig. 10).

B) El sistema de dos componentes GacS/GacA regula la producción de PHB a través del sistema de regulación global RsmA/RsmZ dando como resultado los siguientes modelos:

-GacS se autofosforila por una señal desconocida, a su vez GacS fosforilada, transfiere su grupo fosfato al regulador de respuesta GacA. GacA, activada por fosforilación, activa la transcripción de los genes *rsmZ*. Dado que los genes *rsmZ* codifican para RNAs regulatorios, entonces éstos antagonizan la función de RsmA, secuestrándola. A su vez, RsmA puede controlar a nivel post-transcripcional a:

1.- El/los RNAm(s) del *phbBAC/phbR* uniéndose en la secuencia líder (cerca o sobrelapando el sitio de unión al ribosoma), y por lo tanto impidiendo su traducción e induciendo su degradación, o

2.- algún RNAm que codifique una proteína cuya función es activar la transcripción del operón *phbBAC* y/o del gen *phbR*, la unión de RsmA a este RNAm tendría un efecto negativo impidiendo la traducción del mismo.

Cualquiera de las dos posibilidades (directa o indirectamente) en las cepas mutantes en *gacA* o *rsmZ1* daría como resultado una reducción significativa en la producción de PHB (Fig. 10).

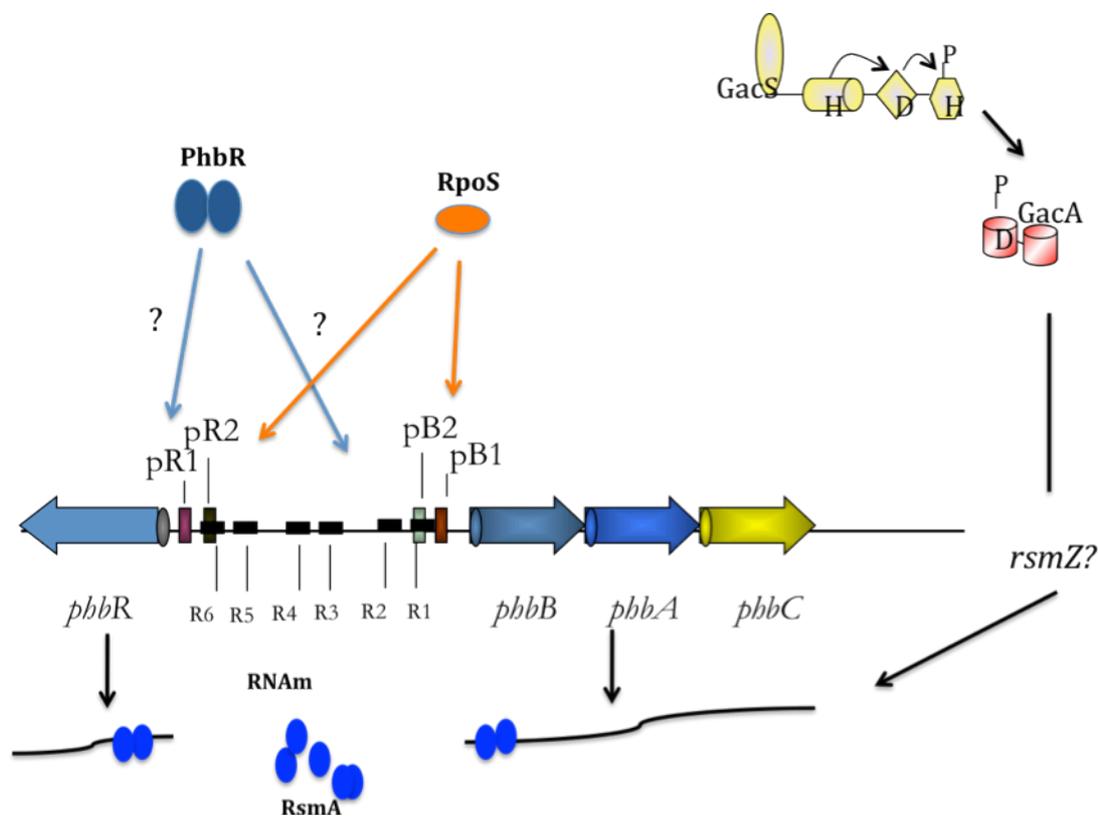


Fig. 10. Modelo hipotético de regulación transcripcional y post-transcripcional del operón *phbBAC* y del gen *phbR*.

Por las razones anteriormente expuestas, en este trabajo se proponen los siguientes objetivos:

## CAPÍTULO 5. OBJETIVOS GENERALES

I.-Estudiar la regulación transcripcional del operón *phbBAC* y del gen *phbR* mediada por la proteína PhbR y RpoS.

II.-Estudiar el efecto de los reguladores globales GacA/RsmA/RsmZ sobre la regulación transcripcional y post-transcripcional del operón *phbBAC* y *phbR* en *A. vinelandii*.

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### PARTE I REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *phbR* Y DEL OPERÓN *phbBAC*

#### 6.1 Efecto de los reguladores PhbR y RpoS sobre la síntesis de PHB

Anteriormente se observó que una mutación en el gen *phbR* afectaba de manera negativa la síntesis y acumulación de PHB (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Por otro lado, mediante experimentos con nucleasa S1 se observó que una mutación en el gen *rpoS* afecta la expresión del segundo promotor de *phbR* y del segundo promotor de *phbB*. Para seguir con el estudio de la regulación de los genes de PHB a través de PhbR y RpoS, se procedió a cuantificar la producción y acumulación de PHB en las cepas silvestre, *rpoS*<sup>-</sup>, *phbR*<sup>-</sup> y en una doble mutante *rpoS*<sup>-</sup>/*phbR*<sup>-</sup>. La tabla 1 muestra la cuantificación de PHB a 72 h de cultivo, y la figura 12 muestra el fenotipo de opacidad (un fenotipo blanco muestra producción de PHB, mientras que un fenotipo claro oscuro muestra la no producción de PHB)

Tabla 1. Cuantificación de PHB

Cepa	Contenido PHB [mg (mg de proteína <sup>-1</sup> )]
UW136 (silvestre)	1.550 ± 0.220
<i>phbR</i> <sup>-</sup>	0.144 ± 0.070
<i>rpoS</i> <sup>-</sup>	0.167 ± 0.010
<i>rpoS</i> <sup>-</sup> / <i>phbR</i> <sup>-</sup>	0.004 ± 0.002
<i>phbR</i> <sup>-</sup> / <i>phbR</i> <sup>+</sup>	2.490 ± 0.174
<i>rpoS</i> <sup>-</sup> / <i>rpoS</i> <sup>+</sup>	2.510 ± 0.273

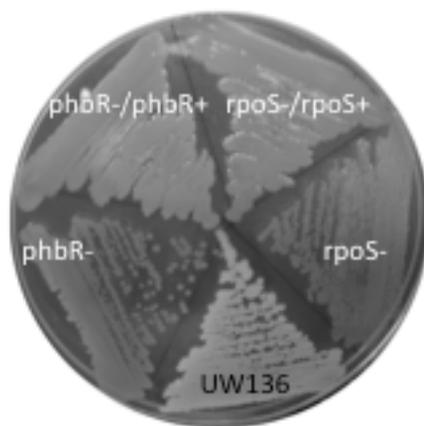


Fig. 11. Fenotipo de opacidad (producción de PHB) de las cepas silvestre (UW136), *phbR*<sup>-</sup>, *rpoS*<sup>-</sup>, *phbR*<sup>-</sup>/*phbR*<sup>+</sup>, *rpoS*<sup>-</sup>/*rpoS*<sup>+</sup>.

Se muestra el efecto negativo de las mutaciones *rpoS*- y *phbR*- sobre la producción de PHB, ya que estas cepas producen un 90 % menos PHB que la cepa silvestre (Tabla 1 y Fig. 11). La doble mutante *rpoS*-/*phbR*- muestra un efecto más drástico que las mutantes sencillas, ya que en esta cepa la producción de PHB está casi abatida. Los datos anteriores demuestran la importancia del producto de los genes *rpoS* y *phbR* en la producción y en la acumulación del polímero. Adicionalmente, con la finalidad de confirmar que el efecto negativo en PHB en las mutantes *rpoS*- y *phbR*- se debe a la mutación en esos genes, se procedió a complementar las cepas mutantes *phbR*- y *rpoS*- con sus respectivos genes silvestres en cromosoma. La tabla 1 muestra que la complementación de los genes *rpoS* y *phbR* en las mutantes *rpoS*- y *phbR*- sí revierten el fenotipo negativo en la producción PHB (cepas *phbR*-/*phbR*+ y *rpoS*-/*rpoS*+); incluso estas cepas llegan a producir un poco más PHB que la cepa silvestre. Lo anterior muestra que el efecto negativo sobre PHB en las mutantes *rpoS*- y *phbR*- se debe a la mutación en ambos genes.

## 6.2 Cuantificación de la expresión de *phbR*, *phbB* y *rpoS* en diferentes fases de crecimiento

Dados los fenotipos en cuanto a la acumulación de PHB en las cepas: UW136, *phbR*-, *rpoS*-, y que solo se conoce los efectos cualitativos sobre los RNAs mensajeros de *phbB* y *phbR* en estas cepas (solo *phbR*- y *rpoS*-, mediante experimentos tipo nucleasa S1; Peralta-Gil *et al.*, 2002), se procedió a cuantificar la expresión de los genes *phbR*, *phbB* y *rpoS* en fase exponencial y fase estacionaria por transcripción reversa y PCR cuantitativo (RT-qPCR) en la cepa silvestre (Fig. 12).

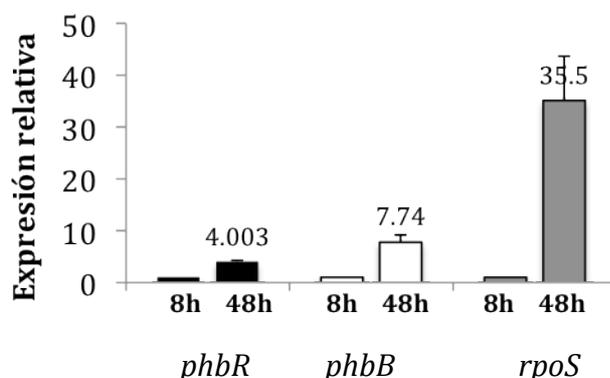


Fig. 12. Expresión de los genes *phbR*, *phbB* y *rpoS* en la cepa UW136. 8h es fase exponencial (8 horas) y 48h es fase estacionaria (48 horas).

La figura 12 muestra como la expresión de *phbR* se incrementa en fase estacionaria, hasta 4 veces más con respecto a la fase exponencial (barras negras, 8 y 48 horas). De manera similar, la expresión de *phbB* se incrementa hasta 8 veces más en fase estacionaria con respecto a fase exponencial (Fig. 12, barras blancas). El incremento en la expresión de estos genes en fase estacionaria, concuerda con el incremento de la producción de PHB en fase estacionaria; también, concuerda con el gran incremento de la expresión del gen *rpoS* en fase estacionaria (hasta 35 veces más que en fase exponencial; Fig. 12, barras grises).

La cuantificación de PHB en la cepa mutante *rpoS* y la cuantificación de la expresión de los genes *phbR* y *phbB* en fase estacionaria, muestran como la proteína RpoS es clave sobre la regulación de la acumulación de PHB en fase estacionaria. Además, sugiere que RpoS controla la expresión del gen *phbR* que codifica para la proteína PhbR, cuya función es activar la expresión del operón biosintético de PHB *phbBAC*.

### 6.3 Regulación transcripcional del gen *phbR* por RpoS y PhbR

Dado que la expresión de *phbR* se incrementa en fase estacionaria y que coincide tanto con la acumulación de PHB y el incremento de la expresión de *rpoS* en fase estacionaria, se cuantificó la expresión de este gen en las cepas silvestre y mutante *rpoS*<sup>-</sup>. También, el gen *phbR* codifica para la proteína PhbR, la cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, donde la mayoría de reguladores además de regular a su gen blanco, se autorregulan (Gallegos *et al.*, 1997); por eso, se cuantificó la expresión de *phbR* en la mutante *phbR*<sup>-</sup>. Se usó RT-qPCR para cuantificar la expresión de *phbR*, y para poder llevarlo a cabo en la mutante *phbR*<sup>-</sup>, se usaron un par de oligos localizados río arriba de la interrupción del gen. La figura 13 muestra la cuantificación de la expresión del gen *phbR* en las cepas silvestre, *rpoS*<sup>-</sup>, *phbR*<sup>-</sup> y *rpoS*<sup>-</sup>/*phbR*<sup>-</sup>.

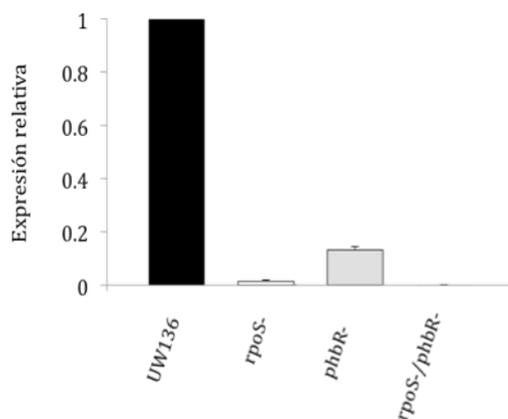


Fig. 13. Expresión del gen *phbR* en fase estacionaria.

En la mutante *rpoS*- se observa una drástica disminución de la expresión de *phbR*, con respecto a la cepa silvestre; de manera similar, la mutante *phbR*- muestra una disminución de hasta un 80 % aproximadamente (Fig. 13), y en la doble *rpoS*-/*phbR*- se abate completamente la expresión de *phbR*. Estos datos, revelan que *phbR* depende de RpoS para su expresión en fase estacionaria y que PhbR activa la expresión de su propio gen, siendo un autoactivador. Para comprobar los datos anteriores, se introdujo la fusión transcripcional *phbR*::*gusA* en las cepas silvestre, *rpoS*-, *phbR*- y *rpoS*-/*phbR*-, y se procedió a llevar a cabo una cinética de actividad (Fig. 14).

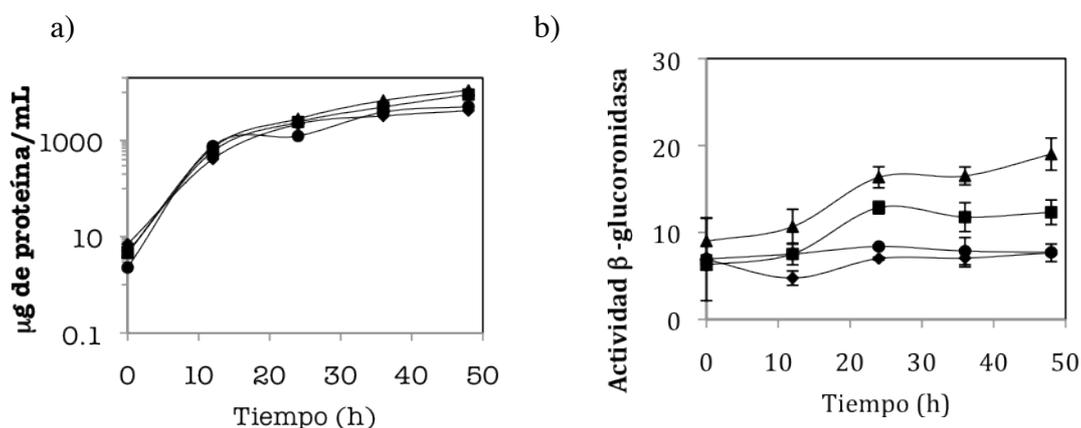


Fig. 14. Crecimiento (a) y actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (b). UW136 (silvestre) línea con triángulos, *phbR*- línea con cuadros, *rpoS*- línea con círculos y *rpoS*-/*phbR*- línea con rombos.

Como se nota en la figura 14b, la expresión del gen *phbR* es baja en la fase exponencial; sin embargo, aumenta en fase estacionaria (UW, línea con triángulos) (24, 36 y 48 h). La mutación en el gen *phbR*, disminuye la expresión de *phbR* en fase exponencial y principalmente en fase estacionaria (aproximadamente un 50%) (línea con cuadros). La mutación en el gen *rpoS* afecta de manera significativa la expresión del gen *phbR*, ya que la expresión cae mas del 90 % (líneas con círculos). Finalmente, la doble mutante *rpoS*-/*phbR*- muestra un efecto similar a la mutante *rpoS*- (línea con rombos). Estos datos, sustentan los resultados obtenidos por RT-qPCR (Fig. 13). Dado que la mutación *phbR* afecta de manera negativa la expresión de *phbR*, sugiere fuertemente que PhbR activa la expresión de su propio gen (directa o indirectamente); sin embargo, PhbR no es necesario para su completa expresión en fase estacionaria, ya que no se abate su expresión (solo decae un 50 % aproximadamente). De manera similar, la mutación en *rpoS* afecta negativamente la expresión de *phbR*, pero a diferencia de la mutación en *phbR*, RpoS sí es necesario para que *phbR* se exprese en fase estacionaria. La mutante *rpoS* tiene un efecto más fuerte, pudiéndose deber a que al no estar RpoS, no activa a la expresión de *phbR*, dejándose de producir PhbR y por lo tanto no existiendo autoactivación. La hipótesis anterior se corrobora con el efecto de la doble mutación *rpoS*-/*phbR*- sobre la expresión de *phbR*; la cual exhibe una cinética similar a la mutante *rpoS*.

#### 6.4 Regulación transcripcional del operón *phbBAC* por RpoS y PhbR

Mutaciones en los genes *rpoS* y *phbR*, afectan de manera negativa la producción de PHB y la expresión de *phbR* (tabla 1 y figura 14). Para conocer si las mutaciones en estos genes (*phbR* y *rpoS*) afectan la expresión de *phbB*, se cuantificó su expresión por RT-qPCR. La figura 15 muestra el resultado de esta cuantificación en fase estacionaria.

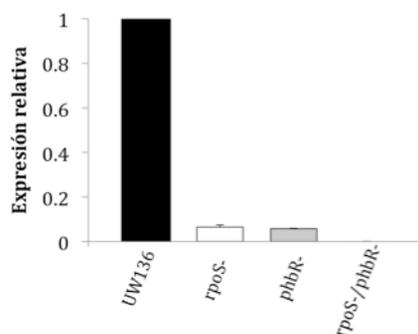


Fig. 15. Expresión del gen *phbB* en fase estacionaria.

La expresión de *phbB*, disminuye más del 90 % en las mutantes *rpoS*- y *phbR*-, con respecto a la cepa silvestre (Fig. 15, barras blancas y grises respectivamente). Finalmente, en la doble *rpoS*-/*phbR*- se abate completamente la expresión de *phbB* (Fig. 15). La cuantificación de la expresión de *phbB* sugiere que la regulación transcripcional del operón *phbBAC* está controlada por las proteínas PhbR y RpoS (en fase estacionaria). Para corroborar lo anterior, se introdujo la fusión transcripcional *phbB*::*gusA* en las cepas silvestre, *phbR*-, *rpoS*- y *rpoS*-/*phbR*- para monitorear la actividad de los promotores de *phbB* mediante la cuantificación de la actividad del producto del gen *gusA*. En la figura 16a se muestra la curva de crecimiento, y en la 16b muestra la actividad de  $\beta$ -glucoronidasa.

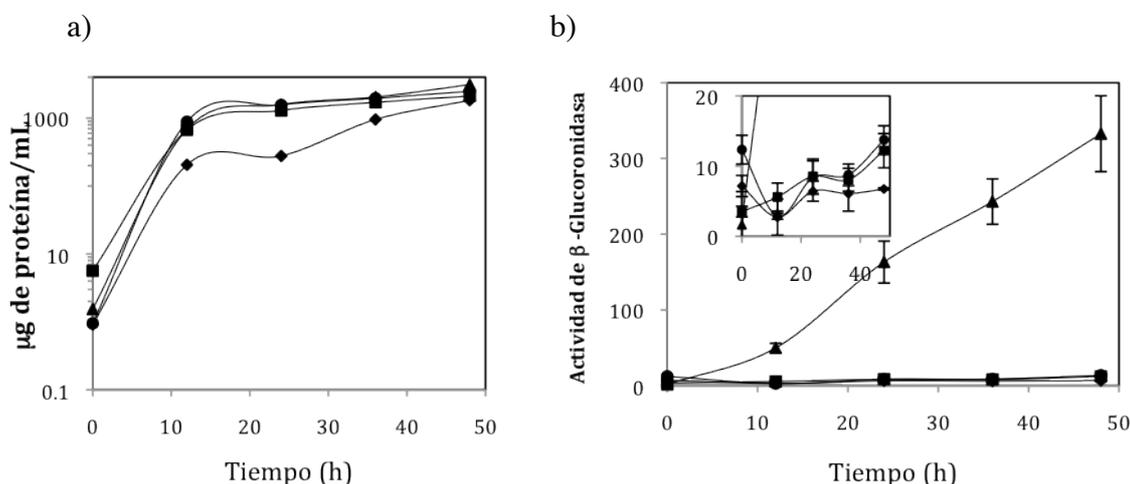


Fig. 16 Crecimiento (a) y actividad de  $\beta$ -glucoronidasa (b). UW136 (silvestre) línea con triángulos, *phbR*- línea con cuadros, *rpoS*- línea con círculos y *rpoS*-/*phbR*- línea con rombos. El inserto en el gráfico de la derecha, es una magnificación de las curvas de *phbR*-, *rpoS*- y *rpoS*-/*phbR*-.

Como se muestra en la figura 16b, la expresión del gen *phbB* es baja en la fase exponencial; sin embargo, se incrementa en fase estacionaria (UW136, línea con triángulos) (24, 36 y 48 hrs). Las mutaciones en los genes *phbR* y *rpoS*, afectan fuertemente la expresión en ambas fases de crecimiento. La doble mutante *rpoS*-/*phbR*- muestra un efecto similar a las mutantes *phbR*- o *rpoS*-.

Lo anterior, sustenta los resultados obtenidos por RT-qPCR (Fig. 15). Dado que la mutación *phbR* afecta negativamente la expresión de *phbB*, sugiere fuertemente que PhbR es el activador transcripcional del operón de la síntesis de PHB. De manera similar, la mutación en *rpoS* afecta de forma negativa la expresión de *phbB*. El segundo promotor de *phbB* p<sub>B2</sub>, tiene consenso para el reconocimiento de RpoS, por lo que este factor sigma de fase estacionaria estaría activando la expresión de este promotor de manera directa. Adicionalmente, la proteína PhbR (activador de *phbB*) depende transcripcionalmente de RpoS en fase estacionaria, por lo que RpoS controlaría al primer promotor de *phbB* p<sub>B1</sub> de manera indirecta (al controlar la expresión de PhbR).

### **6.5 PhbR activa la expresión de *phbB* de manera directa.**

En la región intergénica *phbR-phbBAC* se localizan 6 grupos de secuencias o cajas que presentan característica a los sitios de unión de reguladores transcripcionales tipo AraC/XylS (nombradas R1-R6). Solo las cajas R1 y R2 son las mas conservadas (directas repetidas), mientras las demás cajas están poco conservadas. Cabe señalar que, R1 y R2 sobrelapan parcialmente el -35 del primer promotor de *phbB* y completamente el segundo promotor de *phbB*. Para conocer si la proteína PhbR se une a algunas de las cajas repetidas conservadas de la región intergénica *phbR-phbBAC*, se diseñaron varios oligonucleótidos para amplificar diferentes fragmentos de DNA y llevar a cabo experimentos de interacción DNA-proteína tipo EMSA. El fragmento 1 (F1) comprende parte de la región intergénica que incluye las 6 cajas repetidas; el fragmento 2 (F2) incluye solo las cajas R1 y R2 que sobrelapan los promotores del operón *phbBAC*. El fragmento 3 (F3) incluye las cajas R3 y R4, y el fragmento 4 (F4) lleva las cajas R5 y R6, donde R6 sobrelapa el promotor 2 del gen *phbR* (Fig. 17).

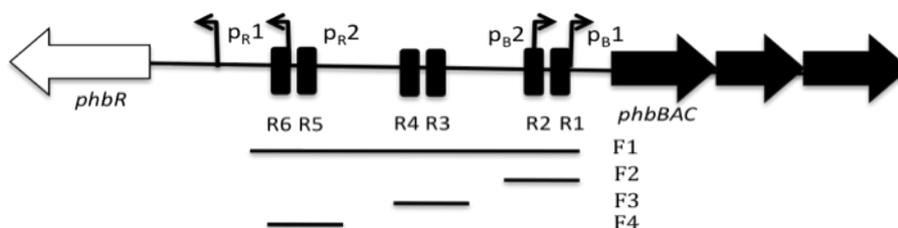


Fig. 17. Región intergénica *phbR-phbBAC* (500 pb). Los recuadros marcados como R1-R6 representan las cajas conservadas y las líneas negras muestran los tamaños de los fragmentos utilizados. Las flechas dobladas, junto con las letras  $p_1$  y  $p_2$  representan los diferentes promotores de *phbR* y *phbB*.

Nuestra primer pregunta era saber si la proteína PhbR se unía a la región intergénica *phbR-phbBAC* que contiene los 6 posibles sitios de unión; para contestar esa pregunta, se usó el fragmento 1 (F1) y se mezcló con diferentes concentraciones de PhbR. La figura 18 muestra la autorradiografía del ensayo Ensayo de retardo de la movilidad en gel (EMSA).

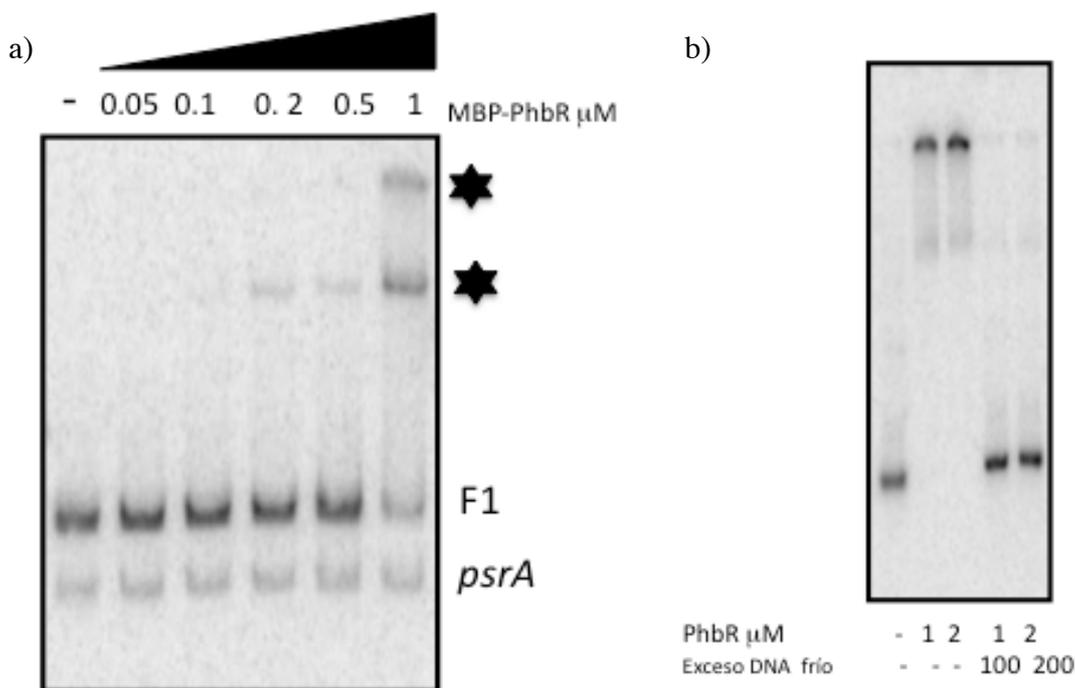


Fig. 18. Ensayo de retardo de la movilidad en gel EMSA de la región intergénica *phbR-phbB*. a) en la parte superior se muestra las cantidades de proteína utilizadas en la interacción y donde se encuentra un “-“ significa sin proteína. Los asteriscos señalan complejo DNA-PhbR. Se usó como control negativo DNA de la región de regulación del gen *psrA*. b) control de competencia específica para el fragmento F1 con DNA frío (no marcado).

Se observa en la figura 18a, que a concentraciones crecientes de la proteína PhbR aparecen complejos retardados (a partir de 0.2  $\mu\text{M}$ ), y el fragmento F1 va retardando su movilidad. La interacción F1-PhbR es específica, ya que el control negativo no se retarda (*psrA*). Esto muestra que *in-vitro* la proteína PhbR se une a la región intergénica *phbR-phbB*. Para saber si PhbR se une específicamente a las cajas R1-R6, se llevaron a cabo diferentes EMSA con los fragmentos F2, F3, F4 y diferentes concentraciones de PhbR. De los EMSA con los fragmentos F2, F3 y F4 solo observamos complejos retardados con el fragmento F2 (Fig. 19).

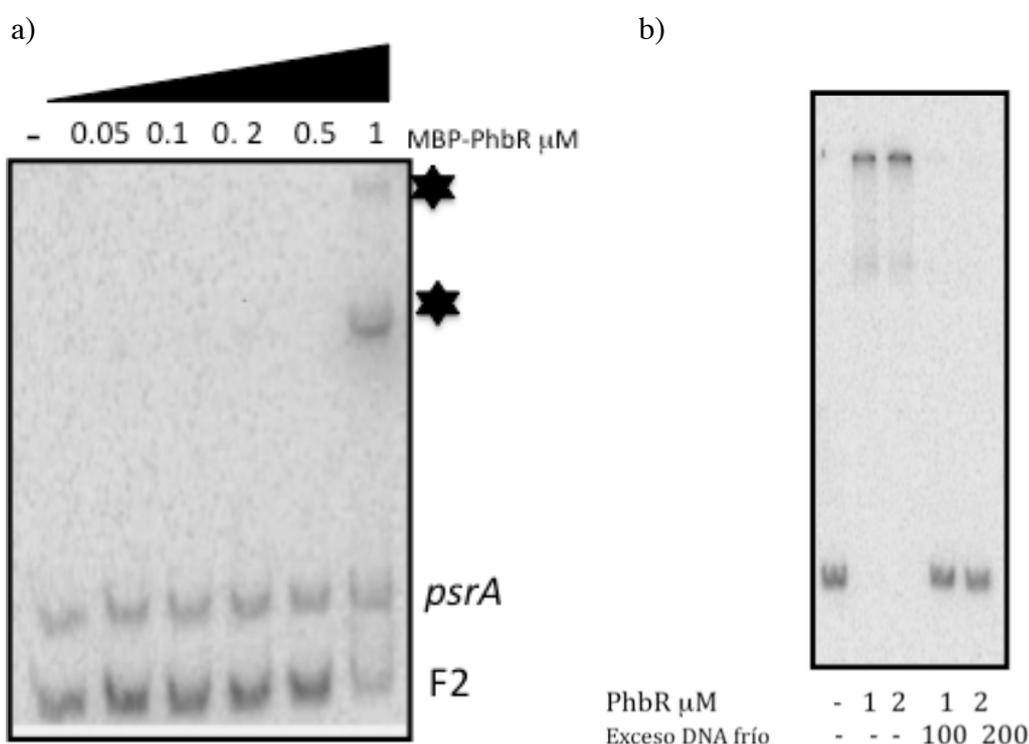


Fig. 19. Ensayo de retardo de la movilidad en gel EMSA del fragmento F2. a) en la parte superior se muestran las cantidades de proteína utilizadas en la interacción y donde se encuentra un “-“ significa sin proteína. Los asteriscos señalan complejo DNA-PhbR. Se usó como control negativo DNA de la región de regulación del gen *psrA*. b) control de competencia específica para el fragmento F2 con DNA frío.

La figura 19 muestra que PhbR se une *in vitro* al fragmento 2, donde se localizan las cajas R1 y R2, sugiriendo que específicamente éstas son los sitios de unión de este regulador. Para comprobar lo anterior y delimitar los sitios de unión de PhbR, se

procedió a llevar a cabo un experimento tipo “footprinting”.

### **6.6 Secuencias de unión a PhbR en la región promotora de *phbB***

Anteriormente, se demostró que la proteína PhbR se une *in-vitro* a la secuencia intergénica *phbR-phbB*. Además, también se mostró que esta proteína se une a la región promotora de *phbB*. Para poder conocer y delimitar las secuencias de unión de PhbR sobre la región de regulación de *phbB*, se procedió a realizar un ensayo de protección a nucleasa tipo “footprinting”. Para el experimento de protección se procedió a amplificar un fragmento de aproximadamente 200 nucleótidos (uno de los oligos usados para amplificar el DNA se marcó radiactivamente con  $\delta$ -ATP) y se incubó con cantidades crecientes de PhbR. Acto seguido, a las muestras se les trató con DNAsa I (diluida 1/50) por 2 minutos y se procedió a limpiar las muestras con fenol-cloroformo. Paralelamente, se llevaron a cabo unas reacciones de secuenciación para el fragmento que se utilizó en el footprinting. Finalmente, todas las muestras fueron cargadas y separadas en un gel de secuenciación. La figura 20 muestra la autorradiografía del gel.

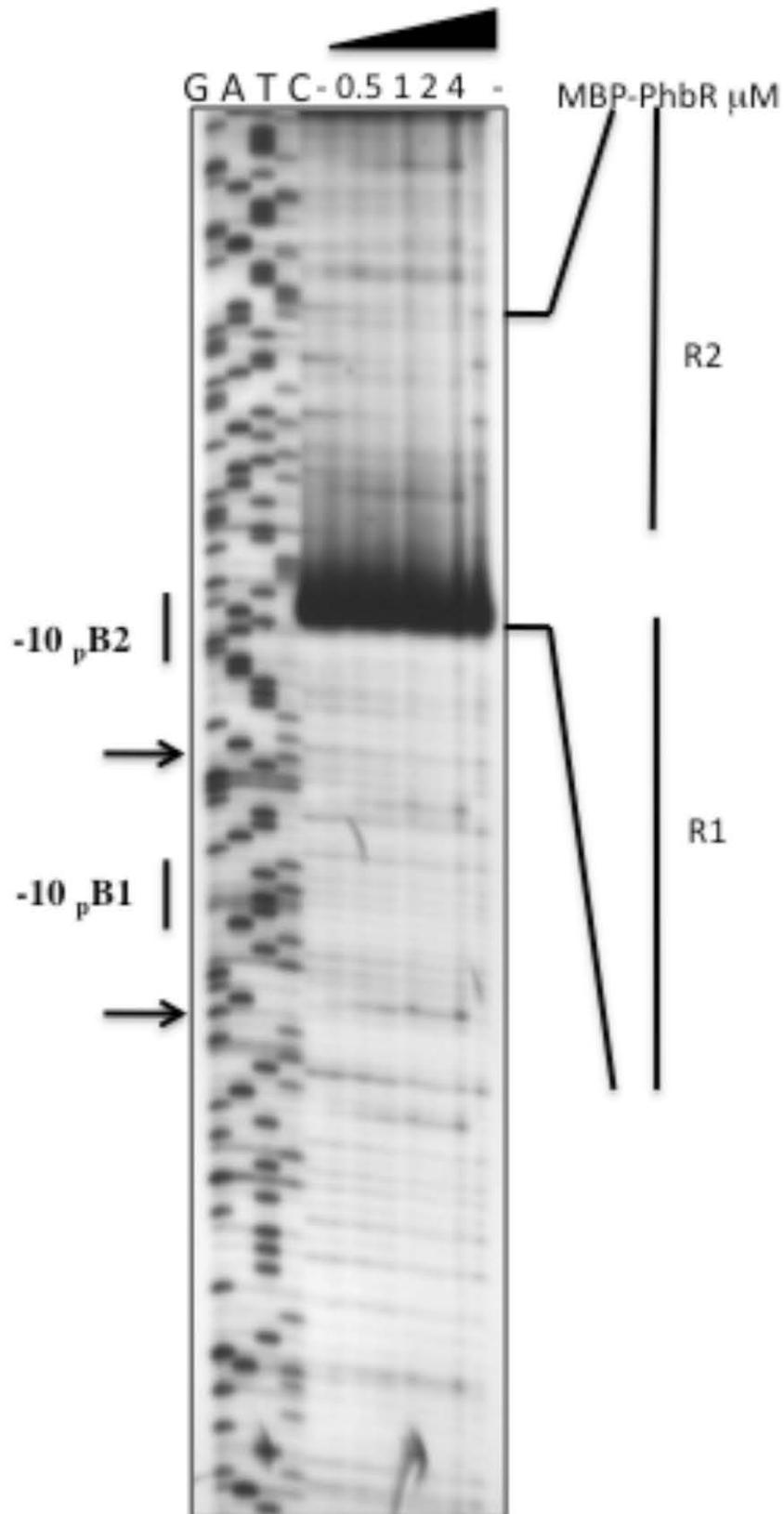


Fig. 20. Ensayo de protección a nucleasa de la región reguladora de *phbB*. Autorradiografía del gel de secuenciación. R1 y R2 representan las regiones protegidas por PhbR, las flechas indican los inicios de transcripción de los dos promotores.

CAPÍTULO 6. Resultados y Discusión. Parte I Regulación transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC*

En la figura 20 se observan dos zonas que son protegidas a la degradación cuando se incrementa la concentración de PhbR (incluso desde la cantidad más baja de PhbR 0.5 uM); la primera y más definida se encuentra marcada como R2 y corresponde a la secuencia 5'-TGTCACCAATCGCCAGTA-3'. Justo 3 nucleótidos hacia abajo, se encuentra la secuencia 5'-TGTCACCAACAGGCACTA-3' (marcada como R1). Esto muestra que PhbR se une específicamente a R1 y R2 para activar la expresión del operón de PHB *phbBAC*, y que R1 sobrelapa parcialmente el -35 del promotor p<sub>B1</sub> y -10 de p<sub>B2</sub>; mientras que R2 sobrelapa completamente la región -35 del promotor p<sub>B2</sub> (Fig. 21).



Fig. 21. Secuencia reguladora de *phbB*. La secuencia delimitada por las cajas es el sitio de unión a PhbR. Las letras subrayadas son las cajas -10 de los promotores de *phbB* y los tripletes en negritas representa el inicio de traducción del gen *phbB*.

### 6. 7 Sitios de unión de PhbR en *A. vinelandii* y su posible localización en otras bacterias relacionadas

En *A. vinelandii* la proteína PhbR se une a las secuencias 5'-TGTCACCAA-N4-CACTA-3' y 5'-TGTCACCAA-N4-CAGTA-3' (R1 y R2), las cuales son características de las secuencias reconocidas por los reguladores de la familia AraC/XylS. En las especies bacterianas *Azotobacter* sp. FA-8 y *Pseudomonas* sp. 61-3 (relacionadas filogenéticamente con *A. vinelandii*), se conserva el arreglo genético *phbR-phbBAC* (Fig. 3); también, los dos promotores del operón de PHB están conservados (Peralta-Gil, 2004). Con la finalidad de saber si los sitios de unión de PhbR también se conservan en *Azotobacter* sp. FA-8 y *Pseudomonas* sp. 61-3 se buscaron *insilico* en la región promotora del gen *phbB* (o *phaB*).

En *Azotobacter* sp. FA-8 y *Pseudomonas* sp. 61-3, en la región promotora de *phbB* se encuentran secuencias similares a las reconocidas por PhbR y que pudieran tener la

misma función, ya que están sobrelapando el -35 del primer promotor. En *Azotobacter* sp. FA-8 los posibles sitios R1 y R2 están muy conservados entre sí, ya que solo varían 3 nucleótidos de R2 con respecto a R1 (Fig. 22); así mismo, en *Pseudomonas* sp. 61-3, en R2 cambian 5 nucleótidos con respecto a R1 (Fig. 22).

<i>Azotobacter vinelandii</i>					
R1	TGTCACCAA	N4	CACTA	14/14	
R2	TGTCACCGA	N4	CAGTA	13/14	
<i>Azotobacter</i> sp. FA-8					
R1	TGTCACCGC	N4	CACTA	14/14	
R2	TGTCACCGA	N4	CAGCA	11/14	
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3					
R1	CGTCACCTA	N4	CACTT	14/14	
R2	TGGCACCGA	N4	CACGA	9/14	

Fig. 22. Sitios de unión de PhbR en *A. vinelandii*, *Azotobacter* sp. FA-8 y *Pseudomonas* sp. 61-3. Los números al margen muestran la proporción de nucleótidos conservados con respecto a R1 de cada especie bacteriana. N4 en la secuencia, representa una serie de 4 nucleótidos.

Ahora bien, los posibles sitios de unión de PhbR en *Azotobacter* sp. FA-8 y *Pseudomonas* sp. 61-3, se conservan con respecto a los sitios descritos para *A. vinelandii*. Para R1, solo 2 nucleótidos cambian en *Azotobacter* sp. FA-8 y 3 en *Pseudomonas* sp. 61-3, con respecto a *A. vinelandii* (Fig. 23). En el caso de R2, solo 1 nucleótido cambia en *Azotobacter* sp. FA-8, y 3 en *Pseudomonas* sp. 61-3, con respecto a *A. vinelandii* (Fig. 23).

R1			
14/14	<u>TGTCACCAA</u>	N4	<u>CACTA</u> <i>Azotobacter vinelandii</i>
12/14	<u>TGTCACCGC</u>	N4	<u>CACTA</u> <i>Azotobacter</i> sp. FA-8
11/14	<u>CGTCACCTA</u>	N4	<u>CACTT</u> <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3
R2			
14/14	<u>TGTCACCGA</u>	N4	<u>CAGTA</u> <i>Azotobacter vinelandii</i>
13/14	<u>TGTCACCGA</u>	N4	<u>CAGCA</u> <i>Azotobacter</i> sp. FA-8
11/14	<u>TGGCACCGA</u>	N4	<u>CACGA</u> <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3

Fig. 23. Alineamiento de los sitios R1 y R2 de *A. vinelandii* con R1 y R2 de *Azotobacter* sp. FA-8 y *Pseudomonas* sp. 61-3. Los números al margen muestran la proporción de nucleótidos conservados. N4 en la secuencia, representa una serie de 4 nucleótidos.

Tomando como base lo anterior, se puede sugerir que en *Azotobacter* sp. FA-8 y en *Pseudomonas* sp. 61-3, PhbR (también llamado PhaR) es un regulador transcripcional de los genes de síntesis de PHB. Además, similarmente a lo que ocurre en *A. vinelandii*, postulamos que PhbR (PhaR) se une a los posibles sitios R1 y R2, activando la expresión del posible primer promotor de *phbB* y reprimiendo el posible segundo promotor de *phbB*.

### **6.8 Búsqueda de consenso para RpoS en los promotores de *phbR* y *phbB* en *A. vinelandii***

En *A. vinelandii*, RpoS es crucial para la supervivencia en fase estacionaria y a largos periodos de tiempo; también, es clave para la formación de quistes resistentes a la desecación y resistencia a diversos tipos de estrés, como al peróxido de hidrógeno (Sandercook and Page., 2008; Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). En este trabajo, mediante las fusiones transcripcionales, se mostró que en la cepa silvestre *phbR* y *phbB* incrementan su expresión en fase estacionaria (Fig. 14 y Fig. 16); además, se observó que la mutación en el gen *rpoS* afecta negativamente la expresión de ambos genes,

revelando el papel que tiene RpoS sobre la transcripción de los genes clave en la producción de PHB.

Dado que en fase estacionaria, *phbR* depende de RpoS para su expresión, se buscó un posible consenso para promotores reconocidos por RpoS sobre los dos promotores de *phbR*. La figura 24 muestra que los promotores de *phbR* presentan consenso en el -10 para RpoD, y solo existe consenso en el -10 para RpoS en el primer promotor. Para que RpoS pueda activar un promotor, requiere elementos adicionales a los -10 y -35, como lo son el discriminador A/T, nucleótidos C y K (T/G) río arriba del -10 y espaciador rico en A ó T (Fig. 7 y Fig. 24). Por lo tanto, se sugirió que ambos promotores de *PhbR* son dependientes de RpoD y que RpoS activa la expresión de *phbR* de manera indirecta.

a)

Elemento - UP	-35	-10	+1	
AAWWWTWTTTTNAAAAA	-4pb- <u>TTGACANNNNNNNNNNN</u>	TRTGNTATAAT	-5-8pb-	RpoD
			+1	
	ATGGGCCCGGTCGCTTGGCGAGGCGGGATTTGCCGTAGGAGCT	<u>TAGAAT</u>	GCTCGATG	p <sub>R</sub> 1 <i>phbR</i>
AAWWWTWTTTT	-10pb-TTGACA	- 10 - 14 -	<u>TRKCTAYAAT</u>	TAA-2a5pb- RpoS

b)

Elemento - UP	-35	-10	+1	
AAWWWTWTTTTNAAAAA	-4pb- <u>TTGACANNNNNNNNNNN</u>	TRTGNTATAAT	-5-8pb-	RpoD
			+1	
	AGAGCGATGAATGGTCGTCCTGGCGCCAGAATCCTGTGTTTTGATATCGACT	T		p <sub>R</sub> 2 <i>phbR</i>
AAWWWTWTTTT	-10pb-TTGACA	- 10 - 14 -	<u>TRKCTAYAAT</u>	TAA-2a5pb- RpoS

Fig. 24. Comparación del consenso de promotores dependientes de RpoD y RpoS con los promotores de *phbR*. a) Comparación del promotor p<sub>R</sub>1 (en medio) con el consenso de promotores RpoD (arriba) y RpoS (abajo). b) Comparación del promotor p<sub>R</sub>2 (en medio) con el consenso de promotores RpoD (arriba) y RpoS (abajo). Los nucleótidos en subrayados muestra los consensos para el -10 y -35; las líneas verticales representan los nucleótidos conservados. R y Y denotan purinas (A/G) y pirimidinas (C/T) respectivamente, K es T/G, W es A/T. Los nucleótidos en gris y cursivas, muestran los inicios de transcripción. Los nucleótidos subrayados y en cursivas muestran el consenso para -10 dependiente de RpoS.

CAPÍTULO 6. Resultados y Discusión. Parte I Regulación transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC*

Los dos promotores de *phbB*, tienen conservado el elemento -10 con respecto a los promotores RpoD y a los dependientes de RpoS (Fig. 25); sin embargo, el segundo promotor p<sub>B</sub>2 tiene conservado el discriminador A/T, el nucleótido C río arriba del -10 y espaciador rico en A o T lo que sugiere que este promotor es dependiente de RpoS.

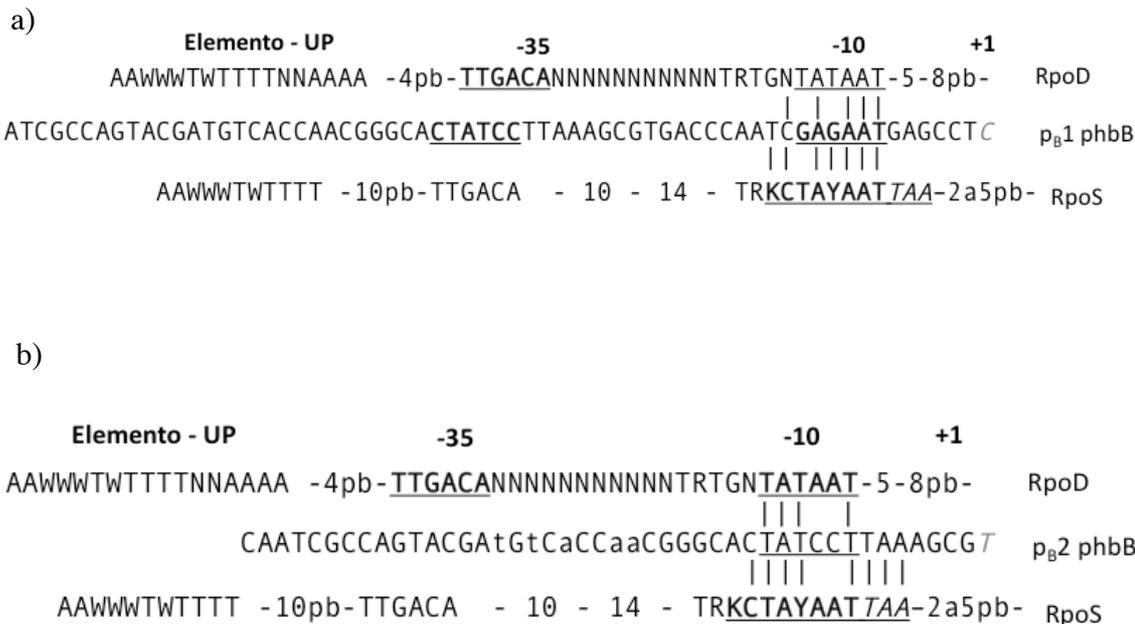


Fig. 25. Comparación del consenso de promotores dependientes de RpoD y RpoS con los promotores de *phbB*. a) Comparación del promotor p<sub>B</sub>1 (en medio) con el consenso de promotores RpoD (arriba) y RpoS (abajo). b) Comparación del promotor p<sub>B</sub>2 (en medio) con el consenso de promotores RpoD (arriba) y RpoS (abajo). Los nucleótidos subrayados son los consenso para el -10 y -35; las líneas verticales representan los nucleótidos conservados. R y Y denotan purinas (A/G) y pirimidinas (C/T) respectivamente, K es T/G, W es A/T. Los nucleótidos en gris y cursivas, muestran los inicios de transcripción. Los nucleótidos subrayados y en cursivas muestran el consenso para -10 dependiente de RpoS.

### 6.9 Modelo de regulación transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC* por RpoS y PhbR

Con los resultados mostrados en esta parte I, se puede proponer el siguiente modelo de regulación: La proteína RpoS de fase estacionaria, activa la expresión de gen *phbR*; y, dado que los dos promotores de este gen no presentan consenso para RpoS, la regulación pudiera ser indirecta. El segundo promotor de *phbB* ( $p_B2$ ) sí presenta consenso para RpoS, por lo que este regulador estaría activando de manera directa la transcripción de este promotor (Fig. 26). La mayoría de los reguladores transcripcionales AraC/XylS se autorregulan y en caso de PhbR sucede eso, ya que PhbR activa la expresión de su gen *phbR*. Sin embargo, dado que no observamos una interacción de PhbR con su región de regulación, sugerimos que se autoregula de manera indirecta o requiere de un coinductor para poder unirse a su región reguladora como el caso de AraC. Finalmente, dado que encontramos una interacción específica de PhbR con la región promotora de *phbB* (específicamente con R1 y R2), confirma que PhbR activa la expresión del promotor  $p_B1$  y reprime segundo promotor  $p_B2$  por superlapiamiento con las cajas R1 y R2 (Fig. 26).

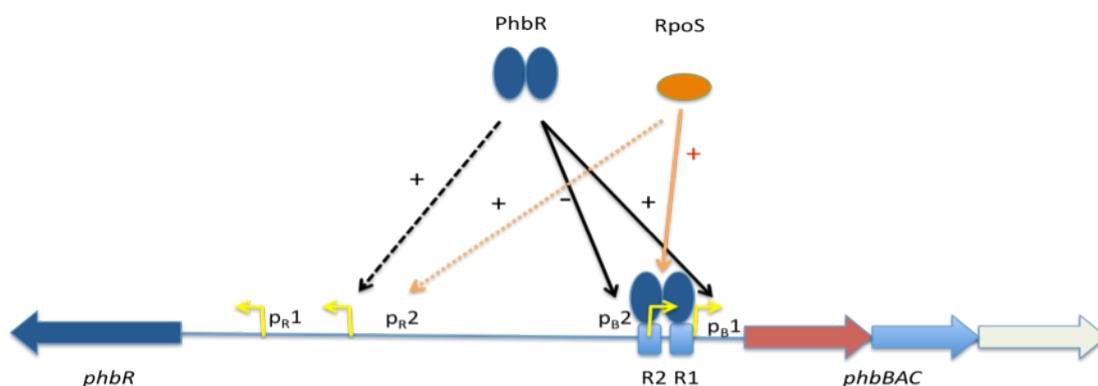


Fig. 26. Modelo de regulación transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*. Las líneas sólidas muestra la regulación directa y las líneas punteadas muestra una regulación indirecta.

CAPÍTULO 7. Resultados y Discusión

Parte II Regulación post-transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC*

7.1 Efecto de las mutaciones en el sistema “Rsm” en la producción de PHB

Mutaciones en los genes *gacA* y *gacS* (del sistema de dos componentes GacA/GacS) afectan de manera drástica la producción de PHB. Recientemente, se encontró que el sistema GacA/GacS activa la expresión de los genes *rsmZ1* y *rsmZ2* que codifican para RNAs reguladores que secuestran a la proteína de unión a RNA RsmA (Manzo *et al.*, 2011). Para saber si la regulación de GacA sobre el PHB es a través del sistema Rsm, se construyeron las cepas mutantes *rsmZ1*- y *rsmA*-, y se procedió a analizar su fenotipo en cuanto a la producción de PHB. La tabla 2 muestra la producción de PHB en las cepas *rsmA*- y *rsmZ1*- a 48 horas de cultivo en medio PY y la figura 27 muestra el fenotipo de opacidad.

Tabla 2. Producción de PHB

Cepa	Contenido PHB
	[ $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{g}$ proteína) <sup>-1</sup> ]
UW136	245 $\pm$ 15
<i>rsmA</i> -	286 $\pm$ 20
<i>rsmZ</i> -	100.5 $\pm$ 8.9

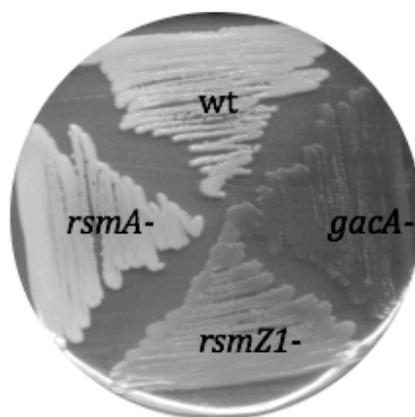


Fig. 27. Fenotipo de opacidad de la cepa silvestre y mutantes *rsmA*-, *rsmZ1*- y *gacA*-.

Como se muestra en la tabla 2 y figura 27, la cepa mutante *rsmA*- produce más PHB que la cepa silvestre (15 % aproximadamente). Sin embargo, la mutante *rsmZ1*- produce un 60 % menos PHB que la cepa silvestre. Los resultados anteriores muestran que el sistema “Rsm” participa en la regulación de la producción de PHB,

sugiriendo que RsmA y RsmZ1 pudieran estar controlando a nivel traduccional (por el mecanismo ya caracterizado): a) algún RNA mensajero que codifique un regulador transcripcional involucrado en la regulación transcripcional del operón *phbBAC* y del gen *phbR*, o b) de manera directa a estos RNAmensajeros (*phbBAC* y *phbR*).

### 7.2 La expresión de *phbR* y *phbB* se afecta en las mutantes *rsmA*- y *rsmZ1*-

El sistema Rsm participa en la regulación de la producción de PHB en *A. vinelandii*. Para saber si los genes de PHB (*phbR* y *phbBAC*) son los blancos de regulación del sistema Rsm, se cuantificó la expresión de los genes *phbR* y *phbB* por RT-qPCR en las cepas silvestre, *rsmA*-, *rsmZ1*- y *gacA*- en fase estacionaria. En la figura 28 se muestran los perfiles de expresión de los genes *phbR* (a) y *phbB* (b).

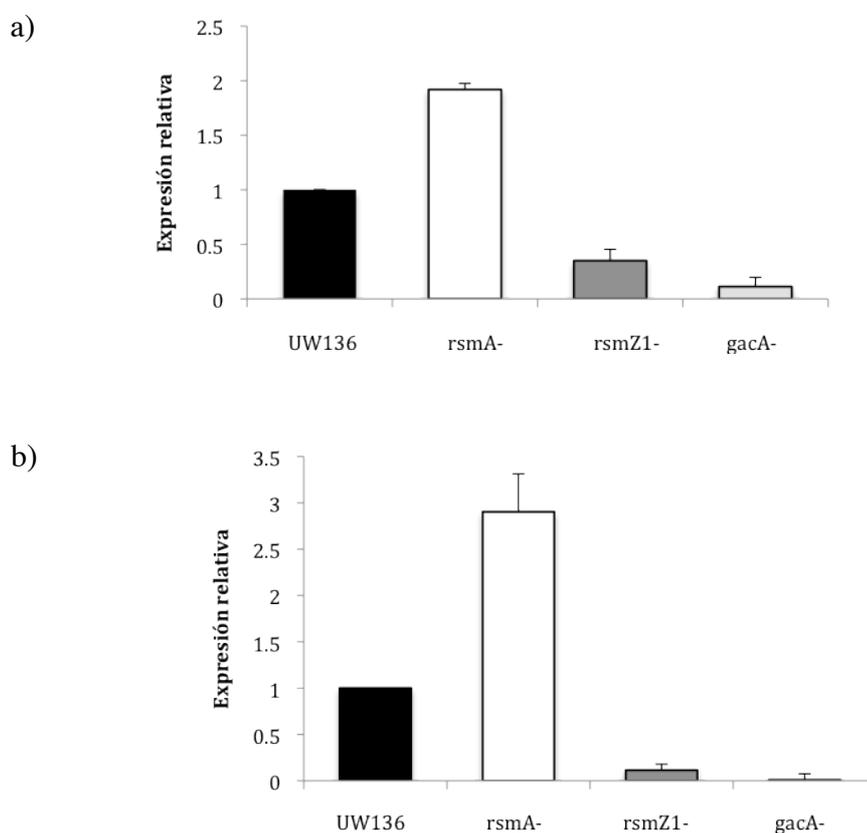


Fig. 28. Cuantificación de la expresión de *phbR* (a) y *phbB* (b).

Como se creía, en la figura 28 a se observa que la cantidad de RNAm de *phbR* en las cepas mutantes *rsmZ1*- y *gacA*- disminuye drásticamente (barras gris fuerte y gris

tenue, respectivamente), mientras que en la mutante *rsmA*- se incrementa con respecto a la cepa silvestre UW136 (barras blancas y negras). La disminución en la cantidad de RNAm en la cepa *gacA*- concuerda con los resultados observados por Peralta-Gil (2004), donde en experimentos cualitativos tipo nucleasa S1 se observó una disminución de la cantidad de transcrito (ver antecedentes, pág. 15) . Por otro lado, el efecto negativo en el transcrito en la cepa *rsmZ1*- sugiere que, al no estar presente RsmZ1 -RNA regulatorio- no puede titular a la proteína RsmA, la cual estaría ejerciendo un efecto sobre la estabilidad de este mensajero, lo que lo llevaría a degradación. Lo anterior es apoyado también por el efecto positivo en la cantidad de mensajero en la cepa *rsmA*-, donde al no estar presente el efecto negativo RsmA la cantidad de RNAm de *phbR* es casi el doble que en la cepa silvestre.

En la figura 28 b, se muestra como la expresión del gen *phbB* se abate completamente en la cepa *gacA*-, mientras que en la cepa *rsmZ1*- también hay una disminución muy drástica del transcrito. Sin embargo, de manera contraria a las cepas *gacA*- y *rsmZ1*-, en la cepa *rsmA*- se observa un aumento en la cantidad de RNAm con respecto a la cepa silvestre. Al igual que en la cuantificación de *phbR* en la cepa *gacA*-, la cuantificación de *phbB* en la misma cepa concuerda con los resultados obtenidos por Peralta-Gil (2004) donde en experimentos cualitativos tipo nucleasa S1 el transcrito de *phbB* no se detecta completamente a partir de sus dos promotores. El efecto negativo sobre el transcrito de *phbB* en la mutante *rsmZ1*-, igualmente sugiere que al no estar RsmZ1 -RNA regulatorio- la proteína RsmA estaría libre y ella ejercería un efecto negativo sobre la estabilidad del transcrito de *phbB*. Cabe recordar que si RsmA no está, el efecto sería contrario a la mutante *rsmZ1*- y, precisamente eso es lo que se observa en la cuantificación del transcrito de *phbB* en la mutante *rsmA*-, donde aumenta casi tres veces más que la cepa silvestre. Otra posibilidad para explicar la disminución y el aumento del transcrito de *phbB* en las mutantes del sistema “Rsm” es que este sistema esté controlando a nivel post-transcripcional la expresión del gen *phbR*, el cual es un activador transcripcional del operón de PHB *phbBAC*.

### 7.3 Diseño y construcción de fusiones génicas

Con el objetivo de conocer si el sistema Rsm controla los genes de la síntesis de PHB a nivel transcripcional o post-transcripcional, se construyeron fusiones transcripcionales y traduccionales con el gen reportero *gusA*. Para las fusiones transcripcionales se usó solo la región promotora de los genes *phbR* y *phbB* (fig. 29a). Dado que la proteína RsmA se une a las región 5'-no traducida de los RNA mensajeros, para construir las fusiones traduccionales, se usaron la región promotora, la región 5'-no traducida y parte de la región codificante de los genes *phbR* y *phbB* (Fig. 29b).

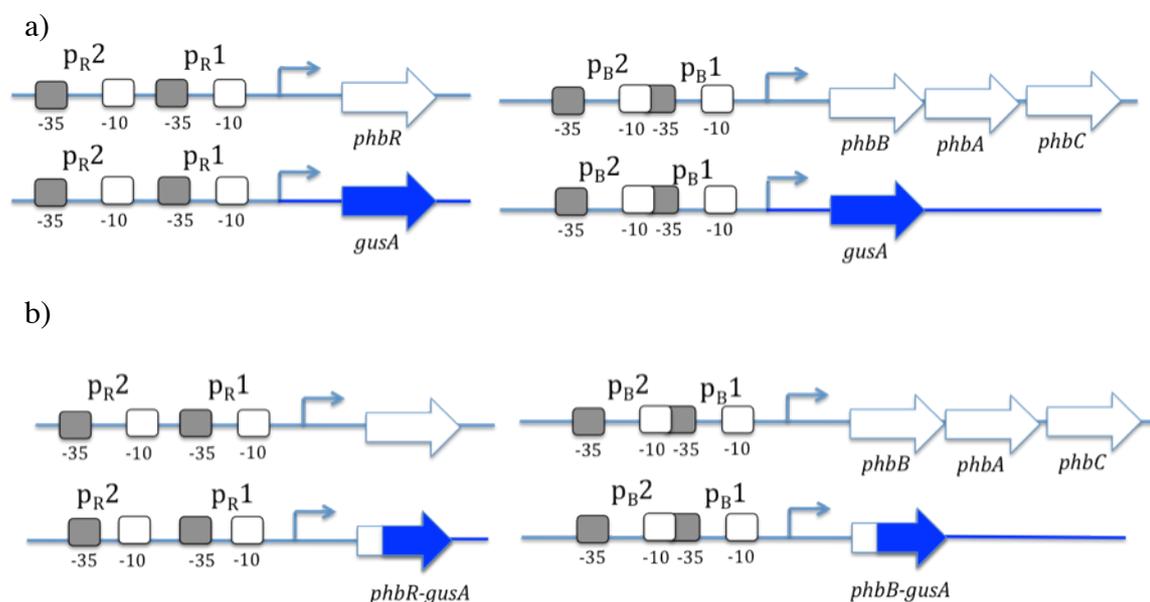


Fig. 29. Representación esquemática de fusiones génicas con el gen reportero *gusA*.

Los cuadros grises y blancos representan las secuencias -10 y -35 de los promotores. a) Fusiones transcripcionales *p<sub>R</sub>1-2::gusA* y *p<sub>B</sub>1-2::gusA*. b) Fusiones traduccionales *phbR-gusA* y *phbB-gusA*.

Las fusiones transcripcionales (*p<sub>R</sub>1-2::gusA* y *p<sub>B</sub>1-2::gusA*) y traduccionales (*phbR-gusA* y *phbB-gusA*) se introdujeron en las cepas UW136, *rsmA*-, *rsmZ1*- y *gacA*- por doble recombinación. Se usó un gen que codifica para una posible transposasa como región neutra para integrar las fusiones génicas.

#### 7.4 El sistema Rsm controla post-transcripcionalmente la expresión del gen *phbR*

Para saber si el sistema Rsm tiene como blanco al gen *phbR*, se usaron las cepas UW136, *rsmA*<sup>-</sup>, *rsmZ1*<sup>-</sup> y *gacA*<sup>-</sup> con las fusiones  $p_{R1-2}::gusA$  (transcripcional) y *phbR-gusA* (traduccional). La expresión de *phbR* fue monitoreada *in vivo* mediante una cinética de actividad de la  $\beta$ -glucoronidasa (producto del gen *gusA*) en las cepas antes mencionadas. La cinética de actividad de la fusión transcripcional  $p_{R1-2}::gusA$  se muestra en la figura 30.

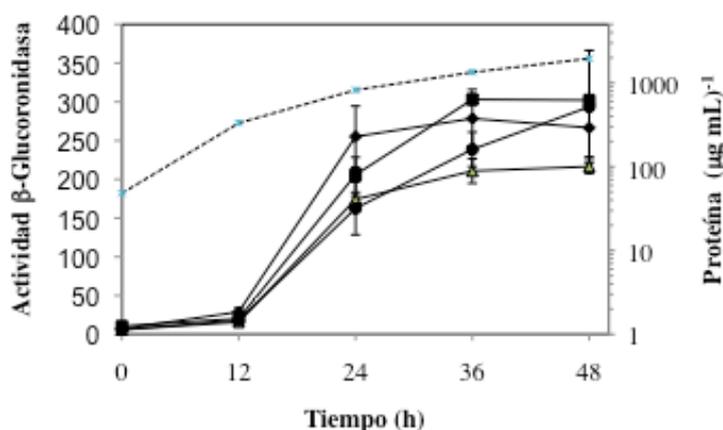


Fig. 30. Fusión transcripcional  $p_{R1-2}::gusA$ . Crecimiento (línea punteada) y actividad de  $\beta$ -glucoronidasa (líneas sólidas). UW136 (silvestre) líneas con rombos, *rsmA*<sup>-</sup> líneas con círculos, *rsmZ1*<sup>-</sup> líneas con triángulos y *gacA*<sup>-</sup> líneas con cuadros.

En la cepa silvestre, la expresión del gen *phbR* se incrementa en fase estacionaria, llegando a un máximo a las 36 h (Fig. 30, líneas con rombos). En la mutante *rsmA*<sup>-</sup> se observa que la expresión de *phbR* se incrementa en fase estacionaria, siendo menor que la cepa silvestre a las 24 h, pero igualando a la cepa silvestre en los tiempos finales (Fig. 30, líneas con círculos). De manera similar a la cepa silvestre y *rsmA*<sup>-</sup>, en la mutante *rsmZ1*<sup>-</sup> se observa que *phbR* se incrementa en fase estacionaria, manteniendo su expresión hasta las 48 h (Fig. 30, líneas con triángulos). Aunque la expresión de *phbR* en la cepa *rsmZ1*<sup>-</sup> es un poco menor que la que cepa silvestre, sugerimos que no hay una diferencia significativa. Finalmente, la cepa *gacA*<sup>-</sup> muestra una cinética similar a la cepa silvestre (Fig. 30, líneas con cuadrados).

El gráfico 30 sugiere que el sistema Rsm no controla la transcripción de *phbR*.

Dado que no observamos un efecto sobre la transcripción del gen *phbR* en las mutantes Rsm, analizamos la cinética de actividad de la fusión traduccional *phbR-gusA* en los fondos genéticos antes mencionados (Fig. 31).

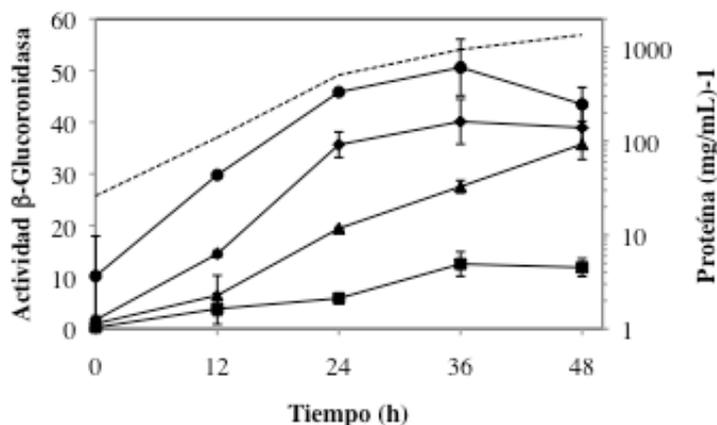


Fig. 31. Fusión traduccional *phbR-gusA*. Crecimiento (línea punteada) y actividad de  $\beta$ -glucoronidasa (líneas sólidas). UW136 (silvestre) líneas con rombos, *rsmA*- líneas con círculos, *rsmZ1*- líneas con triángulos y *gacA*- líneas con cuadros.

En la figura 31 se observa que la cepa UW136 incrementa la expresión de *phbR* en fase estacionaria llegando a un máximo a las 36 h (líneas con rombos). En la cepa *rsmA*- la expresión de *phbR* es mayor que en la UW136 en fase exponencial y estacionaria temprana, llegando a ser igual que la cepa silvestre a las 48 h. No obstante, la cepa *rsmZ1*- muestra un incremento en la expresión de *phbR* en fase estacionaria pero no es igual a la cepa silvestre durante toda la cinética de crecimiento. Por último, la cepa *gacA*- muestra un leve incremento de expresión de *phbR* en fase estacionaria.

El resultado de la figura 31, sugiere que el sistema Rsm controla post-transcripcionalmente la expresión del gen *phbR*. Esto es porque, en la mutante *rsmA*- donde no se encuentra el regulador negativo RsmA- se incrementa la expresión del gen *phbR*; mientras donde no está el RNA regulatorio RsmZ1 se disminuye la expresión de *phbR*. Como se mencionó en los antecedentes, en *A. vinelandii* GacA activa la expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2*; además, existen otros 5 genes que codifican para posibles RNAs regulatorios de tipo *rsmZ* (3-7) y presentan en su región de

regulación secuencias consenso para el pegado de GacA, sugiriendo que estos genes también son activados por GacA. El efecto negativo sobre la expresión de *phbR* en la mutante *gacA*-, pudiera deberse a que al no estar presente el regulador de respuesta GacA, no hay expresión de los genes que codifican para los RNAs regulatorios (*rsmZ1-7*) provocando que la proteína RsmA (el efector negativo) se encuentre libre y posiblemente se una al RNAm de *phbR* inhibiendo su traducción y provocando su degradación. Esta hipótesis resultaría en un efecto negativo sobre la transcripción del gen *phbB*.

### 7.5 *phbB* es regulado a nivel transcripcional por el sistema Rsm a través de PhbR.

Dado que el sistema Rsm controla a nivel post-transcripcional la expresión de *phbR* y que PhbR es el activador transcripcional del operón *phbBAC*, analizamos con la fusión transcripcional  $p_B1-2::gusA$  la expresión de *phbB* en las cepas UW136, *rsmA*-, *rsmZ1*- y *gacA*- (Fig. 32).

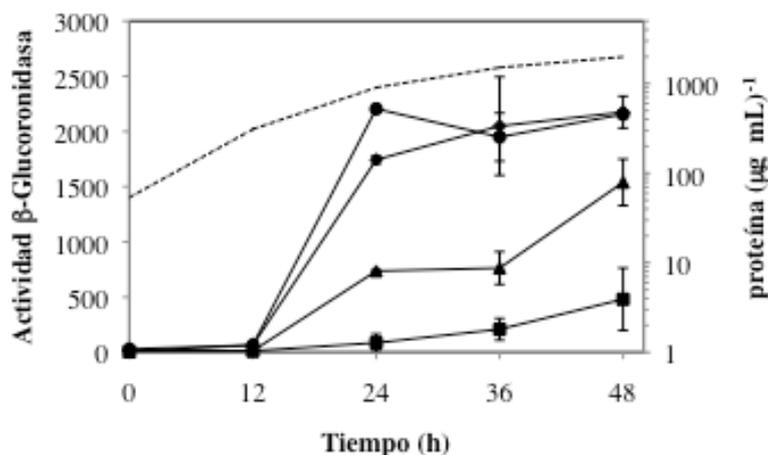


Fig. 32. Fusión transcripcional  $p_B1-2::gusA$ . Crecimiento (línea punteada) y actividad de  $\beta$ -glucoronidasa (líneas sólidas). UW136 (silvestre) líneas con rombos, *rsmA*- líneas con círculos, *rsmZ1*- líneas con triángulos y *gacA*- líneas con cuadros.

En la cepa silvestre, la expresión del gen *phbB* se incrementa considerablemente en fase estacionaria (Fig. 32, línea con rombos). La expresión de *phbB* en la cepa *rsmA*- también se incrementa en fase estacionaria, hasta un 30 % más que la cepa silvestre

en estacionaria temprana, llegando a ser similar a la silvestre en las últimas horas de cultivo (Fig. 32, líneas con círculos). No obstante, en la cepa *rsmZ1*- la expresión del gen *phbB* disminuye mas del 50 % en fase exponencial con respecto a la cepa silvestre (Fig. 32, líneas con triángulos). Es preciso señalar que en la cepa *gacA*-, la expresión de *phbB* en muy baja con respecto a la cepa silvestre, solo hay un leve aumento al final del cultivo (Fig. 32, líneas con cuadros).

El incremento en la expresión del gen *phbB* en la cepa *rsmA*-, se debe a que la proteína RsmA regula post-transcripcionalmente la expresión del activador transcripcional PhbR. Lo anterior, también se sustenta por el efecto negativo en la expresión del gen *phbB* en la cepa *rsmZ1*-. Al no estar el RNA regulatorio RsmZ1, RsmA está parcialmente libre ejerciendo su efecto negativo sobre la traducción de el RNAm de *phbR*, y por lo tanto disminuyendo la expresión del gen *phbB*. En la mutante *gacA*-, no se encuentran los RNAs regulatorios y por lo tanto, RsmA está completamente libre ejerciendo su efecto negativo sobre el RNAm de *phbR*, y sobre la transcripción de *phbB*.

Se analizó también la expresión de *phbB* mediante la fusión traduccional *phbB-gusA* en los fondos genéticos UW136, *rsmA*-, *rsmZ1* y *gacA*-. La figura 33 muestra la cinética de expresión de *phbB* con la fusión traduccional.

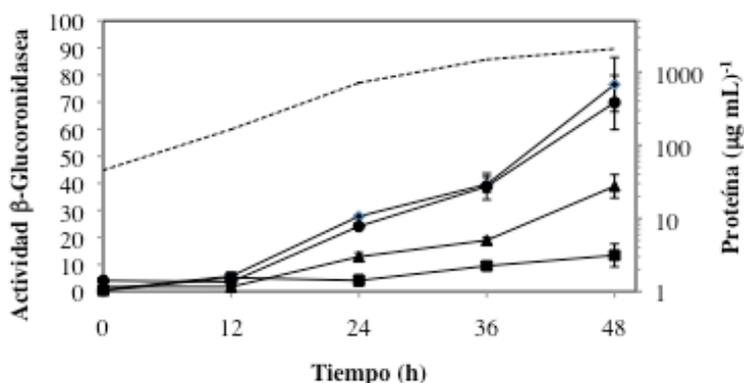


Fig. 33. Fusión traduccional *phbB-gusA*. Crecimiento (línea punteada) y actividad de  $\beta$ -glucoronidasa (líneas sólidas). UW136 (silvestre) líneas con rombos, *rsmA*- líneas con círculos, *rsmZ1*- líneas con triángulos y *gacA*- líneas con cuadros.

La cinética de expresión de *phbB* analizada con la fusión traduccional *phbB-gusA* en las cepas *UW136*, *rsmA-*, *rsmZ1* y *gacA-*, muestra la misma tendencia que con la fusión transcripcional  $p_B1-2::gusA$  (Fig. 32 y Fig. 33). En la figura 33 se muestra una disminución de expresión de *phbB* en las cepas *rsmZ1-* y *gacA-* con respecto a la cepa silvestre, mientras que la cepa *rsmA-* muestra una tendencia similar a la cepa silvestre. Dado que el sistema Rsm controla post-transcripcionalmente al activador PhbR, y que por lo tanto se afecta a nivel transcripcional la expresión de *phbB*, con la fusión traduccional *phbB-gusA* no logamos saber si el sistema Rsm también controla post-transcripcionalmente de manera directa (la fusión traduccional *phbR-gusA* lleva los elementos de regulación post-transcripcional y transcripcional).

Para saber si el efecto de las mutaciones *rsmA-*, *rsmZ1-* y *gacA-* sobre la concentración del RNAm de *phbR* y *phbB* se debe a que el sistema Rsm controla de manera directa a los RNAm de *phbR* y *phbB*, se procedió a determinar la presencia de posibles sitios de unión de RsmA sobre los RNAm y se realizaron experimentos tipo EMSA (RNA-proteína).

### **7.6 Búsqueda de posibles sitios de pegado de RsmA sobre *phbR* y *phbB*, y análisis de plegamiento de RNAm mediante el programa Mfold**

Con la finalidad de conocer si existen posibles sitios de unión de la proteína RsmA sobre los mensajeros de *phbR* y *phbB* se analizó la secuencia 5'- no traducida de ambos mensajeros. El homólogo de RsmA en *E. coli* CsrA, reconoce y se une a secuencias SELEX RUACARGGAUGU ( donde R es A o G, y la secuencia GGA es importante para la interacción RNA-proteína) en la región 5' no traducida del RNAm, especialmente las que están sobrelapando el sitio de unión a ribosoma (Shine-Dalgarno, SD). Otra característica importante de los sitios de unión de RsmA es que en la región líder se forman estructuras secundarias tipo tallo y asa, y el motivo GGA está localizado en el asa de la estructura (Lapouge *et al.*, 2007). En *A. vinelandii*, solo se ha reportado al RNAm del gen *algD* como blanco de RsmA (CsrA) y se propone que el RNA solo tiene un sitio de unión a RsmA AAAUAAGGACGA sobrelapando el SD (Manzo *et al.*, 2011). Cabe mencionar que el líder del gen *phbR* tiene 4 posibles sitios de unión a RsmA (cada uno de ellos tiene el motivo GGA), uno de ellos sobrelapando el SD (llamados aquí *phbR1* (sobrelapa SD), *phbR2*, *phbR3* y *phbR4* )

(Fig. 34a); mientras que el líder del gen *phbB* tiene 2 posibles sitios de unión a RsmA (los dos tienen el motivo GGA) (llamados aquí phbB1 (sobrelapa el SD) y phbB2 ), uno sobrelapando el SD (secuencias comparadas con la secuencia SELEX de *E. coli*) (Fig. 34b).



Fig. 34. Posibles sitios de unión de RsmA en la región líder de *phbR* (a) y *phbB* (b).

La secuencia arriba de la región 5'-no traducida del RNAm de *phbR* o *phbB* es la secuencia SELEX para la unión de CsrA. La secuencia debajo de la región 5'-no traducida del RNAm de *phbR* o *phbB* es la secuencia propuesta de pegado de la proteína RsmA sobre el RNAm de *algD* de *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011). El rectángulo muestra el motivo GGA y las líneas verticales resaltan los nucleótidos conservados.

Los sitios propuestos para la unión de RsmA sobre la región 5'- no traducida de los RNAm de *phbR* y *phbB*, presentan varios nucleótidos conservados con respecto a la secuencia SELEX de *E. coli* y al posible sitio de unión de RsmA sobre el RNAm de *algD* (Fig. 34). Varios autores sugieren que es muy importante el motivo GGA en el RNAm para el reconocimiento de la proteína RsmA. Sin embargo, los nucleótidos alrededor del motivo GGA también son muy importantes para la formación de la estructura tallo-asa y la interacción RNA-RsmA.

Para saber si la región 5'- no traducida de los RNAm de *phbR* y *phbB* forman estructuras tallo-asa y si junto a ella se encuentra el motivo GGA, se analizó el posible plegamiento de los RNAm mediante el programa Mfold (Zucker, 2003). Como control de plegamiento se utilizó la región líder del gen *hcnA* (codifica para la subunidad A de la cianidin hidrogeno sintasa) de *Pseudomonas fluorescens*, que tiene 5 motivos GGA, uno de ellos sobrelapando el SD y de los cuales 3 de los sitios ya se ha demostrado experimentalmente que son sitios de unión a RsmA (Lapouge *et al.*, 2007). En la figura 35 se muestran las posibles estructuras secundarias para las regiones 5'-no traducidas de *phbB* (a) y *phbR* (b).

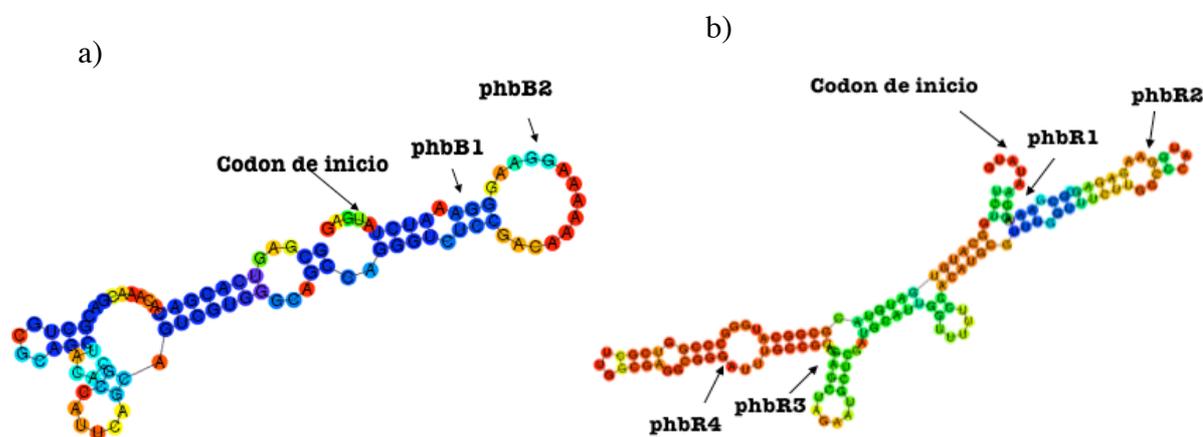


Fig. 35. Posibles estructuras secundarias de los RNAs líderes de *phbB* y de *phbR*. a) *phbB1*, y *phbB2* son los motivos GGA. b) *phbR1*, 2, 3 y 4 son los motivos GGA. presentes en la estructura predicha.

El tipo de plegamiento predicho para el líder de *phbB* muestra (Fig. 35a), que mientras el primer motivo *phbB1* se encuentra en una posible estructura tipo tallo, el segundo motivo *phbB2* se encuentran localizados en una asa de la posible estructura secundaria. Lo anterior, sugiere que el motivo *phbB2* es el posible sitio de unión de RsmA al líder de *phbB*. Como se observa en la figura 35b, el plegamiento predicho para el líder de *phbR* muestra que los motivos *phbR1* (que sobrelapa al SD) y *phbR3* están presentes en posibles estructuras tipo tallo. Por otro lado los motivos *phbR2* y *phbR4*, están presentes en estructuras tipo asas. Lo anterior sugiere que en este posible modelo los motivos *phbR2* y *phbR4* podrían ser los sitios más potenciales de unión a RsmA.

### **7.7 Experimentos de interacción *in-vitro* RNA-proteína y EMSA**

Con la finalidad de conocer si la proteína RsmA se une al líder de *phbR* y de *phbB* se llevaron a cabo experimentos de interacción *in-vitro* de RNA-proteína. Para tales experimentos se utilizó RNAs procedentes de la transcripción *in-vitro* marcados radiactivamente con  $\alpha$ -P<sup>32</sup>CTP y diferentes concentraciones de la proteína RsmA purificada. La figura 36 muestra la autorradiografía del experimento tipo EMSA para el RNA líder de *phbR*.

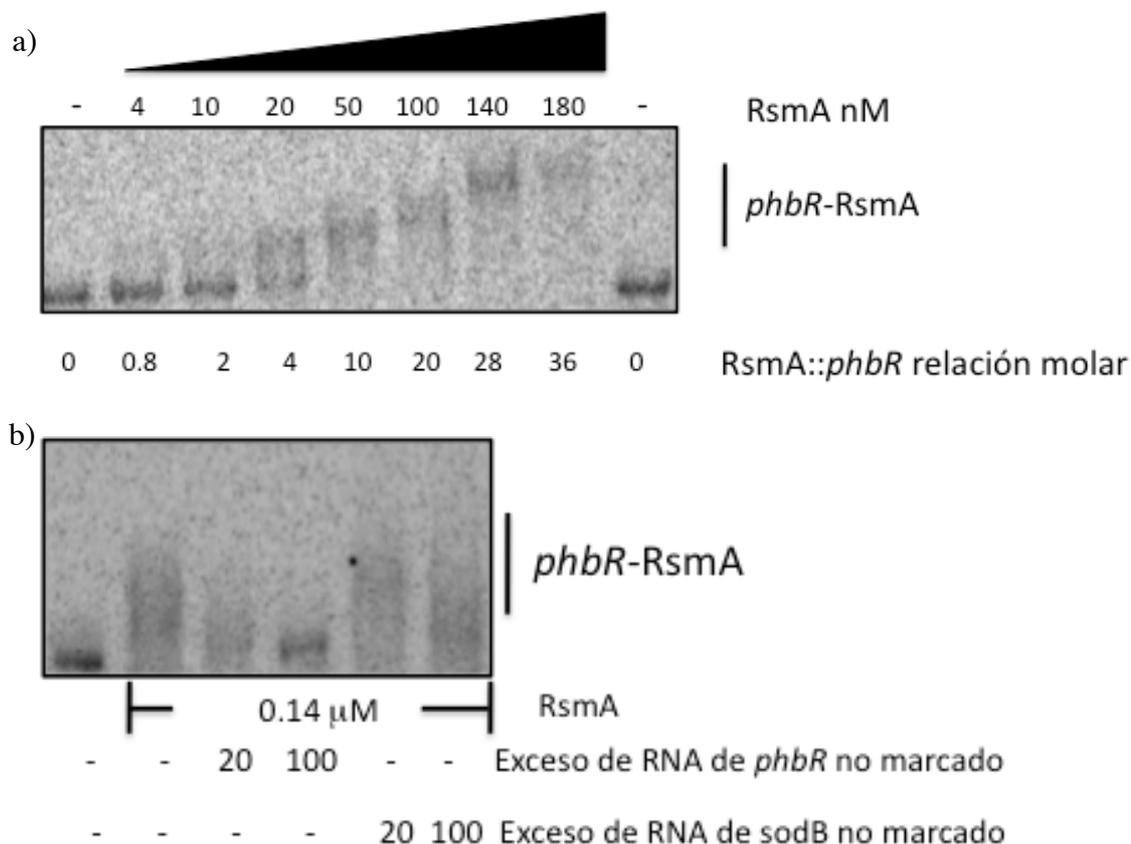


Fig. 36. Ensayo de retardo de la movilidad en gel (EMSA) del líder de *phbR*. a) En la parte superior se muestran las cantidades de proteínas utilizadas en la interacción. La línea vertical y la leyenda *phbR*-RsmA señalan los complejos RNA-proteína. En la parte inferior se muestra la relación molar. b) Control de competencia. Para el experimento se usó RNA de *phbR* frío como competidor específico y RNA de *sodB* frío como competidor inespecífico. La línea vertical y la leyenda *phbR*-RsmA señalan los

En la figura 36 se observa como es que la banda correspondiente al líder de *phbR* comienza a retardarse a concentraciones mayores de RsmA de 10 nM, formándose varios complejos retardados de RNA-proteína. Cabe mencionar, que el líder de *phbR* tiene 4 motivos GGA los cuales son potenciales sitios de pegado de RsmA, de los cuales uno de ellos sobrelapa el sitio de pegado al ribosoma. Debido a lo anterior, y que en la figura 36 observamos varios complejos retardados, se puede sugerir que la proteína RsmA se une *in vitro* al líder de *phbR* en varios, de los 4 posibles sitios. En el

experimento control (36 b), observamos una competencia del RNA frío de *phbR* (no marcado) con el RNA marcado de *phbR* por RsmA, ya que al agregar un exceso de RNA frío desaparecen los complejos retardados. Sin embargo, no observamos una competencia del RNA inespecífico con el RNA de *phbR* por RsmA, lo cual muestra que la interacción del RNA de *phbR* con RsmA es específica.

El resultado del EMSA para el líder de *phbB* se encuentra en la figura 37.

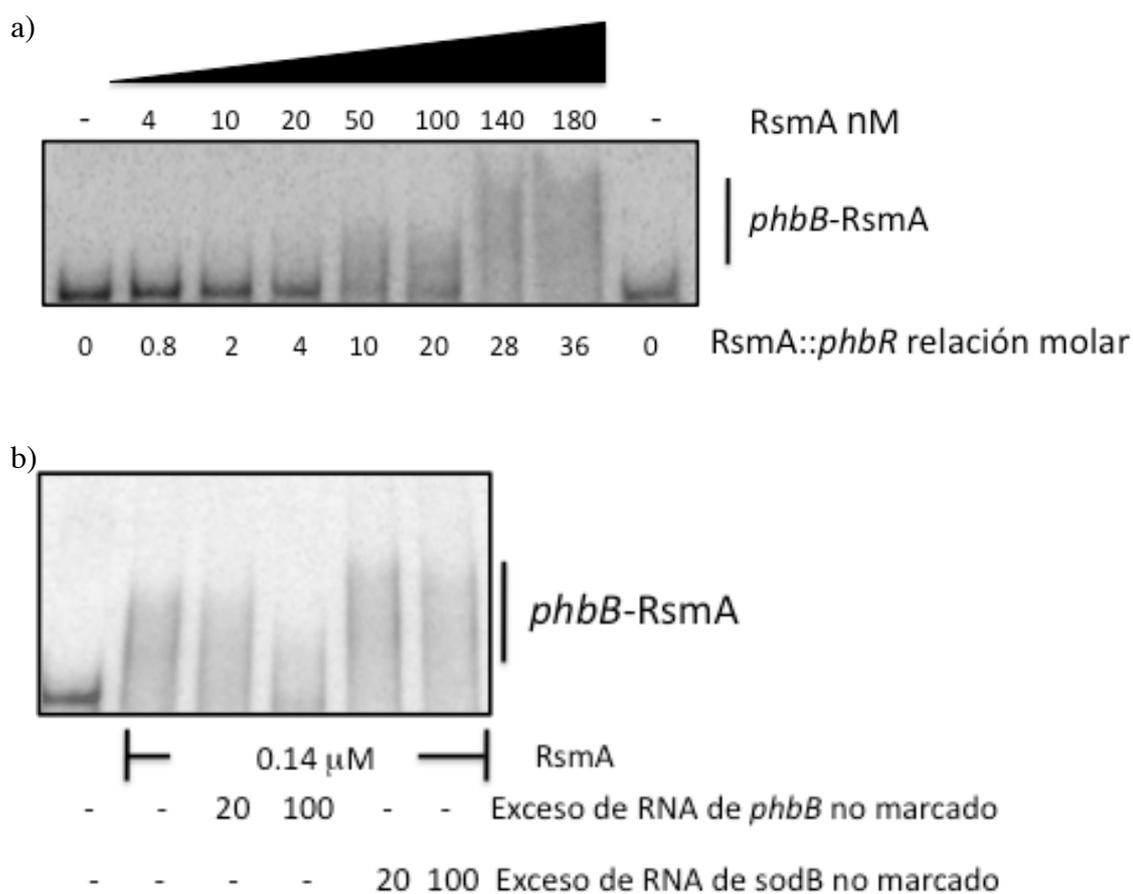


Fig. 37. Ensayo de retardo de la movilidad en gel (EMSA) del líder de *phbB* (a) y control negativo (b). En la parte superior se muestran las cantidades de proteínas utilizadas en la interacción. La línea vertical y la leyenda *phbB*-RsmA señalan los complejos RNA-proteína. En la parte inferior se muestra la relación molar. b) Control de competencia. Para el experimento se usó RNA de *phbB* frío como competidor específico y RNA de *sodB* frío como competidor inespecífico. La línea vertical y la leyenda *phbR*-RsmA señalan los complejos RNA-proteína.

Como se observa en la figura 37 a), el retardo en la movilidad del RNA líder de *phbB* se comienza a retardar a partir de concentraciones mayores a 20 nM de RsmA. A partir de 20 a 50 nM de RsmA, se empieza a notar un complejo de retardo RNA-proteína e inicia a desaparecer la forma libre del transcrito. Dado que el líder de *phbB* contiene 2 motivos GGA, potenciales sitios de unión a RsmA, y uno de esos motivos está sobrelapando el sitio de unión al ribosoma, se sugiere que al menos ese sitio es el reconocido *in vitro* por RsmA. En el experimento control (37 b), observamos una competencia del RNA frío de *phbB* (no marcado) con el RNA marcado de *phbB* por RsmA, ya que al agregar un exceso de RNA frío desaparecen los complejos retardados; sin embargo, no observamos una competencia del RNA inespecífico con el RNA de *phbB* por RsmA, lo cual muestra que la interacción del RNA de *phbB* con RsmA, también es específica.

### **7.8 Análisis de la estabilidad del RNAm de *phbR* y *phbB***

Con la finalidad de conocer si el efecto regulador del sistema Rsm sobre los genes de PHB (*phbR* y *phbBAC*) es porque la proteína RsmA se une los RNA mensajeros provocando su inestabilidad y degradación, se llevó a cabo un análisis de la abundancia y estabilidad del RNAm de *phbR* en las cepas silvestre y *rsmA*<sup>-</sup>. Para este análisis, se tomaron los cultivos en fase estacionaria y se detuvo la transcripción con rifampicina. A partir de ese momento se tomaron muestras a diferentes tiempos y con ellas, se procedió a cuantificar la cantidad de RNAm por RT-qPCR.

El resultado de la cuantificación y estabilidad de los RNA mensajeros de *phbR* y *phbB* en las cepas silvestre y *rsmA*<sup>-</sup>, con sus diferentes tiempos se muestra en la figura 38 (a y b, respectivamente).

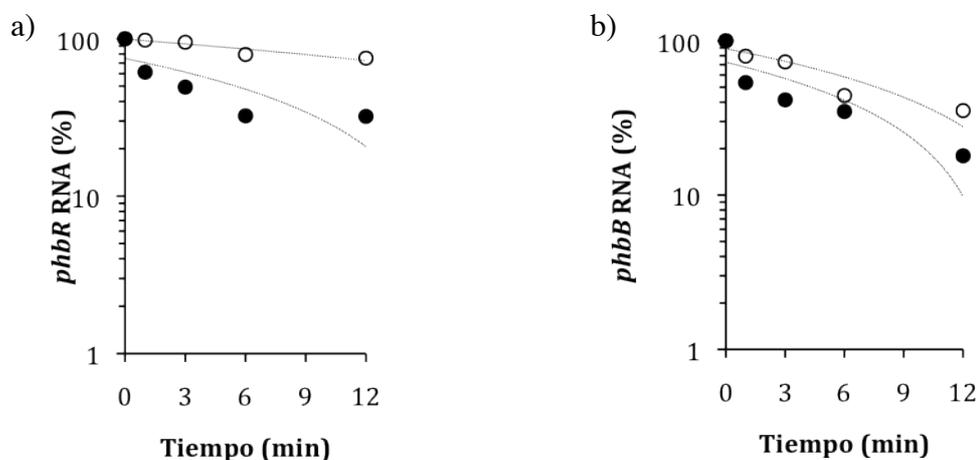


Fig. 38. Estabilidad del RNAm de *phbR* (a) y *phbB* (b). Los círculos llenos muestran el decaimiento del RNAm en la cepa silvestre (●) y los círculos vacíos muestran el decaimiento del RNAm en la cepa *rsmA*<sup>-</sup> (○). Las líneas punteadas muestran la tendencia de los puntos.

Como se muestra en la figura 38a, el RNAm de *phbR* en la cepa silvestre (●) en 1 minuto decae un 40 % y en 3 minutos decae aproximadamente un 50 %, en 6 minutos un 70 % y en 12 minutos un 75 %. Por otro lado, en la cepa mutante *rsmA*<sup>-</sup> (○) se observa que en los primeros 3 minutos el RNAm de *phbR* se mantiene muy estable, es hasta los 6 minutos solo decae 25 %, en 12 minutos un 30 % y en 24 minutos un 80%. De igual manera, la cantidad de RNAm de *phbB* en la cepa silvestre disminuye un 50% en el primer minuto después de la adición de rifampicina (Fig. 38b, ●), 60 % menos en el minuto 3, 75 % menos en el minuto 6 y 85 % menos en el minuto 12. Sin embargo, en la cepa *rsmA*<sup>-</sup> el RNAm de *phbB* es más estable, ya que en el primer minuto el mensajero solo decae un 10 % (Fig. 38b, ○), 20 % en el minuto 3, 45 % en el minuto 6 y 60 % en el minuto 12.

El resultado de la figura 38a sugiere fuertemente que la proteína RsmA al unirse al RNAm de *phbR* ejerce un efecto negativo provocando su rápida degradación. Lo anterior por que en la mutante *rsmA*<sup>-</sup> donde no se encuentra la proteína RsmA (el efector negativo), el RNAm de *phbR* es muy estable en los primeros 12 minutos (solo

decae un 30 %), mientras que en la cepa silvestre decae un 75 % (figura 38a, ● contra ○). Al ser más estable el RNAm de *phbR* en la cepa *rsmA*<sup>-</sup>, éste se traduce más, aumentando la cantidad de PhbR. Al existir mayor cantidad del activador transcripcional PhbR, la transcripción del operón *phbBAC* aumenta, reflejándose en el incremento del PHB. Cabe mencionar que en la última medición (24 minutos, dato no mostrado) la cantidad de RNAm llega a ser similar en ambas cepas (silvestre y *rsmA*<sup>-</sup>). Similarmete a lo que ocurre con el RNAm de *phbR*, en la figura 38b se muestra como la proteína RsmA ejerce un efecto negativo sobre la estabilidad del RNAm de *phbB*. Lo anterior es debido a que, el decaimiento del *phbB* es más rápido en la cepa silvestre, mientras que en la cepa mutante *rsmA*<sup>-</sup> (donde la proteína RsmA no se encuentra presente) *phbB* es más estable (figura 38b, ● contra ○; 1, 3, 6 y 12 min). Lo anterior se muestra en los primeros 12 minutos, donde en la cepa silvestre el RNAm decae hasta un 85 % (con respecto al inicio) a diferencia de la cepa *rsmA*<sup>-</sup> donde decae un 60 %. Al ser más estable el RNAm del operón *phbBAC* en los primeros minutos, el mensajero de dicho operón se transcribe más, provocando un aumento en las enzimas de la biosíntesis de PHB dando como resultado un incremento en la producción y acumulación de PHB.

### 7.9 Fenotipo de la doble mutante *rsmA*<sup>-</sup>/*gacA*<sup>-</sup>.

En *A. vinelandii*, la mutación en *gacA*<sup>-</sup> afecta drásticamente la acumulación de PHB. Así mismo, el sistema de dos componentes GacS/GacA activa la transcripción de los genes *rsmZ1-7* y posiblemente *rsmY1-2*, los cuales codifican para pequeños RNAs regulatorios. Por otro lado, RsmZ1 antagoniza el efecto negativo que ejerce la proteína RsmA sobre los RNAm de *phbR* y *phbB*, al secuestrar a la proteína RsmA dejando libre los RNAmensajeros para ser traducidos. Los resultados sugieren la siguiente vía de regulación: el efecto negativo en PHB de la cepa *gacA*<sup>-</sup> se debe a la ausencia de los 9 RNAs Rsm, donde RsmA al estar libre ejercería su efecto negativo sobre la estabilidad del los RNAm de *phbR* y *phbB* provocando su rápida degradación afectando fuertemente la producción de PHB. Para comprobar lo anterior se procedió a construir la cepa doble mutante *rsmA*<sup>-</sup>/*gacA*<sup>-</sup>, donde de acuerdo con el modelo se esperaría que la mutación *gacA*<sup>-</sup> en el fondo genético *rsmA*<sup>-</sup> no afecte la producción

de PHB siendo el fenotipo similar a la *rsmA*- o a la cepa silvestre. La figura 39 exhibe el fenotipo de la cepa doble mutante *rsmA*-/*gacA*-.

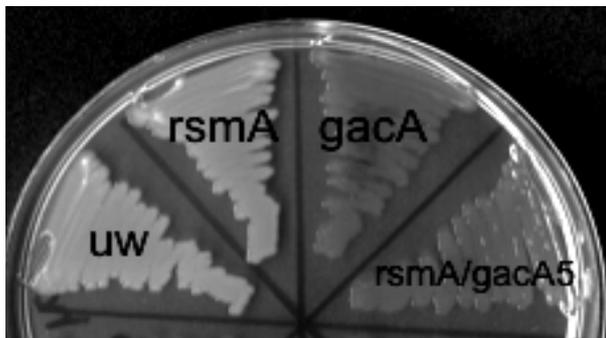


Fig. 39. Fenotipo de opacidad de la cepa doble mutante *rsmA*-/*gacA*-.

Contrario a lo que se esperaba al modelo propuesto, el fenotipo de opacidad en las cepas mutantes *rsmA*-/*gacA*- muestra que la mutación en el gen *gacA* es dominante sobre la mutación en el gen *rsmA* (Fig. 39). Lo anterior, porque el fenotipo claro de las dobles mutantes *rsmA*-/*gacA*- es similar al de la cepa *gacA*-, que no produce PHB. Esto sugiere que existe otra vía de regulación adicional (la cual desconocemos) a la del sistema RsmA/RsmZ1, en la cual el regulador de respuesta GacA controla la síntesis de PHB.

### 7.10 Posible vía alterna de regulación controlada por GacS/GacA

En la literatura actual, se sugiere que en el género *Pseudomonas* la regulación que ejerce el sistema GacS/GacA sobre sus blancos es mediante el sistema Rsm. Sin embargo, dado el fenotipo de la doble mutante *gacA*-/*rsmA*- en *A. vinelandii*, se muestra que para la regulación de la síntesis de PHB mediante GacS/GacA existe otra vía alterna al sistema Rsm. En varias especies de *Pseudomonas* se ha identificado un sitio de unión del regulador de respuesta GacA a sus genes blanco (*rsmZ*, *rsmY*) (Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2005; Heurlier *et al.*, 2004; Manzo *et al.*, 2011), el sitio llamado GacA box presenta la secuencia TGTAAG N6 CCTACA y en *A. vinelandii* esta caja está conservada (Manzo *et al.*, 2011).

Con la finalidad de buscar otra vía alterna a la regulación de PHB a través de GacA, se diseñó un algoritmo en lenguaje Perl para la búsqueda de posibles blancos de GacA en las regiones intergénicas de *A. vinelandii*. Con las secuencias propuestas de unión de GacA en los genes *rsmZ* en *A. vinelandii* y mediante el programa MEME (Multiple Em for Motif Elicitation, [http://meme.sdsc.edu/meme4\\_3\\_0/cgi-bin/meme.cgi](http://meme.sdsc.edu/meme4_3_0/cgi-bin/meme.cgi)) se diseñó la expresión regular usada en el programa de búsqueda (Fig. 40)

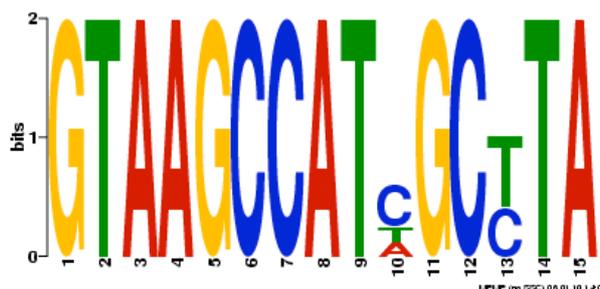


Fig. 40. Patrón de reconocimiento de la proteína GacA en *A. vinelandii*. Los números debajo de las letras corresponden a la posición de la base, si la base sobrepasa un bit es la más representativa en el motivo.

Con base al resultado del programa MEME, la secuencia utilizada en el algoritmo diseñado en perl fue la siguiente: GTAAGCCAT(CITIA)GC(TIC)TA. Las bases en paréntesis separadas por un “|” significan que en esa posición puede ser una base o la otra (por ejemplo, en la décima posición es una C, T o una A); mientras que, las letras sin paréntesis significan que en esa posición solo debe estar esa base (por ejemplo, en la primera posición hay una G y en la búsqueda solo debe estar esa base). Al correr el algoritmo en perl, el programa da un archivo de salida con las secuencias intergénicas blanco encontradas, las cuales fueron analizadas. El archivo de salida arroja los siguientes 8 posibles blancos:

Los blancos encontrados corresponden a los genes *rsmZ*(1-7). Manzo y colaboradores (2011) demostraron, que GacA se requiere para la completa expresión de *rsmZ1* y *rsmZ2* en *A. vinelandii*; por lo que se podría esperar que para los genes *rsmZ3-7* sucediera lo mismo. El octavo blanco corresponde a una secuencia intergénica localizada entre dos genes, que codifica para una pequeña proteína hipotética conservada de 52 aminoácidos (*Avin08930*) y una nucleasa SNase-like.

GacA pudiera estar controlando la expresión del gen *Avin08930*, el cual codifica para una proteína hipotética conservada en cerca de 60 especies bacterianas. Cabe señalar, que la función de esta proteína y sus homólogos es desconocida en todos los organismos donde está presente. Al hacer un análisis de posibles promotores bacterianos con el programa Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), se encontró un consenso para sigma 70 localizado 326 nucleótidos río arriba del inicio de la traducción; mientras que el sitio hipotético de unión de GacA está a 378 nucleótidos río arriba de ATG, sugiriéndose que GacA pudiera activar la expresión de este promotor.

Algo interesante es que este pequeño gen *Avin08930*, tiene un parálogo localizado en la misma región del genoma que el gen *Avin08960*. Sin embargo, el gen *Avin08960* no presenta sitio de unión para GacA. Con la finalidad de conocer si el producto del gen *Avin08930* es regulado por GacA y además si está involucrado en la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, se procedió a diseñar unos oligonucleótidos para conocer si es regulado por GacA, por RT-qPCR. La figura 41 muestra la expresión del gen *Avin08930* en la cepa silvestre y en la mutante *gacA*-.

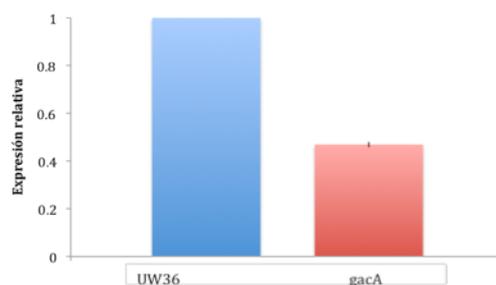


Fig. 41. Expresión relativa del gen *Avin08930* en la cepa UW136 y *gacA*-.

La mutación en el gen *gacA* afecta de manera negativa la expresión del gen *Avin08930*, ya que está disminuye un 60 % con respecto a la cepa silvestre (Fig. 41). Lo anterior sugiere que GacA activa la expresión del gen *Avin08930*, por lo que resulta un blanco potencial en la regulación de la síntesis de PHB. Teniendo lo

anterior presente, se construyeron las cepas mutantes *Avin08930*-, *Avin08960*- y *Avin08930*-/*Avin08960*- (la doble, se construyó porque podría suceder que la falta de el producto del gen *Avin08930*, la compense el producto de *Avin08960*). Para saber si el producto de estos genes están involucrados en la síntesis de PHB, se analizó el fenotipo en cuanto a acumulación de PHB y éste se muestra en el figura 42.

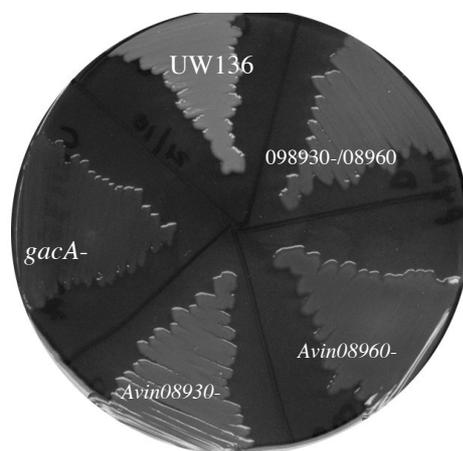


Fig. 42. Fenotipo de opacidad en las cepas UW136, *gacA*-, *Avin08930*-, *Avin08960*- y *Avin08930*-/*Avin08960*-.

La disminución en la producción de PHB en la cepa mutante *Avin08930*- sugiere que el producto de este gen está involucrado en la regulación de la producción de PHB. Sin embargo, el efecto negativo en esta mutante (*Avin08930*-) no es tan fuerte como en el caso de la mutante *gacA*- (Fig. 42). La doble mutante *Avin08930*-/*Avin08960*- muestra un fenotipo negativo más fuerte que la mutante *Avin08930*-; de hecho, el fenotipo de la doble mutante es similar al de la mutante *gacA*- sugiriendo que el producto de ambos genes están participando en la regulación de la síntesis de PHB.

Los genes *Avin08930* y *Avin08960* presentan 92 % de identidad a nivel de secuencia, y codifican para pequeñas proteínas (de aproximadamente 7 kDa) con dominios de función desconocida. Cabe resaltar que a nivel de proteína *Avin08930* y *Avin08960*, son ricos en lisina (K) y arginina (R), aminoácidos cargados positivamente. En bacterias, existen proteínas que tienen diversos motivos de unión a RNA; uno de esos motivos llamado CSD (Cold-shock domain) presenta aminoácidos básicos (positivos) y aromáticos (Elliott and Ladomery., 2011), que son importantes para la interacción

CAPÍTULO 7. Parte II Regulación post-transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC*

---

con el RNA (Elliott and Lodomery, 2010). Por lo anterior, cabría la posibilidad de que el producto de los genes *Avin08930* y *Avin08960* pudiera interactuar con RNAs (tal vez con los RsmZ1-7, RsmY ó RNAm de *phbB* y/o *phbR*) y que producto de esta interacción afectara la expresión de los genes de PHB. Claro, esta hipótesis tendría que probarse con los experimentos adecuados.

### 7.11 Modelo de regulación post-transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC* mediada por el sistema GacA/Rsm

Con los resultados de la parte II, se sugiere el siguiente modelo de regulación post-transcripcional: La histidina cinasa GacS detecta una señal (aún desconocida) por la cual se autofosforila, el fosfato de GacS lo transfiere al regulador de respuesta GacA activándolo. GacA fosforilado, activa la transcripción de los genes *rsm* produciendo los RNAs regulatorios RsmZ. Estos, secuestran a la proteína RsmA, eliminando el efecto negativo que pudiera ejercer sobre los RNAm. Por otra parte, RsmA libre se une a los RNAm de *phbR* y *phbBAC* provocando su degradación y por lo tanto la baja traducción de las enzimas de producción de PHB. Finalmente, GacS/GacA además controlan la producción de PHB a través de otra vía alterna que desconocemos (que tal vez podría ser el producto de los genes *Avin08930* y *Avin08960*) (Fig. 43).

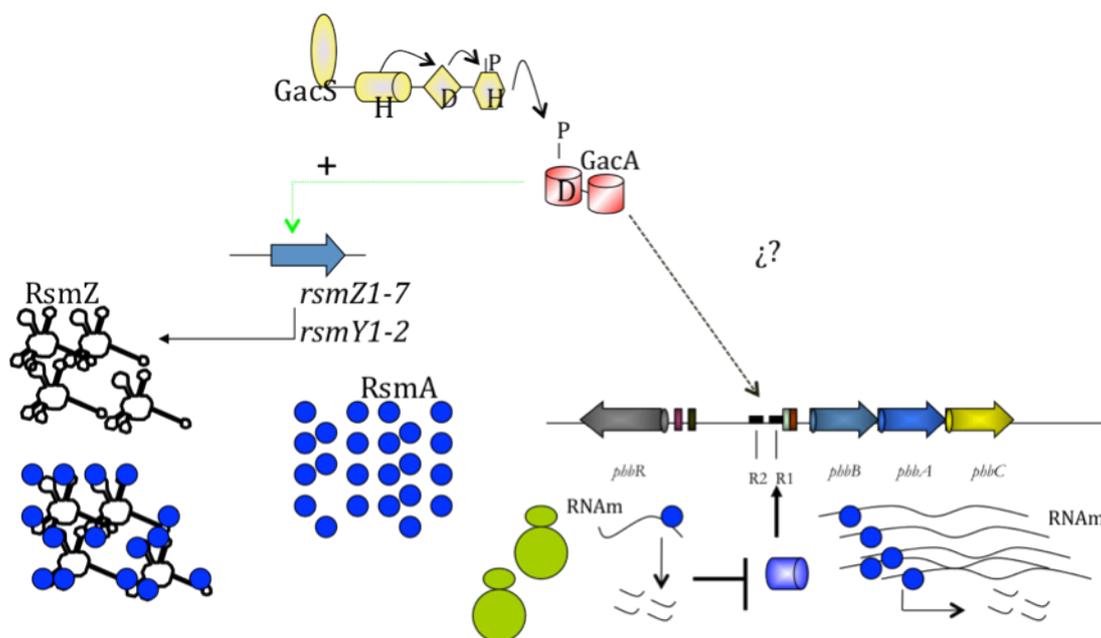


Fig. 43. Modelo de regulación post-transcripcional del gen *phbR* y del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*. La línea punteada con el "¿?" muestra la posible vía alterna de regulación de GacA sobre la expresión de *phbR* y *phbB*.

## CAPITULO 8. CONCLUSIONES

### Parte I

El factor RpoS, activa la expresión del gen *phbR* en fase estacionaria; y, aunque los dos promotores de *phbR* no tienen consenso para promotores reconocidos por RpoS, este regulador pudiera activarlos de manera indirecta.

La proteína PhbR activa la expresión de su propio gen (*phbR*). Dado que no observamos una interacción *in vitro* de PhbR con la región de regulación de su gen, sugerimos que puede regularse de manera indirecta o en su defecto que requiera de algún inductor para unirse a su región de regulación y activar su expresión.

PhbR activa de manera directa la expresión del operón *phbBAC*, al unirse a las secuencias TGTCACCAA-N4-CACTA y TGTCACCAA-N4-CAGTA localizadas en la región promotora del operón.

### Parte II

El sistema de dos componentes GacS/GacA controla parcialmente la síntesis de PHB a través del sistema Rsm.

El sistema Rsm controla post-transcripcionalmente la expresión del gen *phbR* y de manera indirecta la transcripción de *phbB*.

El regulador RsmA se une *in vitro* a los RNAm de *phbR* y *phbB*, controlando a nivel post-transcripcional la expresión de *phbR* y a *phbB*.

La unión de RsmA sobre los RNAm de *phbR* y *phbB*, provocaría su desestabilización y su degradación por un mecanismo aún desconocido.

GacA controlaría también, la síntesis de PHB a través de otro mecanismo que aún desconocemos. En la vía alterna podrían participar el producto de los genes *Avin08930* y *Avin08960*.

## **CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS**

Caracterizar el mecanismo por el cual PhbR se autorregula, mediante la búsqueda de su posible intermediario o la búsqueda de una molécula inductora.

Identificación y caracterización del posible intermediario que activa la expresión de *phbR* a través de RpoS.

Determinar mediante un análisis mutacional los posibles sitios de unión a RsmA sobre la región líder en los RNAm de *phbR* y *phbB*.

Buscar y señalar el mecanismo alternativo a Rsm, por el cual GacA controla la producción de PHB en *A. vinelandii*.

## CAPITULO 10. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, A. and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54(4):450-472.

Babitzke, P. and Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:156-163

Beijlsma, J., J. and Groisman, G. A. (2003). Making informed decisions: regulatory interaction between two-component system. *Trends. Microbiol.* 11(8): 359-366.

Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. and Espin, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.

Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. and Espin, G. (2001). The global regulators GacA and  $\sigma$ S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787-6793.

Chen, Guo-Qiang and Wu, Qiong (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials.* 26:6565-6578

Cocotl, M. (2007). Caracterización del gen *rsmA* involucrado en la síntesis de alginato y PHB en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura, BUAP, Puebla, Mex.

Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D. and Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol.* 157:1685-1693.

Elliott, D. and Lodomery, M. (2010). Molecular Biology of RNA. *Oxford*. Cap. 4.

Gallegos, M., Schleif, R., Bairoch, A., Hofman, K. and Ramos, J. (1997). AraC/XylS Family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 393-410.

Heeb S, Blumer and C, Haas. (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 184:1046-1056.

Hellingwerf, K., Postma, W., Tommassen, J. and Westerhoff, V. (1995). Signal transduction in bacteria: phosphoneural network(s) in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:309-321.

Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Cámara, M., Williams, P. and Haas, D. (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 186:2936-2945.

Kay, E., Dubuis, C. and Haas, D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:17136-17141.

Lenz, W., R. and Marchessaul, H. R. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules.* 6(1):1-8.

Madison, L. and Huisman, G. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Rev.* 63:21-53

Maehara, A., Yamane, T., Taguchi, S. and Doi, Y. (2001). Molecular characterization of a regulatory protein (PhaR) involved in PHA biosynthesis. *RIKEN Rev.* 42: 77-80.

Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V., Bustillos, R., Velázquez, C., Góiz, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G. and Castañeda, M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. Artículo aceptado en *J. Mol. Microbiol. Biotech.*

Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M. and Doi, Y. (2002). Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas sp.* 61-3. *Biomacromolecules*. 3: 787-792.

Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T. and Doi, Y. (1998). Cloning and molecular analysis of the poly(3hydroxybutirate) and poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas sp.* strain 61-3. *J. Bacteriol.* 180 (24): 6459-6467.

Mukhopadhyay, S., Audia, J. P., Roy, N. R. and Schellhorn, H. E. (2000). Transcriptional induction of the conserved alternative factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol. Microbiol.* 37:371-381.

Peralta-Gil, M., Segura, D., Gúzman, J., Servín-González, L. and Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on transcriptional activator *phbR*. *J. Bacteriol.* 184:5672-5677.

Peralta-Gil, M. (2004). Control transcripcional del operón divergente *phbBAC*, de polihidroxitirato, mediado por los reguladores GacA, RpoS y PhbR en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rehm, B. and Steinbuchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and others proteins required for PHA synthesis. *I. J. Biol. Macromol.* 25: 3-19.

Ritchie, G.A. and Dawes, E. A. (1969). The non-involvement of acyl-carrier protein in poly-beta-hydroxybutyric acid biosynthesis in *Azotobacter beijerinckii*. *J. Biochem.* 112:803-805.

Romeo, T. and Gong, M. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* 175:5740-5741

Saad, B., Hirt, T. D., Welti, M., Uhlschmid, G. K., Neuenschwander, P. and Suter, U. W. (1999). Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: in vitro and in vivo evaluations. *J. Biomed. Mater. Res.* 36:65-74.

Sabnis, N. A., Yang, H. and Romeo, T. (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* 270:29096-29104.

Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 39:516-39.

Sandercook, J., R. and Page, W., J. (2008). Rpos expresión and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* Turing carbon and nitrógeno diaxic shifts. *J Bacteriol.* 190 (3):946-953.

Segura, D. and Espín, G. (1998). Mutational inactivation of gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-(3)-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 180 (18):4790-4798.

Segura, D., Cruz, T. y Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol.* 179 (6): 437- 443

Segura, D. and Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 414–418

Senior, P., Beech, G., Ritchie, G. and Dawes, E. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 128: 1193-1201.

Steinbüchel, A. and Fächtenbusch, B. (1998). Bacterial and other biological system for polyester production. *Trends Biotech.* 16(10):418-427

Stock, A., Robinson, L. and Goudreau, N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183-215.

Susuki, K., Wang, X., Weibacher, T., Pernesting, A., Melefors, O., Georgellis, D., Babitske, P. and Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:5130-5140.

Tobes, R. and Ramos, J. L. (2002). AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria. *Nucleic. Acids. Res.* 30:318-321.

Typas, A., Becker, G. and Hengge, R. (2007). The molecular basis of selective promoter activation by the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 63(5), 1296-1306.

Valverde, C., Heeb, S., Keel, C. and Haas, D. (2005). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:17136-17141.

Van der Walle, G., De Koning, G., Weusthuis, R. And Eggink, G. (2001) Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 71: 263-291.

Whistler, C. A., Corbell, N. A., Sarniguet, A., Ream, W. and Loper, J. E. (1998). The Two component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 180:6635-6641.

Williams, S., Martín, D., Horowitz, D. and Peoples, O. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *In. J. Biol. Macromol.* 25:111-121.

Yang, H., Liu, M. Y. and Romeo, T. (1996). Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the *csrA* gene product. *J. Bacteriol.* 178:1012-1017.

Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. (2001). Ocurrence, síntesis and medican application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug. Del. Rev.* 53: 5-21.

Zuker, M. (2003). Mfold web Server for nucleic acid holding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* 31 (13):3406-3415.

# ANEXO 1

# Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS

Alberto Hernandez-Eligio, Mildred Castellanos, Soledad Moreno and Guadalupe Espín

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Correspondence  
Guadalupe Espín  
espín@ibt.unam.mx

We previously showed that in *Azotobacter vinelandii*, accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) occurs mainly during the stationary phase, and that a mutation in *phbR*, encoding a transcriptional regulator of the AraC family, reduces PHB accumulation. In this study, we characterized the roles of PhbR and RpoS, a central regulator during stationary phase in bacteria, in the regulation of expression of the PHB biosynthetic operon *phbBAC* and *phbR*. We showed that inactivation of *rpoS* reduced PHB accumulation, similar to the *phbR* mutation, and inactivation of both *rpoS* and *phbR* resulted in an inability to produce PHB. We carried out expression studies with the wild-type, and the *rpoS*, *phbR* and double *rpoS-phbR* mutant strains, using quantitative RT-PCR, as well as *phbB::gusA* and *phbR::gusA* gene fusions. These studies showed that both PhbR and RpoS act as activators of *phbB* and *phbR*, and revealed a role for PhbR as an autoactivator. We also demonstrated that PhbR binds specifically to two almost identical 18 bp sites, TGTCACCAA-N<sub>4</sub>-CACTA and TGTCACCAA-N<sub>4</sub>-CAGTA, present in the *phbB* promoter region. The activation of *phbB* and *phbR* transcription by RpoS reported here is in agreement with the observation that accumulation of PHB in *A. vinelandii* occurs mainly during the stationary phase.

Received 3 June 2011  
Revised 13 July 2011  
Accepted 18 July 2011

## INTRODUCTION

*Azotobacter vinelandii* is a soil bacterium that undergoes differentiation to form cysts resistant to desiccation, and produces the polyester polyhydroxybutyrate (PHB), an industrially important polymer used as a biodegradable plastic. The sigma factor RpoS is a central regulator during the stationary phase in bacteria (for a recent review, see Navarro Llorens *et al.*, 2010). In *A. vinelandii*, RpoS is involved in the formation of mature cysts (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011), and is also required for survival under oxidative stress and under conditions of either carbon or nitrogen starvation (Sandercock & Page, 2008). Synthesis of PHB in *A. vinelandii* occurs entering the stationary phase (Martínez *et al.*, 1997), and is carried out in three enzymic steps: a  $\beta$ -ketothiolase catalyses the condensation of two molecules of acetyl-CoA to produce acetoacetyl-CoA, which is reduced by the NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase to form  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA, which is polymerized by the PHB synthase. The genes encoding the  $\beta$ -ketothiolase *phbA*, acetoacetyl-CoA reductase *phbB* and PHB synthase *phbC* are organized in the *phbBAC* operon (Segura *et al.*, 2003). The *phbR* gene,

located upstream and in the opposite direction to *phbB*, encodes a transcriptional activator of the AraC family, and a mutation in *phbR* reduces accumulation of PHB (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Transcription of the *phbBAC* gene cluster has been shown to start from two overlapping promoters,  $p_{B1}$  and  $p_{B2}$ , and a reduction in the transcription of *phbB* from its  $p_{B1}$  promoter in the *phbR* mutant has been revealed in an S1-mapping experiment (Peralta-Gil *et al.*, 2002). A consensus sequence recognized by RpoS is present in  $p_{B2}$  (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Two start sites for the transcription of *phbR* have also been identified, defining the  $p_{R1}$  and  $p_{R2}$  promoters. The binding targets for some regulators of the AraC family, such as MelR from *Escherichia coli*, consist of repeated sequences 18 nt long (Belyaeva *et al.*, 2000). Two almost identical 18 bp sequences present in the *phbB* regulatory region, designated R1 and R2, have been identified. Site R1 overlaps the -35 region of  $p_{B1}$ , and R2 is located 3 nt upstream of R1. Thus, R1 and R2 have been proposed to be PhbR-binding sites. Four other less conserved 18 bp sequences, designated R3, R4, R5 and R6, have also been identified within the intergenic *phbR-phbB* region (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

In this study we show that synthesis of PHB, as well as transcription of *phbB* and *phbR*, is abrogated in the absence of both PhbR and RpoS, and that the PhbR protein binds specifically to the R1 and R2 sequences present in the *phbB*

Abbreviations: EMSA, electrophoretic mobility shift assay; MBP, maltose-binding protein; PHB, polyhydroxybutyrate; qRT-PCR, quantitative RT-PCR.

promoter region. We also demonstrate that RpoS positively controls transcription of *phbB* and *phbR*.

## METHODS

**Microbiological procedures.** Bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. Medium and growth conditions were as follows. *A. vinelandii* was grown at 30 °C in peptone yeast medium (PY), or Burk's nitrogen-free salts medium (BS) (Kennedy *et al.*, 1986) supplemented with 2% sucrose. *E. coli* strains DH5 $\alpha$  and BL21 were grown on Luria-Bertani medium (LB) at 37 °C. Antibiotic concentrations used (in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were as follows: tetracycline, 20 and 20; kanamycin (Km), 5 and 30; ampicillin (Ap), not used and 100; nalidixic acid (Nal), 20 and 20; streptomycin (Sm), 2 and 20; and gentamicin (Gm), 1.5 and 10. *A. vinelandii* transformation was carried out as described by Page & von Tigerstrom (1978); Bali *et al.* (1992). PHB production was measured as described previously (Segura & Espin, 1998).

**Construction of *A. vinelandii* mutants.** Primers phbRupper and phbRlower (Table 1) were used to amplify a PCR fragment containing the complete *phbR* gene using chromosomal DNA of strain UW136 as template. This fragment was digested with *Nde*I and *Xho*I restriction enzymes and cloned into the pTYB1 plasmid (NEB). The resultant plasmid, pMC1, was digested with *Nco*I (a single *Nco*I restriction site is present 375 bp downstream from the ATG start codon). The ends of the *Nco*I-linearized pMC1 were made blunt by treatment with Klenow fragment (Fermentas) and used for cloning an *Sma*I fragment containing the Km-resistance cassette from vector pBSL97. The resultant plasmid, pMC2, was linearized with the *Nde*I restriction enzyme and transformed into the UW136 and JGW-S strains, generating the *phbR* mutant AHW1 and the *rpoS-phbR* double mutant AHW2, respectively. The presence of the *phbR::Km* mutation in these strains was confirmed by PCR (data not shown).

The *scrX* gene encodes a protein with sequence identity to  $\alpha$ -glucosidases. Loss of *scrX*, either by replacement or by interruption using an antibiotic-resistance gene, did not affect the capacity of *A. vinelandii* to grow using sucrose as the sole carbon source, indicating that the *scrX* gene product is not essential for sucrose catabolism (Johnson *et al.*, 2006). Therefore, the *scrX* gene was used as a neutral region for integration of the *phbR-gusA* gene fusion. Primers scrX-F and scrX-R (Table 1) were used to amplify a 2956 bp fragment containing the *scrX* gene. This fragment was cloned into pJET1.2 to give plasmid pAHX. Primers phbRint and B2 (Table 1) were used to amplify a 3.2 kb fragment containing the *phbR::gusA-Gm* gene fusion from strain JGW-R (Peralta-Gil *et al.*, 2002). This fragment was cloned within the *Eco*RI site (made blunt with Klenow fragment) present in the *scrX* gene in plasmid pAHX. The resultant plasmid, pMC4, was linearized with *Xho*I and transformed into the UW136, AHW1, JGW-S and AHW2 strains. Transformants of each strain carrying *phbR-gusA-Gm* within the *scrX* gene were isolated and named AHW5, AHW6, AHW7 and AHW8, respectively. The presence of the *phbR-gusA-Gm* fusion within *scrX* was confirmed by PCR analysis (data not shown).

Primers Rfin and phbBa12 (Table 1) were used to amplify a 966 bp fragment containing the *phbB* gene from UW136. This fragment was cloned into plasmid pJET1.2, producing plasmid pAHB. A 2.8 *Xho*I fragment, carrying the *gusA-Gm* cassette, was isolated from plasmid pSM-Gus-Gm, made blunt with the Klenow fragment, and cloned (in the same orientation as the *phbB* gene) into the unique *Sma*I site present within the *phbB* gene of pAHB to produce plasmid pAHB-A, carrying the *phbB::gusA-Gm* fusion. Plasmid pAHB-A was transformed into the UW136, AHW1, JGW-S and AHW2 strains. Transformants of each strain carrying the *phbB::gusA-Gm* fusion

were isolated and named AHW9, AHW10, AHW11 and AHW12, respectively. The presence of the *phbB::gusA* gene fusion was confirmed by PCR (data not shown).

**Complementation of the *phbR* and *rpoS* mutants.** Plasmids pAHR-KM and pAHS-GM, carrying wild-type copies of the *phbR* and *rpoS* genes, respectively, were constructed as follows. A 1902 bp fragment containing the *phbR* gene was amplified from UW136 using primers bmut2 and compphbRRev, and cloned into plasmid pJET1.2 to produce plasmid pAHR. A Km cassette from plasmid pBSL97 was inserted into the *Xba*I site of pAHR. The resultant plasmid, pAHR-KM, unable to replicate in *A. vinelandii*, was transformed into strain JGW-R. A transformant resistant to Gm and Km, having plasmid pAHR-KM integrated into the chromosome, was isolated and named ASW3. PCR analysis showed that co-integration of pAHR-GM in ASW3 occurred between the *phbR* promoter and the Gm-resistance cassette (see Fig. 2b), thus allowing the wild-type *phbR* gene to be transcribed from its own promoter.

Primers comprpoSfw and comprpoSrev and chromosomal DNA from strain UW136 were used to amplify a 2549 bp fragment carrying the *rpoS* gene, which was cloned into pJET1.2, to produce plasmid pAHS. The Gm cassette from plasmid pBSL98 was cloned into the *Xba*I site of pAHS to produce plasmid pAHS-GM, which was introduced into strain JGW-S by transformation to produce strain AHW4, carrying pAHS-GM integrated between the *rpoS* promoter and the Sp cassette (see Fig. 2c).

**Nucleic acid procedures.** DNA isolation and cloning, and random primer procedures were carried out as described by Sambrook *et al.* (1989). DNA sequencing was done with a Perkin Elmer/Applied Biosystems DNA sequencer. The sequences of all the primers used in this work are shown in Table 1.

**Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).** Expression of *phbB*, *phbR* and *rpoS* was measured by qRT-PCR, as previously reported (Noguez *et al.*, 2008). For RNA extraction, the cultures were grown in Burk's liquid medium supplemented with 2% sucrose as the carbon source. Cells were collected at the logarithmic or stationary phase of growth. The primers used for the qRT-PCR assays (Table 1) were as follows: phbBFw/phbBRev for *phbB*; phbRFw/phbRRev for *phbR*; RTuprpoS/RTdownrpoS for *rpoS*; and gyrAFw/gyrARev for *gyrA*, which was used as internal control to normalize the results. All assays were performed in triplicate. The data are presented as fold changes of mRNA levels of the mutant strain relative to those of the wild-type.

**Purification of maltose-binding protein (MBP)-PhbR.** To express and purify PhbR, a 1047 bp fragment corresponding to the *phbR* gene was amplified by PCR using *Taq* Platinum High Fidelity Polymerase (Invitrogen), and phbRmalFw and phbRmalLw primers. The resultant PCR product was digested with *Hind*III and *Eco*RI, and ligated into plasmid pMAL-C2X (NEB). The ligation mix was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ , and a transformant carrying plasmid pMC3 was isolated. This plasmid was sequenced to confirm the presence of an intact *phbR* gene and transformed into *E. coli* BL21 (Invitrogen). Expression of the MBP-PhbR in strain BL21/pMC3 was induced by the addition of IPTG (0.3 mM). After 2 h induction, protein purification was performed at 4 °C under non-denaturing conditions using an amylose resin column, as described in the manufacturer's protocol (NEB). The MBP-PhbR protein was maintained in storage buffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM potassium chloride, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, pH 8.0). The protein was concentrated utilizing Microcon YM-10 centrifugal filters (Amicon) and stored at 4 °C. Protein concentrations were determined by the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951), using BSA as a standard. SDS-PAGE of the purified protein revealed the expected molecular mass of approximately 45 kDa (data not shown).

**Table 1.** Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strain, plasmid or oligonucleotide	Description or sequence (5' to 3')	Source or reference
<b><i>A. vinelandii</i> strains</b>		
UW136	Wild-type	Laboratory collection
JGW-S	UW136 with an <i>rpoS</i> ::Sp mutation	Peralta-Gil <i>et al.</i> (2002)
JGW-R	UW136 with a <i>phbR</i> ::Gm mutation	Peralta-Gil <i>et al.</i> (2002)
AHW1	UW136 with a <i>phbR</i> ::Km mutation	This study
AHW2	JGW-S with a <i>phbR</i> ::Km mutation	This study
ASW3	JGW-R with pAHR-KM co-integrated	This study
AHW4	AHW2 with pAHR-GM co-integrated	This study
AHW5	UW136 with a <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW6	AHW1 with a <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW7	JGW-S with a <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW8	AHW2 with a <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW9	UW136 with a <i>phbB</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW10	AHW1 with a <i>phbB</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW11	JGW-S with a <i>phbB</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
AHW12	AHW2 with a <i>phbB</i> :: <i>gusA</i> fusion	This study
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan (1983)
BL21 BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_{\text{B}}$ m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> <i>dcm</i>	Invitrogen
<b>Plasmids</b>		
pJET1.2	Cloning vector	Fermentas
pMAL-C2	Expression vector	NEB
pTYB1	Cloning vector	NEB
pBSL97	Plasmid with a Km cassette	Alexeyev <i>et al.</i> (1995)
pBSL98	Plasmid with a Gm cassette	Alexeyev <i>et al.</i> (1995)
pSM-Gus-Gm	Plasmid with a <i>gusA</i> ::Gm cassette	Peralta-Gil <i>et al.</i> (2002)
pTC2P	Plasmid with <i>phbR</i> - <i>phbB</i> intergenic region	Peralta-Gil <i>et al.</i> (2002)
pMC1	pTYB1 derivative with <i>phbR</i>	This study
pMC2	pMC1 derivative with <i>phbR</i> ::Km mutation	This study
pMC3	pMAL-C2X derivative with <i>phbR</i> - <i>malE</i> fusion	This study
pMC4	pAHX derivative with <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> ::Gm	This study
pAHX	pJET1.2 derivative with <i>scrX</i>	This study
pAHB	pJET1.2 derivative with <i>phbB</i>	This study
pAHB-A	pAHB derivative with <i>phbB</i> :: <i>gusA</i> ::Gm	This study
pAHR	pJET1.2 derivative with the <i>phbR</i> locus	This study
pAHS	pJET1.2 derivative with the <i>rpoS</i> locus	This study
pAHR-KM	pAHR derivative with a Km cassette	This study
pAHS-GM	pAHS derivative with a Gm cassette	This study
<b>Oligonucleotides</b>		
gyrAFw	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	Noguez <i>et al.</i> (2008)
gyrARev	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	Noguez <i>et al.</i> (2008)
phbRFw	CCACATGCGTTTGGTTTCTTG	Noguez <i>et al.</i> (2008)
phbRRev	TCTGCCCTAAGCGTCTCCTC	Noguez <i>et al.</i> (2008)
phbBFw	TCCGCAATCCAAACGCAAAG	Noguez <i>et al.</i> (2008)
phbBRev	GTGCTCTCCCAATCGGTTAC	Noguez <i>et al.</i> (2008)
RTuprpoS	AGGATGTCCTGGACGATGAG	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> (2011)
RTdownrpoS	TCCAGCGCCCTAGTGTAGTC	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> (2011)
emsaPsup	CGAGCCGTCAGTTTGTGC	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> (2011)
psrAprim	CGAGGTCTCGGGGAATCCC	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> (2011)
phbRmalFw	TAGCGAATTCATGTTTACAGTCAGT	This study
phbRmalLw	GATCAAGCTTTTCATCCGTATGCGAC	This study
scrX-F	GTGGTGCAACGACTCTGC	This study
scrX-R	TCGCGGACCGTGCCTATG	This study
Rini	CAAATCCCGCCTCGCCAAGC	This study
Rmed	CATCGCTCTCGGCATTCTCC	This study
Rfin	CCGATAGCAAAAAGCCACTG	This study

Table 1. cont.

Strain, plasmid or oligonucleotide	Description or sequence (5' to 3')	Source or reference
B1	GGCTCATTCTCGATTGGGTC	This study
B2	GTGGCTTTTTGCTATCGGGC	This study
B3	GGATGGAGAATGCCGAGAGC	This study
bmut2	CTTCCTTTTTGTCGGAG	This study
compPhbRRev	TCTCCTGCATAGTGACGG	This study
compRpoSFw	CAATTTCTCAGTATGGGC	This study
compRpoSRev	TAGGCATGCAGGGAGTGG	This study
phbRint	CTTGAGCCCTATATCCGGATT	This study
phbRupper	GGCTCATATGTTTACAGTCAGT	This study
phbRlower	CCAATCGAGTCCGTATGCGAC	This study
phbBal2	CTAGCAGCTTCCGAATG	This study
footphbB4	TTTTTTGTCGGAGACCCTGG	This study

**DNA gel mobility shift assays.** DNA fragments corresponding to the intergenic *phbR-phbB* region were amplified from *A. vinelandii* UW136 chromosomal DNA by PCR using primers Rini, Rmed, Rfin, B1, B2 and B3. DNA-binding reactions were carried out in a total volume of 20  $\mu$ l. The reactions contained DNA-binding buffer [10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% (v/v) glycerol, 10  $\mu$ g BSA  $\mu$ l<sup>-1</sup>], 0.1 nmol of each DNA fragment labelled with ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) $\delta$ ATP, and variable amounts of PhbR (0–1  $\mu$ M). As a negative control, a 263 bp fragment of DNA corresponding to the promoter region of *psrA* was used (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). This fragment was obtained by PCR using primers emsaPsup and psrAprm. DNA-binding reactions were carried out at room temperature for 25 min, and the samples were subjected to native PAGE in 6% polyacrylamide gels in a buffer containing 90 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 2 mM EDTA. The gel was dried, and radioactive signals were detected by autoradiography.

**DNase I footprinting assays.** Plasmid pTC2P was used as a template for PCR amplification of the *phbB* 5' regulatory region. A <sup>32</sup>P-labelled oligonucleotide complementary to the 5' coding region of *phbB* (footphbR4), and an oligonucleotide complementary to the -109 to +78 bp region relative to the transcriptional start p<sub>B1</sub> (Rfin), were used. The binding of MBP-PhbR to the labelled DNA fragment was performed at room temperature in buffer containing 10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) glycerol and 10 mg BSA<sup>-1</sup>. The reaction mixture was treated with 0.02 U DNase I (Fermentas) for 2 min. The DNase footprinting with MBP-PhbR was performed at 30 °C. The DNA segments were separated by electrophoresis in 7% polyacrylamide/8 M urea gels alongside sequencing ladders.

## RESULTS

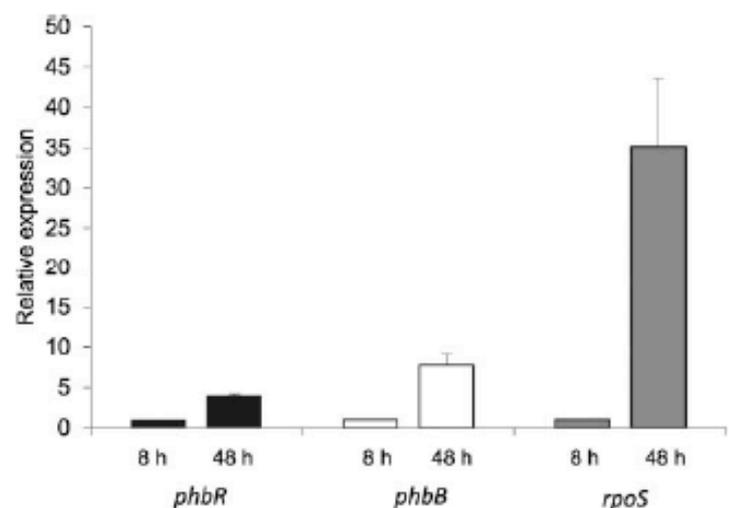
### Transcription of *phbB* and *phbR* in exponential and stationary phase cultures

In *A. vinelandii*, the levels of the RpoS protein and of the PHB polymer significantly increase during the stationary phase (Sandercock & Page, 2008; Martínez *et al.*, 1997). We determined the level of *rpoS* mRNA by qRT-PCR in exponential and stationary cells of strain UW136 grown on PY medium. As shown in Fig. 1, the level of the *rpoS* transcript was about 35-fold higher in stationary phase cells than in exponentially growing cells. Thus, it was expected

that in the UW136 strain, the levels of the *phbB* and/or *phbR* mRNAs would be higher in stationary phase cells than in exponentially growing cells. Indeed, the levels of *phbR* and *phbB* were four- and eightfold higher, respectively, in stationary phase cells, as determined by qRT-PCR (Fig. 1). These data are in agreement with a role for RpoS as a positive regulator of *phbB* and *phbR* transcription.

### PHB accumulation and *phbB* transcription in the *phbR* and *rpoS* mutants

Inactivation of either *phbR* or *rpoS* in strain UW136 reduced accumulation of PHB (Table 2, Fig. 2a). We carried out complementation of the *phbR* and *rpoS* mutant strains.



**Fig. 1.** Relative mRNA expression for *phbR*, *phbB* and *rpoS* in *A. vinelandii* strain UW136. qRT-PCR analysis of the expression of *phbR* (black bars), *phbB* (white bars) and *rpoS* (grey bars) in exponential (8 h) and stationary phase cells (48 h). The value of the mRNA level of each gene was normalized according to the level of *gyrA* mRNA. The data represent the means of triplicates; error bars, SD. The data are presented as the fold change of mRNA levels of stationary phase cells relative to exponentially growing cells.

**Table 2.** PHB production

PHB was determined in cells grown on PY medium for 72 h.

Strain	Genotype	PHB content [mg (mg protein) <sup>-1</sup> ]
UW136	Wild-type	1.550 ± 0.220
JGW-R	<i>phbR</i> :: <i>gusA</i> -Gm	0.144 ± 0.070
JGW-S	<i>rpoS</i> :: <i>Sp</i>	0.167 ± 0.010
AHW2	<i>rpoS</i> :: <i>Sp</i> / <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> -Gm	0.004 ± 0.002
ASW3	<i>phbR</i> :: <i>gusA</i> -Gm/ <i>phbR</i> +	2.490 ± 0.174
AHW4	<i>rpoS</i> :: <i>Sp</i> / <i>rpoS</i> +	2.510 ± 0.273

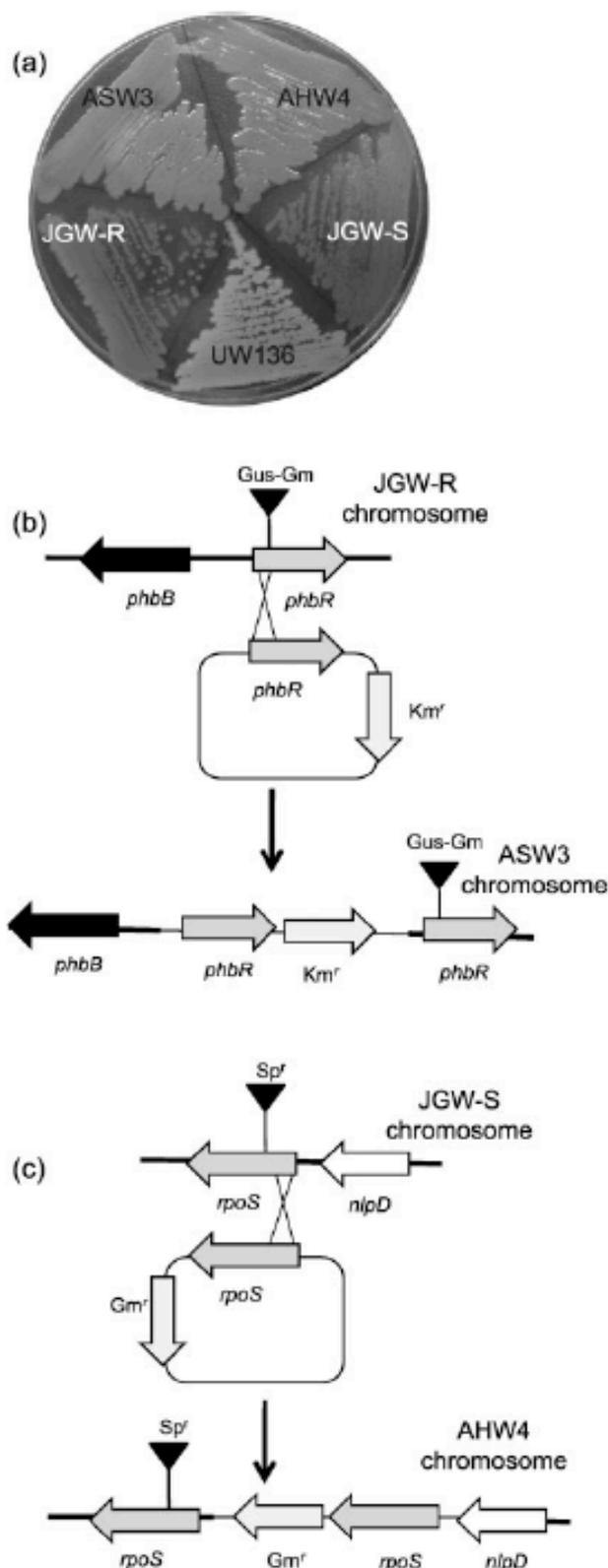
Plasmids pAHR-KM and pAHS-GM, carrying wild-type copies of the *phbR* and *rpoS* genes and unable to replicate in *A. vinelandii*, were transformed into the JGW-R and JGW-S strains, respectively, for integration into the chromosome. Transformants ASW3 and AHW4 were isolated, and they showed the wild-type PHB accumulation phenotype (Fig. 2, Table 2), confirming that the PHB-defective phenotype was due to the *phbR* and *rpoS* mutations.

To further study the roles of RpoS and PhbR in PHB synthesis, we constructed strain AHW2, an *rpoS-phbR* double mutant. As expected, PHB synthesis was abrogated in the AHW2 strain (Table 2), indicating that together RpoS and PhbR are essential for PHB synthesis. The level of *phbB* mRNA in strains *phbR*, *rpoS* and the double mutant *rpoS-phbR* was also determined by qRT-PCR. Fig. 3(a) shows that in the absence of either RpoS or PhbR, the levels of the *phbB* transcripts were significantly reduced in stationary cultures. No *phbB* mRNA was detected in the *rpoS-phbR* double mutant.

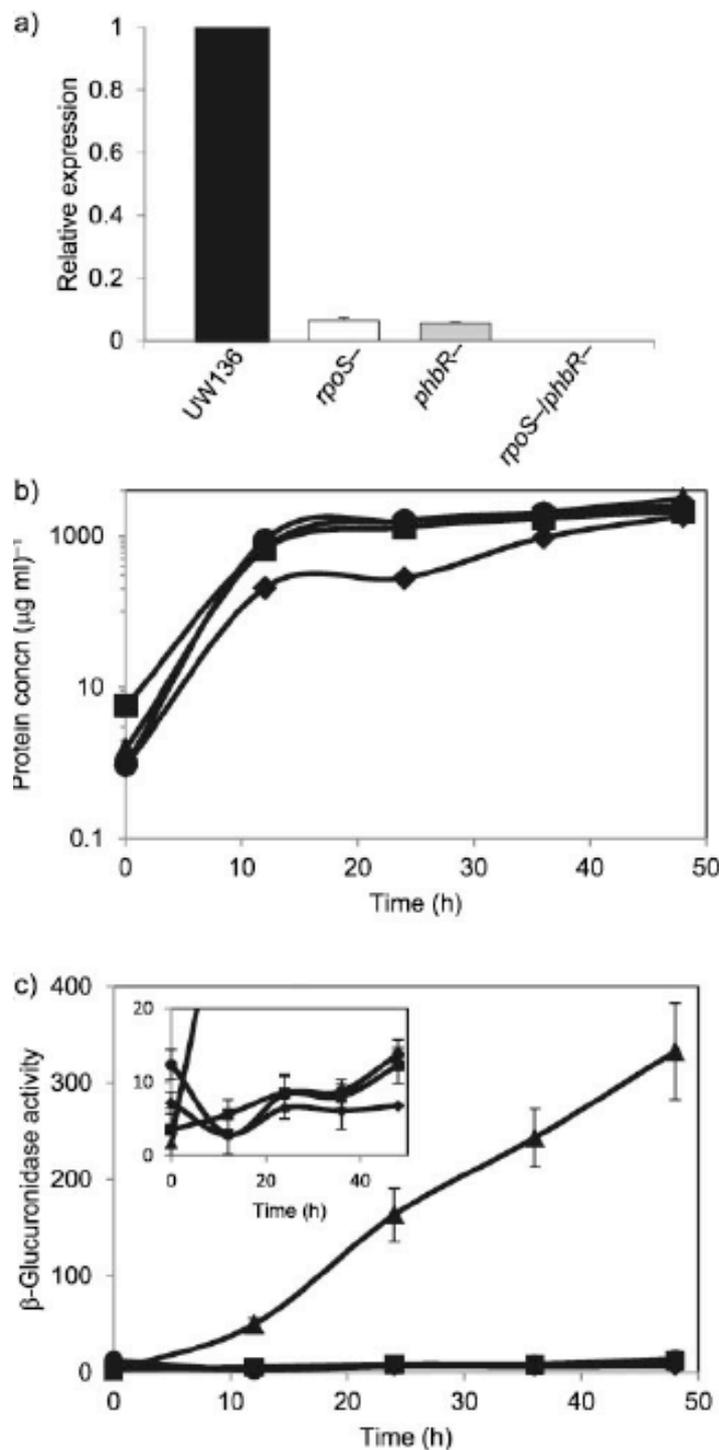
The effect of the *rpoS* and *phbR* mutations on *phb* expression was also analysed using a *phbB-gusA* gene fusion. The induction kinetics of *phbB* transcription were determined *in vivo* by measuring the  $\beta$ -glucuronidase activity in strain AHW9, a UW136 derivative carrying the *phbB-gusA* fusion, and their derivatives AHW10, AHW11 and AHW12 carrying *phbR*, *rpoS* and *rpoS-phbR* mutations respectively. The  $\beta$ -glucuronidase activity was determined during growth on PY sucrose medium, as shown in Fig. 3(b). Growth curves were very similar in all strains carrying the *phbB-gusA* gene fusion. As shown in Fig. 3(c),  $\beta$ -glucuronidase activity in strain AHW9 increased upon entrance into the stationary phase, in agreement with a role for RpoS as a regulator of *phbB* transcription. Fig. 3(c) also shows that the *rpoS*, *phbR* and *rpoS-phbR* mutations significantly reduced the  $\beta$ -glucuronidase activity, in agreement with the reduction in the levels of *phbB* mRNA observed in the *phbR*, *rpoS* and *rpoS-phbR* mutant strains.

### Transcription of *phbR*

The level of *phbR* mRNA was determined by qRT-PCR in the *rpoS* mutant. As shown in Fig. 4(a), the *rpoS* mutation reduced the concentration of the *phbR* transcript by 95%



**Fig. 2.** Complementation of JGW-R and JGW-S mutant strains by co-integration of plasmids pAHR-KM and pAHS-GM carrying the *phbR* and *rpoS* genes, respectively. (a) Opacity phenotype (PHB accumulation) of UW136, JGW-R and JGW-S, and the corresponding complemented strains ASW3 and AHW4. (b, c) Schematic representations of the integration of plasmid pAHR-KM into the chromosome of strain JGW-R (b) and pAHS-GM into the chromosome of strain JGW-S (c).



**Fig. 3.** PhbR and RpoS as positive regulators of *phbB*. (a) qRT-PCR analysis of *phbB* gene expression in *phbR*, *rpoS* and *rpoS-phbR* mutants. The data are presented as fold changes of mRNA levels of *rpoS* (white bar), *phbR* (grey bar) and *rpoS-phbR* mutant strains relative to that of the wild-type UW136 (black bar). (b) Growth of strain AHW9 ( $\blacktriangle$ ), and the isogenic *phbR* ( $\blacksquare$ ), *rpoS* ( $\bullet$ ) and *rpoS-phbR* ( $\blacklozenge$ ) strains. (c)  $\beta$ -Glucuronidase activity of a *phbB-gusA* gene fusion in strain AHW9 ( $\blacktriangle$ ), and in the isogenic *phbR* ( $\blacksquare$ ), *rpoS* ( $\bullet$ ) and *rpoS-phbR* ( $\blacklozenge$ ) strains. A magnification of  $\beta$ -glucuronidase activity of mutant strains is shown in the inset.

indicating the requirement for RpoS in the transcription of *phbR*.

The presence of sequences R5–R6, proposed to be PhbR-binding sites and located upstream of *phbR* (Fig. 5a), suggested that PhbR may also act as an autoregulator. We therefore determined the effect of *phbR* mutation on the levels of *phbR* mRNA, as determined by qRT-PCR. As shown in Fig. 4(a), the *phbR* transcript was reduced by about 80% in the absence of PhbR, suggesting that it also acts as an autoactivator. In the *rpoS-phbR* double mutant, no *phbR* transcript was detected, indicating that both regulatory proteins, PhbR and RpoS, are required for *phbR* transcription.

The effect of RpoS and PhbR on expression of *phbR* was further evaluated using a *phbR::gusA* gene fusion. Strain AHW5, a UW136 derivative carrying the wild-type *phbR* gene and a *phbR::gusA* gene fusion integrated into the chromosome within the *scx* locus, and strain AHW6, a derivative of AHW5 in which the wild-type *phbR* copy is interrupted with a Km-resistance cassette, were constructed as described in Methods. The  $\beta$ -glucuronidase activity was determined during growth on PY sucrose medium Fig. 4(b). As shown in Fig. 4(c), the  $\beta$ -glucuronidase activity was higher in the strain carrying the wild-type *phbR* copy, while in strain AHW6, the absence of *phbR* reduced the  $\beta$ -glucuronidase activity. This result further supports the contention that PhbR acts as a positive autoregulator.

The positive effect of RpoS on *phbR* expression was also confirmed by the reduction of the  $\beta$ -glucuronidase activity in the AHW7 strain, which carries the *rpoS* mutation (Fig. 4c). Additionally, the *rpoS-phbR* mutant strain (AWH8) showed an activity similar to that of the AHW7 strain, supporting the importance of RpoS and PhbR in *phbR* expression.

### Binding of PhbR to the *phbB* promoter regions

Sequence analysis of the *phbR-phbB* intergenic region revealed two almost identical 18 bp sequences, named R1 and R2, centred at positions  $-134$  and  $-155$  upstream of the ATG start codon, where R1 overlaps the  $-35$  region of  $p_{B1}$ . These sequences have previously been proposed to be PhbR-binding sites (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Other less conserved 18 bp sequences, designated R3, R4, R5 and R6, are present in this region. The R5 and R6 sequences overlap the  $p_{R2}$  promoter (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Fig. 5a). To determine whether PhbR binds to the *phbB* and *phbR* promoter regions, the PhbR protein was purified as described in Methods. A 405 bp DNA fragment (F1) corresponding to the intergenic *phbB-phbR* region, as well as fragments of 108 (F2), 147 (F3) and 133 bp (F4) containing the R1–R2, R3–R4 and R5–R6 sites, respectively, were amplified by PCR and subjected to an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with purified PhbR. Fig. 5(b, c) shows the binding of PhbR to the 405 nt fragment spanning the *phbR-phbB* intergenic region, as

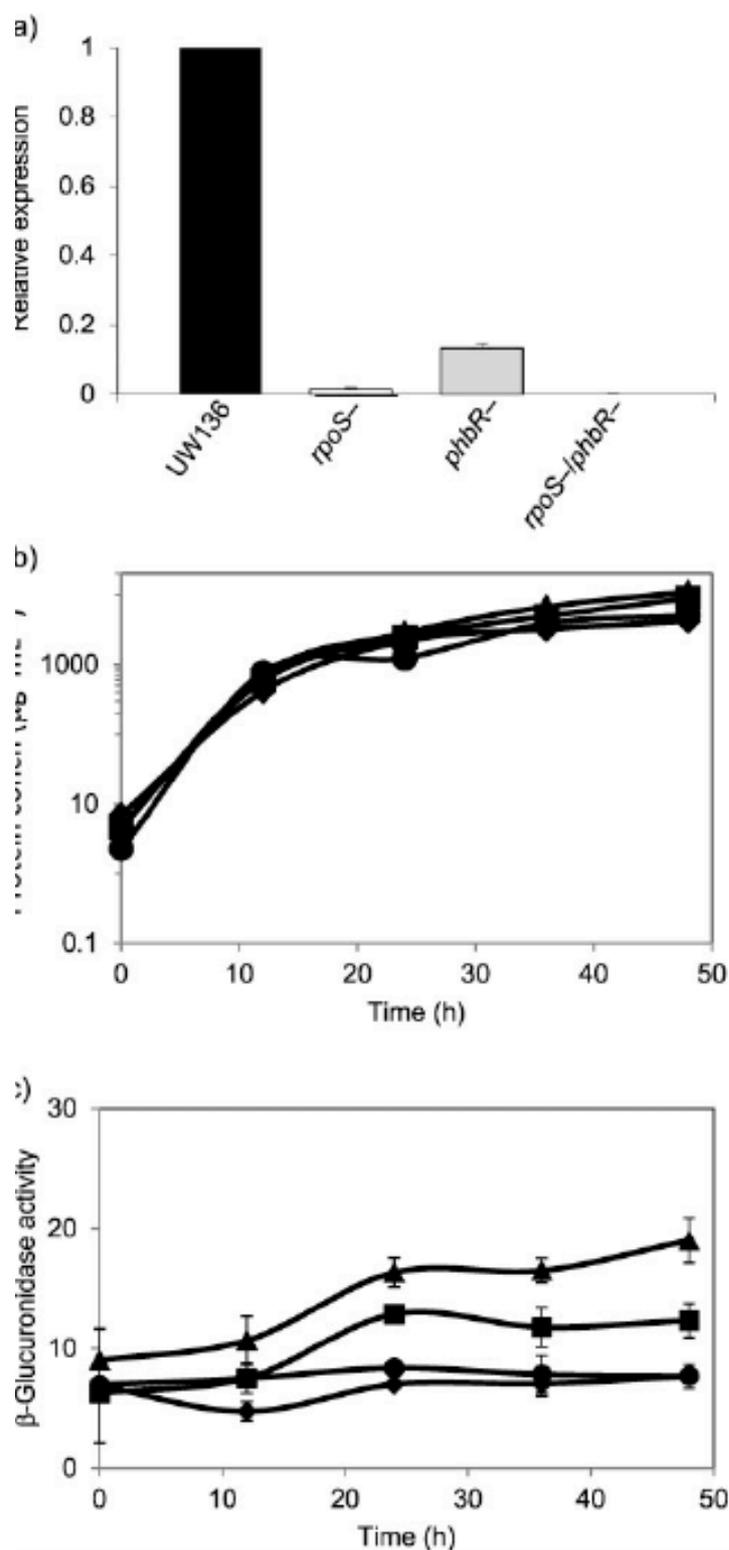


Fig. 4. PhbR and RpoS as positive regulators of *phbR*. (a) qRT-PCR analysis of *phbR* gene expression in the *phbR* and *rpoS* mutants. The data are presented as fold changes of mRNA levels of *rpoS* (white bar), *phbR* (grey bar) and *rpoS-phbR* mutant strains relative to that of strain AHW5 (black bar). (b) Growth of wild-type W136 (▲), and of the isogenic *phbR* (■), *rpoS* (●) and *rpoS-phbR* (◆) strains. (c)  $\beta$ -Glucuronidase activity of a *phbB-gusA* gene fusion in strain AHW5 (▲), and in the isogenic *phbR* (■), *rpoS* (●) and *rpoS-phbR* (◆) strains.

well as to the R1–R2-containing fragment F2. Binding of PhbR to the fragments containing the R1–R2 sites was observed at a PhbR concentration of 1.0  $\mu$ M (Fig. 5b, c). Some binding of PhbR to the larger fragment F1 was observed at a lower PhbR concentration of 0.2  $\mu$ M (Fig. 5b). No binding of PhbR to fragments containing R3–R4 and R5–R6 sites was detected (data not shown), nor to non-specific *psrA* DNA (RR*psrA*) used as a negative control. These results indicate that PhbR activates expression of *phbB* by binding specifically to the promoter region containing the R1 and R2 sequences.

#### In vitro footprinting analysis

DNase footprinting was performed to determine specific binding of PhbR to the direct repeated sequences TGTCACCAA-N<sub>4</sub>-CACTA and TGTCACCAA-N<sub>4</sub>-CAGTA (R1 and R2 sites) present in the –35 to –70 bp region upstream of the  $p_{B1}$  transcriptional start site for *phbB* (Fig. 6a). As shown in Fig. 6(b), PhbR protected the R1–R2 box at 0.5  $\mu$ M, corroborating the data generated by EMSA and indicating that PhbR binds specifically within the R1–R2 boxes. Sequences located upstream and downstream of the PhbR-binding boxes R1–R2 were not protected, even at higher PhbR concentrations (1.0–4.0  $\mu$ M).

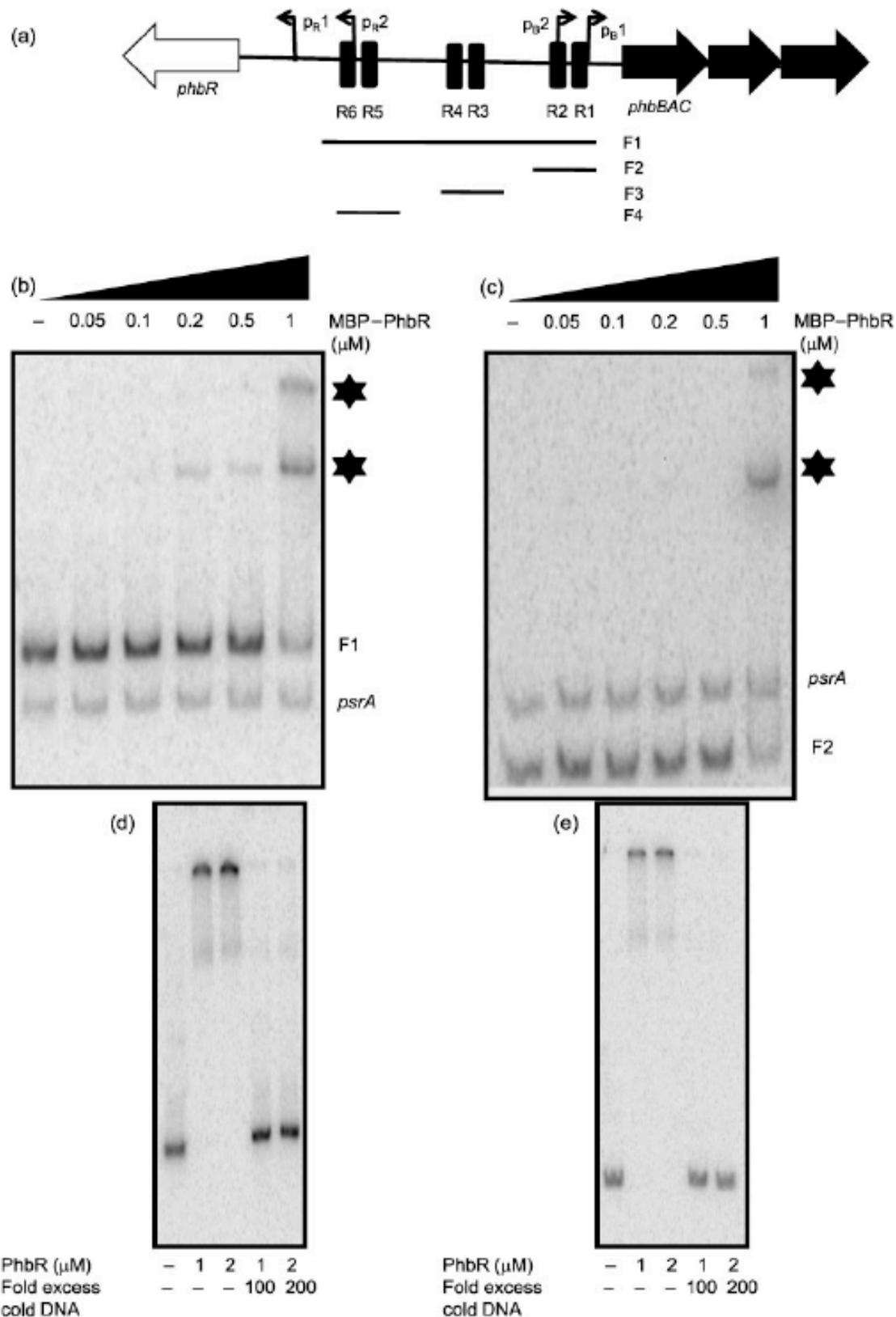
## DISCUSSION

In general, negative regulators bind to promoters, interfering directly with RNA polymerase. In contrast, positive regulators bind to the upstream regions of the promoter, helping to recruit the polymerase and to start transcription (Browning & Busby, 2004).

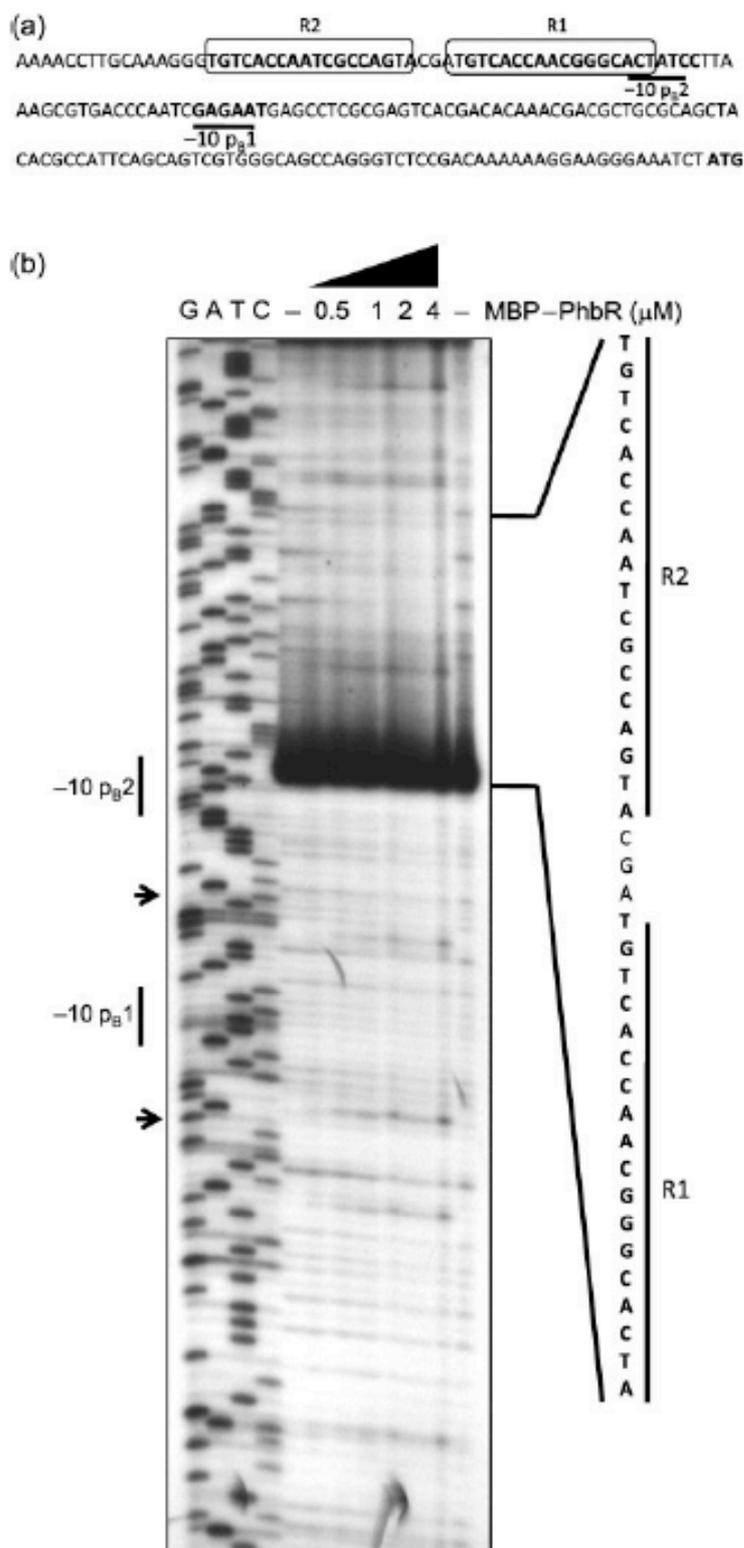
PhbR belongs to the AraC family of transcriptional activators, some of which bind 18–20 nt repeated sequences. We show here that PhbR binds specifically to the 18 bp R1 and R2 sites, where R1 overlaps the –35 region of the  $p_{B1}$  promoter (Fig. 6a). The position of the *A. vinelandii* R1 and R2 sites is similar to the position of some of the binding sites for MelR in the *melAB* promoter of *E. coli*. MelR binds four target sites, named 1', 1, 2' and 2, where site 2' also overlaps the –35 region (Belyaeva *et al.*, 2000). MelR binding to the less conserved site (2') is weak and occurs only in the presence of melibiose (Belyaeva *et al.*, 2000). Modification of the base sequence of this site removes the requirement for melibiose for MelR binding (Tamai *et al.*, 2000). In *A. vinelandii*, the R1 site is almost identical to the R2 site, suggesting that no inducer is required for activation of *phbB* by PhbR.

The data presented in this study, together with previously published data (Peralta-Gil *et al.*, 2002), confirm that PhbR activates the *phbB* gene.

In *E. coli*, the *melR* gene is expressed from a divergent promoter upstream of the *melAB* promoter. MelR also binds to a site that overlaps the –10 region of the *melR*



**Fig. 5.** PhbR protein binds the *phbB* promoter region. (a) Schematic representation of the *phbR*-*phbB* intergenic region, showing the position of the *phbB*  $p_{B1}$  and  $p_{B2}$  and *phbR*  $p_{R1}$  and  $p_{R2}$  promoters (transcription start sites) and the proposed PhbR-binding sites R1 to R6 (Peralta-Gil *et al.*, 2002). The PCR F fragments used for the EMSA for the binding of PhbR are depicted. (b, c) EMSA showing the binding of various concentrations of PhbR (0.05–1  $\mu\text{M}$ ) to the F1 fragment (b) or to the F2 fragment (c). Stars show PhbR-DNA complexes. (d) Competition assay for PhbR-F1 complex formation to verify the binding specificity. Competition reactions used specific unlabelled competitor (F1 fragment) at the concentrations shown. (e) Competition assay for PhbR-F2 complex formation to verify the binding specificity. Competition reactions used specific unlabelled competitor (F2 fragment) at the concentrations shown.



**Fig. 6.** (a) The *phbB* promoter region. The R1 and R2 sequences are boxed. The -10 regions for p<sub>B1</sub> and p<sub>B2</sub> are underlined. (b) DNase I footprinting analysis of the interaction of PhbR with the *phbB* promoter region. The reaction mixture was treated as described in Methods, and the sequencing ladder was generated with plasmid pCT2P and oligonucleotide footphbR4. -, Absence of PhbR. The -10 regions of the p<sub>B1</sub> and p<sub>B2</sub> promoters are indicated. The arrows show the start sites for *phbB* transcription. The R1 and R2 sequences protected from degradation are also shown.

promoter to downregulate its own expression (Wade *et al.* 2000; Samarasinghe *et al.*, 2008).

The results presented here indicate that PhbR autoregulate its own expression positively. This regulation may be carried out in a direct manner, by binding to the R5 and R6 site present upstream of the p<sub>R1</sub> promoter region. However, no specific binding of PhbR to a fragment carrying R5 and R6 sites was observed *in vitro* in the EMSA assays. This result indicates either that PhbR indirectly activates its own transcription, or that a metabolite is required for PhbR binding to these less conserved R5 and R6 sites, similar to the requirement for melibiose in the binding of MelR to the less conserved site 2 (Belyaeva *et al.*, 2000).

PhbR orthologues are present in *Azotobacter* strain FA (Pettinari *et al.*, 2001) and in *Pseudomonas* sp. strain 61- (Matsusaki *et al.*, 1998). In these bacteria, direct repeat sequences of 18 bp similar to the R1 and R2 PhbR-binding sites are present upstream of the PHB biosynthetic genes which are also organized in a *phbBAC* cluster. Thus, in these bacteria, activation of the PHB biosynthetic operon by PhbR is expected to occur as in *A. vinelandii*.

Similar to PhbR, RpoS plays an important role in the activation of transcription of the *phbB* and *phbR* genes, as indicated by the negative effect of the *rpoS* mutation on the levels of *phbB* and *phbR* mRNAs and the kinetics of transcription of *phbB*::*gusA* and *phbR*::*gusA* gene fusions showing that induction of transcription occurs upon entrance into the stationary phase in an RpoS-dependent manner.

These observations are in agreement with previous published data that show a significant reduction of the *phbR* transcript levels initiated from the p<sub>R2</sub> promoter in the *rpoS* mutant (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Whether RpoS directly activates *phbR* remains to be investigated. No RpoS recognized sequences are present in the -10 sequences of the p<sub>R1</sub> or p<sub>R2</sub> promoters (Peralta-Gil *et al.*, 2002) suggesting that RpoS control of *phbR* expression is indirect.

The control of PHB synthesis by RpoS is also in agreement with previous observations that indicate that in *A. vinelandii*, accumulation of *rpoS* mRNA, as well as PHB occurs mainly in cells entering the stationary phase and during the stationary phase (Castañeda *et al.*, 2001; Sandercocock & Page, 2008; Martínez *et al.*, 1997).

We propose that the activation of *phbR* expression by RpoS allows an increase in the concentration of PhbR in the stationary phase, which in turn further increases its concentration by autoactivation (in the presence of an inducer), allowing activation of the *phbBAC* biosynthetic operon and the synthesis of PHB in the stationary phase.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A. H.-E. thanks CONACYT for financial support during his PhD studies. M. C. thanks DGAPA for a postdoctoral fellowship. We thank Daniel Segura for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63–67.
- Ali, A., Blanco, G., Hill, S. & Kennedy, C. (1992). Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1711–1718.
- Belyaeva, T. A., Wade, J. T., Webster, C. L., Howard, V. J., Thomas, M. S., Hyde, E. I. & Busby, S. J. (2000). Transcription activation at the *Escherichia coli* *melAB* promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein. *Mol Microbiol* **36**, 211–222.
- Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**, 57–65.
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and  $\sigma^S$  form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**, 6787–6793.
- Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D. & Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* **157**, 1685–1693.
- Conaghan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Johnson, D. C., Unciuleac, M. C. & Dean, D. R. (2006). Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **188**, 7551–7561.
- Kennedy, C., Gamal, R., Humphrey, R., Ramos, J., Bringle, K. & Dean, D. (1986). The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. *Mol Gen Genet* **205**, 318–325.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- Martínez, P., Guzmán, J. & Espín, G. (1997). A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Lett* **19**, 909–912.
- Matsusaki, H., 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**, 6459–6467.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A. & Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 176–495.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008). Enzyme I<sup>Ntr</sup>, NPr and IIA<sup>Ntr</sup> are involved in regulation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**, 244–254.
- Page, W. J. & von Tigerstrom, M. (1978). Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can J Microbiol* **24**, 1590–1594.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* **184**, 5672–5677.
- Pettinari, M. J., Vázquez, G. J., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A. & Méndez, B. S. (2001). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5331–5334.
- Samarasinghe, S., El-Robh, M. S., Grainger, D. C., Zhang, W., Soultanas, P. & Busby, S. J. (2008). Autoregulation of the *Escherichia coli* *melR* promoter: repression involves four molecules of MelR. *Nucleic Acids Res* **36**, 2667–2676.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandercock, J. R. & Page, W. J. (2008). RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. *J Bacteriol* **190**, 946–953.
- Segura, D. & Espín, G. (1998). Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* *ptsP* affects poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **180**, 4790–4798.
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* **179**, 437–443.
- Tamai, E., Belyaeva, T. A., Busby, S. J. W. & Tsuchiya, T. (2000). Mutations that increase the activity of the promoter of the *Escherichia coli* *melB* operon improve the binding of MelR, a transcription activator triggered by melibiose. *J Biol Chem* **275**, 17058–17063.
- Wade, J. T., Belyaeva, T. A., Hyde, E. I. & Busby, S. J. W. (2000). Repression of the *Escherichia coli* *melR* promoter by MelR: evidence that efficient repression requires the formation of a repression loop. *Mol Microbiol* **36**, 223–229.

Edited by: M. F. Hynes

# ANEXO 2

**The *phbB* and *phbR* mRNAs involved in polyhydroxybutyrate synthesis are targets of the posttranscriptional repressor protein RsmA in *Azotobacter vinelandii***

**Alberto Hernandez-Eligio, Soledad Moreno, Mildred Castellanos, Miguel Castañeda, Guadalupe Espín**

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. 62210, México.

**Abstract**

In *Azotobacter vinelandii* the *phbBACD* operon encodes the enzymes of polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis and is activated by the transcriptional regulator PhbR. The two-component GacS/GacA system is required for synthesis of PHB and of the exopolysaccharide alginate. GacA was shown to control alginate synthesis by posttranscriptional repression of *algD* through the Rsm regulatory system. The RsmA proteína was shown to interact with the *algD* mRNA acting as a translational repressor, and GacA was found to activate transcription of *rsmZ1* and *rsmZ2* genes encoding small RNAs that interact with RsmA to counteract its repressor activity. In this study the regulation of PHB synthesis by the Gac-Rsm system was examined in the non-mucoid strain UW136. We show that *gacA* is required for transcription of 7 *rsmZ* and 2 *rsmY* genes present in the *A. vinelandii* genome, and that inactivation of *rsmA* resulted in PHB overproduction. Transcriptional and translational *phbB-gusA* and *phbR-gusA* gene fusions were used to show that the *gacA* mutation negatively affected the expression of *phbB* and *phbR* genes at the translational level. We also demonstrated *in vitro* interaction of RsmA with RNAs corresponding to *phbB* and *phbR* mRNA leaders and showed that the stability of *phbR* and *phbB* mRNAs is increased in the *rsmA* mutant. Taken together these results show that the expression of *phbR* and *phbB* is post-transcriptionally controlled by the GacA-Rsm system.

**Introduction**

*Azotobacter vinelandii* is a nitrogen-fixing soil bacterium that produces polyhydroxybutyrate, a polymer of industrial interest (Galindo et al 2007). Synthesis of PHB is carried out in three enzymatic steps: a  $\beta$ -ketothiolase catalyzes the condensation of two molecules of acetyl-CoA to produce acetoacetyl-CoA which is

reduced by the NADPH dependent acetoacetylCoA reductase to form  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA, which is polymerized by the PHB synthase. The genes coding for the enzymatic activities  $\beta$ -ketothiolase *phbA*, acetocetylCoA reductase *phbB*, and PHB synthase *phbC* are organized in the *phbBAC* operon (Segura et al 2003). Upstream *phbB* an in opposite direction, *phbR* which encodes a transcriptional activator of the AraC family is present. Transcription of *phbBAC* biosynthetic operon is initiated from two overlapping promoters pB1 and pB2 (Peralta-Gil et al 2002). PhbR and RpoS act as activators of *phbB* and *phbR*. PhbR binds specifically to the direct repeated sequence, TGTCACCAA N-4 CACTA present in the *phbB* promoter region (Hernandez-Eligio et al 2011).

Previous work indicated that regulation of PHB synthesis in *A. vinelandii* is complex and in addition to *phbR* and *rpoS*, involves different groups of genes: the non-phosphorylated form of IIA<sup>Ntr</sup> protein of the nitrogen-related phosphotransferase system encoded by *ptsN*, was shown to be involved in negative regulation of *phbR* and *phbBAC* expression (Noguez et al 2008); also inactivation of two component system, *gacS* and *gacA* genes was shown to impair PHB production (Castañeda et al 2000, 2001).

In many proteobacteria GacA homologs activate transcription of one or more small RNAs called CsrB/RsmZ/Y/X, these RNAs together with a protein called CsrA/RsmA constitute the post-transcriptional regulatory system Gac-Rsm, where RsmA binds to its mRNA targets acting as a translational repressor, and the Rsm sRNAs bind RsmA counteracting its repressor activity.

A single *rsmA* gene, seven *rsmZ* (*rsmZ1-7*) and two *rsmY* (*rsmY1/2*) homologs were previously identified in the *A. vinelandii* genome Manzo et al 2011. A GacA binding sequence **TGTAAG N6 CTTACA** is present in the promoter regions of all *rsmZ1-7* genes, and *rsmY1-2*, and transcription of *rsmZ1* and *rsmZ2* was confirmed to be dependent on GacA (Manzo et al 2011).

GacA also controls the transcription of *rsmZ* homologs in *P. fluorescens* [Heeb et al 2002, Aarons et al 2000], *P. aeruginosa* [Heulier et al 2004], *E. carotovora* [Cui et al 2001], *E. coli* and *Salmonella* [Susuki et al 2002, Teplitski et al 2003]. Furthermore, the over-expression of RsmZ homologs in *A. vinelandii* and *P. fluorescens* suppresses the effects of *gacA* mutations [Manzo et al 2011, Heeb et al 2002, Aarons et al 2000]. In *Pseudomonas* species RsmA binds to a *hcn* transcript encoding hydrogen cyanide synthesis (Pessi et al 2001, Lapouge et al 2008). Binding of RsmA protein resulted in a rapid degradation of the target mRNAs (Liu et al 1995, Romeo 1998). Thus, the Gac and Rsm systems form part of a signal transduction pathway in gamma-proteobacteria (Lapouge 2008). In *A. vinelandii* the Gac-Rsm systems control expression of *algD* encoding the key enzyme of the alginate biosynthetic pathway. The RsmA protein was shown to bind RsmZ1, RsmZ2 and the *algD* untranslated RNA 5' leader (Manzo et al 2011).

In this study we investigated the regulation of PHB synthesis by the Gac-Rsm system in the non-mucoid UW136 strain where most of our studies on PHB synthesis and

regulation have been carried out (Segura & Espin 1998, Segura 2003, Peralta-Gil 2002, Hernandez-Eligio 2011) We found that in *A. vinelandii* GacA is required for transcription of all genes encoding the RsmZ and RsmY RNAs, and that the Gac-Rsm system, controls PHB synthesis post-transcriptionally by binding of RsmA to the *phbR* and *phbB* transcripts that prevents their translation and causes a negative effect on *phbR* and *phbB* mRNAs stability.

## RESULTS

### **GacA is required for transcription of the *rsmZ* and *rsmY* genes in *A. vinelandii*.**

Transcription of *rsmZ1* and *rsmZ2* was shown to be dependent on GacA (Manzo et al 2011). To determine whether transcription of *rsmZ3*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6*, *rsmZ7*, *rsmY1* and *rsmY2* genes was also dependent on GacA. A Northern blot experiment was carried out to determine the presence of these *rsmZ* and *rsmY* transcripts in strains UW136 and the *gacA* mutant. Transcripts corresponding to the RsmZ3-7 and RsmY1-2 RNAs, were detected in the wild type UW136 strain, whereas none of these transcripts were detected in the *gacA* mutant (Fig. 1). These data strongly suggest that GacA directly activates the genes encoding the 7 *rsmZ* and the 2 *rsmY* paralogs present in the *A. vinelandii* genome, and that in the *gacA* mutant none of the Rsm sRNA is present to counteract the negative effect of RsmA.

**RsmA controls PHB biosynthesis.** As shown above GacA is required for expression of all regulatory RNAs *rsmZ1-7* and *rsmY1-2* in *A. vinelandii* (Manzo et al and this study). RsmZ1 and RsmZ2 were shown to interact with the RsmA protein and counteract its activity as transcriptional repressor of *algD* (Manzo et al 2011). In order to investigate whether the RsmA protein participates in the control of PHB biosynthesis in *A. vinelandii*, we constructed, as described in Material and Methods strain AhrsmA, an UW136 derivative carrying an *rsmA* mutation PHB production by the *rsmA* mutant increased by 2-fold, as compared to the wild type strain (Table 2).

These data supports the hypothesis that the Rsm system participates in the control of PHB production by GacA. In contrast to the *gacA* mutation that completely abrogated synthesis of alginate, inactivation of *rsmZ1* or *rsmZ2* or both reduced but not abrogated alginate production, Similarly in a *rsmZ1* mutant derived from UW136 PHB production was reduced, whereas the *gacA* mutation as expected, completely abrogated PHB synthesis. The partial effect of the *rsmZ* mutations on alginate and PHB production can be explained the presence of other *rsmZ* and *rsmY* paralogs.

### **Post-transcriptional regulation of *phbR* and *phbB***

PhbR is the transcriptional activator of the PHB biosynthetic operon *phbBAC* (Hernandez-Eligio et al 2011). As shown above, mutations in *gacA*, *rsmA* or *rsmZ1* affected PHB synthesis. In order to identify the targets of the *rsm* control and to determine whether effects of the *gacA*, *rsmA* and *rsmZ1* mutations are at the translational level, transcriptional and translational *phbR-gusA* gene fusions were constructed. The induction kinetics of *phbR* transcription and translation was determined *in vivo* by measuring the  $\beta$ -glucuronidase activity in strains AHW13, an UW136 derivative carrying the *phbR-gusA* transcriptional fusion, and their derivatives AHW16, AHW14 and AWW15 carrying a *gacA*, *rsmA* and *rsmZ1* mutations respectively. As shown in Fig. 2A,  $\beta$ -glucuronidase activity in AHW13 strain increased upon entrance to the stationary phase. Fig. 2A also shows that the *gacA*, *rsmA* or *rsmZ1* mutations did not significantly affected the  $\beta$ -glucuronidase activity of the *phbR-gusA* transcriptional fusion.

Fig 2B shows the kinetics of  $\beta$ -glucuronidase activity in strain AHW17 an UW136 carrying the *phbR-gusA* translational fusion and its derivatives AHW20, AHW18, and AHW19 carrying the *gacA*, *rsmA* and *rsmZ1* mutations. A strong reduction of this activity was observed in the *gacA*, a partial reduction was also observed in the *rsmZ1*, whereas the *rsmA* mutation caused an increase in this activity. Taken together these results indicate that inactivation of *gacA* or *rsmZ* mutations negatively affected translation of *phbR*.

The effect of the *gacA*, *rsmZ1* and *rsmA* mutations on transcription and translation of *phbB* were also determined. An UW136 derived strain carrying transcriptional and translational *phbB-gusA* gene fusions, and its derivatives with *gacA*, *rsmZ1* and *rsmA* were also constructed. The kinetics of the  $\beta$ -glucuronidase activity in these strains is shown in Fig. 2, Negative effects of the *gacA* and *rsmZ1* mutations were observed in both the transcriptional (Fig. 2C) and the translational (Fig. 2D) gene fusions. The negative effect observed in the transcriptional *phbB-gusA* fusions is expected, since, as shown above, the *gacA* and *rsmZ1* reduced translation of *phbR* thus, reducing the level of PhbR, the transcriptional activator of *phbB*. Therefore the question whether expression of *phbB* is also postranscriptionally controlled by Gac-Rsm, remains open.

### **Identification of the RsmA binding sites in the *phbR* and *phbB* transcripts**

We carried out an analysis of the *phbB* and *phbR* Shine Delgarno (SD) region and identified potential RsmA binding sites that matched the SELEX-derived binding site consensus CANGGANG (Dubey et al 2005) sequence. In *phbR* a putative binding site matched in X out of 12 positions. In *phbB* a binding site matched (X out of 12). Interestingly, these putative binding sites matched with the algD RsmA binding site (Manzo et al 2011), and with *hfq/CsrA* binding site characterized in *E. coli* (Baker et al 2007) (Fig. 3).

**RsmA binds to 5' leader of the *phbR* and *phbB* transcripts.**

To determine binding of RsmA protein to the *phbB* and *phbR* mRNAs, we generated by *in vitro* transcription, a 200 nucleotide transcript corresponding to the 5' *phbR* leader, and a 200 nucleotide transcript corresponding to the 5' *phbB* leader. Purified RsmA and *phbR* and *phbB* RNA leaders were used in RNA gel mobility shift experiments. As shown in Fig. 4A and B, the interaction of RsmA with both *phbB* and *phbR* transcripts was observed. As specificity control we carried out competence experiments with unlabeled (cold) *phbR* and *phbB*. A X- fold molar excess of unlabeled *phbR* or *phbB* prevented the electrophoretic shift mobility of radiolabelled RR*phbR* and RR*phbB*. Also RsmA does not change the electrophoretic mobility of an unspecific RNA (TZ19R).

**Effect of the *rsmA* mutation on *phbB* and *phbR* mRNAs stability.** In *E. coli* CsrA has been shown to bind to the to *glgC* mRNA (Baker et al 2002). Additionally a mutation in *csrA* caused instability *glgC* mRNA (Liu et al 1995). As shown above RsmA interacts *in vitro* with the *phbB* and *phbR* transcripts. We examined the effect of the *rsmA* mutation on the decay of the *phbB* and *phbR* mRNAs after addition of rifampicin to cultures of strains grown on PY medium. RNA was isolated from these cultures at 0, 1, 3 6 and 12 minutes after the addition of rifampicin and the *phbB* and *phbR* transcripts was quantified by qRT-PCR. As shown in Fig. 5 a and b the *rsmA* mutation had a significant effect on the stability of the *phbR* and *phbB* transcripts since the level of these transcripts is reduced by 45% and 50% within the first minute after the addition of rifampicin. After 24 minutes the levels of these mRNAs are reduced to similar levels in the wild type as in the *rsmA* mutant (point not shown).

**Effect of *gacA*, *rsmZ1* and *rsmA* mutations on the levels of *phbB* and *phbR* transcripts.** As shown above, a mutation in *rsmA* caused instability of the *phbR* and *phbB* mRNAs. Thus, it was expected that the levels of these RNAs should be higher in the *rsmA* mutant, and reduced in the *gacA* and the *rsmZ1* mutants. The levels of transcripts corresponding to *phbB* and the *phbR* genes were monitored strains AhgaC, AHrsmA and AHrsmB carrying *gacA*, *rsmB* and *rsmA* mutations respectively. The mRNA levels were determined by qRT-PCR. As shown in Fig. 6, the in the *rsmA* mutant the level of the *phbB* and *phbR* transcripts were increased whereas the *gacA* and *rsmZ1* mutations caused a reduction of these transcripts. These results suggest that in the *gacA* mutant, the absence of RsmZ and RsmY sRNAs allows interaction of RsmA with the *phbR* and *phbB* mRNAs preventing their translation and promoting its degradation.

**DISCUSSION**

The posttranscriptional control is more important in the regulation of gene expression than previously visualized. The control of translation provides certain plasticity and a fast response to changes in environmental or physiological changes. This study showed that the post-transcriptional regulatory protein RsmA participates in one pathway by which the *A. vinelandii* GacS/A system regulates PHB biosynthesis. As in many bacteria, for a review see Lapouge et al. (), the *A. vinelandii* *rsmZ1-7* and *rsmY1-2* genes encoding regulatory RNAs were shown to be under GacA activation (Manzo et al 2011, this study). Although *in vitro* binding of RsmA protein has been shown only for RsmZ1 and RsmZ2 (Manzo et al 2011), it is likely that all nine rsm RNAs bind RsmA to counteract its activity as a translational repressor. In the *gacA* mutant none of the Rsm sRNA is transcribed to counteract the negative effect of RsmA on translation of *phbR* and *phbB* causing the negative PHB phenotype observed in this strain.

Here we constructed an UW136 derivative carrying an *rsmA* mutation and found that the *rsmA* mutation confers a PHB over-producing phenotype. Using translational *phbR-gusA* and *phbB-gusA* gene fusions, we showed that as in other bacterial species, control of gene expression by Gac/Rsm in *A. vinelandii* is post-transcriptional. Indeed, the presence of RsmA binding sites at or near the Shine-Dalgarno sequence within the *phbR* and *phbB* mRNAs; the *in vitro* RsmA-RR*phbB* and RsmA-RR*phbR* interactions showing binding of RsmA to these transcripts indicated that the *phbR* and *phbB* mRNAs are targets of the posttranscriptional control exerted by the RsmA protein. We presented data showing that in the absence of RsmA the stability of these transcripts is higher than in the wild type. Additionally by qRT-PCR we detected reduced the levels of the *phbB* and *phbR* mRNAs in the *gacA* mutation whereas the levels of these transcripts are increased in the *rsmA* mutant, further confirming the instability of the *phbR* and *phbB* transcripts caused by their binding to RsmA.

PhbR is a transcriptional activator of *phbB* (Peralta-Gil et al 2002, Hernandez-Eligio et al 2011). The *phbR* gene encoding this activator protein is transcribed from two promoters known as pR1 and PR2. The *phbB* gene is also transcribed from two overlapping promoters pB1 and pB2. PhbR is required for transcription from PB1, whereas the RpoS sigma factor is required for activation of the second *phbB* promoter PB2 (Peralta-Gil et al 2002, Hernandez-Eligio et al 2011). Thus, conditions that switch off synthesis of PHB would require the switching off of four different promoters, therefore the mechanism by which RsmA impairs translation of the four transcripts may be advantageous allowing the cell to switch off genes having multiple promoters that are subject to complex control of its expression.

Another example of RsmA controlling expression of genes transcribed from more than one promoter is the alginate biosynthetic gene *algD* that is transcribed from three promoters producing three different transcripts (Campos et al 1996) and was recently shown to be under post-transcriptional control by RsmA (Manzo et al 2011).

## MATERIALS AND METHODS

**Microbiological procedures.** Bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. Media and growth conditions were as follows: *A. vinelandii* was grown at 30°C in Peptone

Yeast (PY) or Burk's nitrogen-free salts medium (Kennedy et al 1986) supplemented with 2% sucrose. *E. coli* strains DH5 $\alpha$  and TOP10 were grown on Luria-Bertani medium (LB) at 37°C. Antibiotic concentrations used (in micrograms per milliliter) for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were as follows: tetracycline, 15 and 15; kanamycin (Km), 5 and 30; ampicillin (Ap), not used and 100; nalidixic acid (Nal), 20 and 20; streptomycin (Sm), 2 and 20; and gentamicin (Gm), 1.5 and 10. *A. vinelandii* transformation and conjugation were carried out as previously described Bali et al. (). The PHB production was measured as described (Segura & Espin 1998).

**Nucleic acids procedures.** DNA isolation and cloning, Southern blotting, and random primer procedures were carried out as described earlier (Sambrook et al 1989). DNA sequencing was done with Perkin Elmer/Applied Biosystems DNA Sequencer. The sequences of all primers used in this study are shown in Table 1

**Construction of *rsmA*, *rsmZ1*, and *gacA* mutants.** To construct the *A. vinelandii rsmA* mutant, a 2 kb fragment containing *rsmA* was amplified by PCR using Vent DNA Pol with primers RSMA2D and RSMA2R. The PCR product was cloned into the *SmaI* site of pBluescript II KS to generate plasmid pMCY3. A *HindIII-BamHI* fragment of pMCY3 was sub-cloned into pUC18 producing plasmid pMCY4. This plasmid was used as the template to delete a 160 bp fragment of *rsmA* by inverse PCR. The primers RSMAdelD and RSMAdelR, containing *SalI* restriction sites, were used in this experiment. The amplified fragment was digested with *SalI* and ligated, generating plasmid pMCY5. The 160 bp deletion of *rsmA* in this plasmid was verified by PCR and DNA sequencing. A Sm interposon from plasmid pBSL130 (Alexeyev et al., 1995) was inserted into the *SalI* site of pMCY5 to generate plasmid pMYC6. *A. vinelandii* UW136 and OP were transformed with this plasmid, and Sm-resistant transformants were selected and confirmed by Southern blot analysis. To construct the *rsmZ1* mutant, *A. vinelandii* UW136 competent cells were transformed with plasmids pCV3 carrying the *rsmZ1::Km*, and Km-resistant transformants were selected (Manzo et al 2011). The corresponding gene disruption was confirmed by Southern blot analysis. To construct to *gacA* mutant, *A. vinelandii* UW136 competent cells were transformed with plasmids pSAFA3 carrying the *gacA::Gm* mutation, Gm-resistant transformant were selected and confirmed by Southern blot analysis (Castañeda et al 2001).

### **Construction of *gusA* transcriptional and translational fusions.**

For the transcriptional *gusA* gene fusions we constructed a three pieces DNA fragment by a recombinant PCR technique. The flanking fragments; a 465 and a 469 bp fragments corresponding to the *A. vinelandii* chromosomal regions 1178950-1179430 and 1179861-1180526 respectively were amplified using the Gus12230-1 and Gus12230-2; and Gus12230-5 and Gus12230-6 primers, and chromosomal DNA from strain UW136 as template. The central fragment carries the *gusA* gene with its Shine-Dalgarno sequence amplified with Gus12230-3 and Gus12230-4 primers using pCAM140 vector (Wilson et al 1995) as template. Recombinant PCR using the three DNA fragments was used to produce a 3.0-kb fragment that contains *SacI* restriction

sites on both ends (incorporated within the flanking primers Gus12230-1 and Gus12230-6). This fragment was cloned into vector pCN44 as a *SacI* fragment to produce plasmid pCN54. A 2-Kb *HindIII* fragment carrying the Tc resistance cassette from plasmid pBSL190 (Alexeyev et al 1995) was cloned into a *HindIII* site (incorporated within the gusA12230-4 primer), downstream and in the same orientation of the *gusA* gene rendering plasmid pAHFUTs-Tc. Several unique restriction sites, immediately upstream the *gusA* SD sequence, were incorporated within the oligonucleotide GusA12230-3 (*EcoRI*, *NotI* and *XbaI*). The promoter region from *phbR* (*prphbR*) gene was amplified with TransFusRFw and TransFusRRev primers. The resultant 0.188-Kb fragment was cloned into the *EcoRI* site of pAHFUTs-Tc to produce pAHFUTs-R.

A 0.182-Kb fragment corresponding to the promoter region from *phbB* (*prphbB*) gene was amplified with TransphbBFw and TransphbBRev primers, and cloned into the *EcoRI* of plasmid pAHFUTs-Tc to produce plasmid pAHFUTs-B

Plasmids pAHFUTs-R and pAHFUTs-B were digested with *SacI* and transformed into UW136, *rsmA*-, *rsmZ1*- and *gacA*- strains. Transformants of each strain carrying the *phbR-gusA* and *phbB-gusA* transcriptional fusions within the *A. vinelandii* chromosome were isolated and named AHW13, AHW14, AHW15, AHW16, and AHW21, AHW22, AHW23, AHW24, respectively. The presence of the *phbR-gusA* or *phbB-gusA* transcriptional fusions within chromosomal region of these strains was confirmed by PCR analysis (data not shown).

For construction of the translational *gusA* fusion, inverse PCR using pCN54 as template, and primers gusAfusionFw and gusAfusionRev was carried out to generate plasmid pAHFUTd containing *PstI*, *PvuII* and *EcoRV* sites within the *gusA* coding region. The Tc cassette from pBSL190 was cloned into the *HindIII* site of pAHFUTd generating plasmid pAHFUTd-Tc. A 0.240-Kb fragment containing the promoter region, translation regulatory elements and the first 4 codons from *phbR* gene, was amplified with TransphbRFw and TradphbRRev primers. This fragment was digested with *EcoRI* and *PstI*, and ligated with pAHFUTd-Tc, previously digested with these enzymes. The plasmid with a *phbR-gusA* translation fusion, was called pAHFUTd-R and sequenced to verify that not change the reading frame occurred. A 0.251-Kb fragment that containing a promoter region, translation regulatory elements and the first 4 codons from *phbB* gene, was amplified with TransphbBFw and TradphbBRev primers. This fragment was digested with *EcoRI* and *PstI*, and ligated with pAHFUTd-Tc, previously digest with these enzymes. The plasmid with a *phbB-gusA* translation fusion, was called pAHFUTd-B and sequenced to verify that not change the reading frame.

Plasmids pAHFUTd-R and pAHFUTd-B were digested with *SacI* and transformed into UW136, *rsmA*-, *rsmZ1*- and *gacA*- strains. Transformants of each strain carrying the *phbR-gusA* and *phbB::gusA* translational fusions were isolated and named AHW17, AHW18, AHW19, AHW20, and AHW25, AHW26, AHW27, AHW28, respectively. The presence of these *phbR::gusA* and *phbB::gusA* translational fusions within *transposase* was confirmed by PCR analysis (data not shown).

For construction of the *rsmZ* and *rsmY* transcriptional fusions, fragments containing the promoter regions (pr) from *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ3*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6*, *rsmZ7*, *rsmY1* and *rsmY2* genes were amplified with Z1Fw/Z1Rev, Z2Fw/Z2Rev, Z3Fw/Z3Rev, Z4Fw/Z4rev, Z5Fw/Z5Rev, Z6Fw/Z6Rev, Z7Fw/Z7Rev, Y1Fw/Y1Rev and Y2Fw/Y1Rev primers. The 0.404-kb, 0.071-kb, 0.373-kb, 0.388-kb, 0.318-kb, 0.336-kb and 0.368-kb resultant fragments (*pr**rsmZ1*, *pr**rsmZ2*, *pr**rsmZ4*, *pr**rsmZ5*, *pr**rsmZ6*, *pr**rsmZ7* and *pr**rsmY1* respectively) were digested with *EcoRI*, and ligated separately with pAHFUTs-Tc previously digested with *EcoRI*. The resulting plasmids were called pSAHFUTs-Z1, pSAHFUTs-Z2, pSAHFUTs-Z4, pSAHFUTs-Z5, pSAHFUTs-Z6, pSAHFUTsZ7 and pSAHFUTs-Y1; and the promoter region is in the same direction that *gusA* gene. The 0.324-kb and 0.368-kb fragments belonging to *pr**rsmZ3* and *pr**rsmY2* were digested with *XbaI*, and ligated with pAHFUTs-Tc previously digested with *XbaI*. The resulting plasmids were called pSAHFUTs-Z3 and pSAHFUTs-Y2. This plasmid carry the promoter regions in the same orientation that *gusA* gene.

The plasmids pSAHFUTs-Z2, pSAHFUTs-Z3, pSAHFUTs-Z4, pSAHFUTs-Z5, pSAHFUTs-Z6, pSAHFUTsZ7, pSAHFUTs-Y1 and pSAHFUTs-Y2 were digested with *SacI* and the plasmid pSAHFUTs-Z1 with *ScaI*. The plasmids digested were transformed into UW136 and *gacA*- strains. Transformants of each strain carrying the *rsm()*-*gusA* transcriptional fusions were isolated and named SAHWZ1, SAHWZ2, SAHWZ3, SAHWZ4, SAHWZ5, SAHWZ6, SAHWZ7, SAHWY1, SAHWY2, SAHWGZ1, SAHWGZ2, SAHWGZ3, SAHWGZ4, SAHWGZ5, SAHWGZ6, SAHWGZ7, SAHWGY1 and SAHWGY2. The presence of the *rsm()*-*gusA* transcriptional fusions within *transposase* was confirmed by PCR analysis (data not shown).

### **Purification of His<sub>6</sub>-RsmA.**

The His<sub>6</sub>-RsmA protein was overexpressed in *E. coli* BL21/pYG1, and purified by Ni-nitrilotriacetic acid affinity chromatography (Qiagen) as described previously (Manzo et al 2011). The eluted protein was dialyzed against interaction buffer (40 mM Tris-acetate pH 8.0, 4 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM KCl) and concentrated using Microcon YM-3 (Amicon) at 4°C and stored at -20°C. Protein contents were estimated with the Lowry method with bovine serum albumin as the standard (Lowry et al 1951).

### ***In vitro* transcription of the *phbB* and *phbR* 5' leaders.**

The *phbB* and *phbR* and *sodB* regulatory region (RR), which contained the Shine Delgarno sequences, were amplified and cloned in pTZ19R. The RR*phbR* was amplified from

UW136 with the primers uptransphbR and lowtransphbR. The 0.317-kb fragment was digested with *Pst*I and *Kpn*I, and ligated to pTZ19R (Fermentas) to produce plasmid pAHTRANSR. The RR*phbB* was amplified from UW136 with the primers uptransphbB and lowtransphbB. The 0.327-kb fragment was digested with *Pst*I and *Bam*HI, and ligated to pTZ19R to produce plasmid pAHTRANSB. The RR*sodB* was amplified with the primers sodBupexp and sodBlwexp. The 0.117-kb fragment was digested with *Hind*III and *Eco*RI, and ligated to pTZ19R to produce plasmid pLM1. The cloned PCR products (pAHTRANSR, pAHTRANSB and pLM1) were used to generate the *phbR*, *phbB* and *sodB* transcripts. Radioactively labelled RR*phbB* and RR*phbR* transcripts were synthesized *in vitro* using the TranscriptAid T7 Transcription Kit (Fermentas) following the manufacturer's instructions in the presence of [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-CTP. Unlabeled competitor RNAs (RR*phbR*, RR*phbB*, or RR*sodB* leader) were synthesized following the same protocol but with unlabeled CTP. RNA was separated from the purified protein fractions by two extractions with phenol: chloroform (1:1) and once with chloroform. RNA was ethanol-precipitated and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water and store at -70°C. RNA concentrations were estimated by UV absorption at 260 nm.

### **RNA gel mobility shift assays.**

The RsmA-RR*phbR* and RsmA-RR*phbB* gel mobility shift assays was carried out as previously described by Manzo (2011). Binding reactions contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 20 mM DTT, 7.5% (w/v) glycerol, 32.5 ng of yeast tRNA, 4 U of RiboLock RNase inhibitor (Fermentas), 5 nM of RNA (RR*phbR* or RR*phbB*), and RsmA at various concentrations. Reaction mixes (10  $\mu$ l) were incubated for 45 min at 30 °C. Competition assays were performed in the absence or presence of unlabelled RNA specific and non-specific competitor (RR*sodB*). The samples were visualized on native 7 % polyacrylamide gels and radioactive signals were visualized with a phosphorimager (Molecular Dynamics).

### **Quantification of the levels of *phbB* and *phbR* transcripts.**

qRT-PCR was performed as reported (Noguez et al., 2008). For RNA extraction, the cultures were grown in PY liquid medium and the cells were collected at the stationary phase of growth. The primers used for the qRT-PCR assays (Table 1) were as follows: phbBFw /phbBRev for *phbB*; phbRFw/phbRRev for *phbR*; Avin16SFw/Avin16SRev for *16S* rRNA; and gyrAFw/gyrARev for *gyrA*. *gyrA* was used as internal control to normalize this results and *16S* was used as internal control to normalize the results of stability assay (see below). All assays were performed in triplicate. The quantification technique used to analyze data was the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Shmittgen 2001). Reproducibility of the whole procedure was by two separate experiments.

**Stability of *phbR* and *phbB* transcripts.** For *phbR* and *phbB* mRNA stability studies, strains OP (wild-type) and SOP1 (*rsmA::Sm* mutant) were grown on PY liquid medium for 30 h. Cells were harvested at various times following the addition of rifampicin (200 µg/ml final concentration), and total RNA was purified. qRT-PCR was performed as described above for the levels of *phbB* and *phbR* transcripts. The percentage of RNA remaining through the time course was determined by calculating the difference in cycle threshold ( $C_T$ ) and the subsequent fold difference compared to the 0-min time point after controlling for 16S rRNA levels.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by PAPIIT through grant number IN222809

#### REFERENCES

1. **Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, F. O'Gara.** 2000 A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **14**: 3913-3919.
2. **Alexeyev, M. F., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan.** 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*. **160**: 63-67.
3. **Bali, A., G. Blanco, S. Hill, and C. Kennedy.** 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1711-1718.
4. **Baker, C.S., I. Morozov, K. Susuki, T. Romeo, and P. Babitzke.** 2002. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**: 1599-1610
5. **Baker, C.S., L. A. Eöry, H. Yakhnin, J. Mercante, T. Romeo, and P. Babitzke.** 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* *hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J. Bacteriol.* **189**: 5472-5481.
6. **Bishop, P. E., and W. J. Brill.** 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.* **130**: 954-956.
7. **Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan, and S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 370-379.
8. **Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno, and G. Espín.** 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poli-β-Hidroxybutirate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**: 2624-2628.
9. **Castañeda, M., J. Sánchez, S. Moreno, C. Núñez, and G. Espín.** 2001. The global regulators GacA and  $\sigma_s$  form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **183**: 6787-6793

10. **Cui, Y., A. Chatterjee, and A.K. Chatterjee.** 2001. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpin Ecc. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 516-526.
11. **Dubey, A. K., C.S. Baker, T. Romeo, and P. Babitzke.** 2005. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA.* **11**: 1579-1587.
12. **Dubey, A. K., C. S. Baker, K. Suzuki, A.D. Jones, P. Pandit, T. Romeo, and P. Babitzke.** 2003. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J. Bacteriol.* **185**: 4450–4460.
13. **Galindo E., C. Peña, C. Núñez, D. Segura, and G. Espín.** 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.***16**: 6:7.
14. **Heeb, S., C. Blumer, and D. Haas.** 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.***184**: 1046-1056.
15. **Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Cámara M, Williams P, Haas D.** 2004. Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* **186**:2936–2945.
16. **Jonas, K., A. N. Edwards, R. Simm, T. Romeo, U. Romling, and Melefors, O.** 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol. Microbiol.* **70**: 236-257.
17. **Kennedy, C., R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Brigle, and D. Dean.** 1986. The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 318–325.
18. **Lapouge, K. M. Schubert, F. H. Allain, and D. Haas.** 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol.* **67**: 241-253.
19. **Liu, M. Y., H. Yang, and T. Romeo.** 1995. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* **177**: 2663–2672.
20. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
21. **Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V., Bustillos, R., Velázquez, C., Góiz, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G. & Castañeda, M. (2011).** Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. Artículo aceptado en *J. Mol. Microbiol. Biotech.*
22. **Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008).** Enzyme I<sup>Ntr</sup>, Npr and IIA<sup>Ntr</sup> are involved in regulation of the poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**, 244-254.

23. **Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-Gonzalez, L. & Espín, G. (2002).** Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-b-hydroxybutyrate biosynthetic gene *phbB* is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* **184**, 5672-5677.
24. **Romeo, T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**: 1321-1330.
25. **Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003).** Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-b-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* **179**, 437-443.
26. **Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig A K, Melefors O, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T.** 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184**:5130-5140.
27. **Teplitski, M., R. I. Goodier and B. M. M. Ahmer.** 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **185**: 7257–7265.
28. **Wang, X., A. K. Dubey, K. Suzuki, C. S. Baker, P. Babitzke, and T. Romeo.** 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**: 1648–1663.
29. **Wilson, K.J., Sessitsch, A., Corbo, J.C., Giller, K.E., Akkermans, A.D., Jefferson, R.A.** 1995. beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiol.* 1995 141 (7):1691-705.

TABLE 1

Strain	Description	Source or reference
<b><i>A. vinelandii</i> strains</b>		
UW136	Wild-type Rifampicin resistance	Laboratory collection
rsmA-	UW136 with <i>rsmA::Sm</i> mutation	This study
rsmZ1-	UW136 with <i>rsmZ1::Km</i> mutation	This study
gacA-	UW136 with <i>gacA::Gm</i> mutation	
AHW13	UW136 with <i>phbR-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW14	rsmA- with <i>phbR-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW15	rsmZ1- with <i>phbR-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW16	gacA- with <i>phbR-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW17	UW136 with <i>phbR-gusA</i> translational fusion	This study
AHW18	rsmA- with <i>phbR-gusA</i> translational fusion	This study
AHW19	rsmZ1- with <i>phbR-gusA</i> translational fusion	This study
AHW20	gacA- with <i>phbR-gusA</i> translational fusion	This study
AHW21	UW136 with <i>phbB-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW22	rsmA- with <i>phbB-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW23	rsmZ1- with <i>phbB-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW24	gacA- with <i>phbB-gusA</i> transcriptional fusion	This study
AHW25	UW136 with <i>phbB-gusA</i> translational fusion	This study
AHW26	rsmA- with <i>phbB-gusA</i> translational fusion	This study
AHW27	rsmZ1- with <i>phbB-gusA</i> translational fusion	This study
AHW28	gacA- with <i>phbB-gusA</i> translational fusion	This study
SAWZ1	UW136 with <i>rsmZ1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWZ2	UW136 with <i>rsmZ2-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWZ3	UW136 with <i>rsmZ3-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWZ4	UW136 with <i>rsmZ4-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWZ5	UW136 with <i>rsmZ5-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWZ6	UW136 with <i>rsmZ6-gusA</i> transcriptional fusion	This study

SAWZ7	UW136 with <i>rsmZ7-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWY1	UW136 with <i>rsmY1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWY2	UW136 with <i>rsmY2-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ1	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ2	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ2-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ3	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ3-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ4	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ4-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ5	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ5-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ6	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ6-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGZ7	<i>gacA-</i> with <i>rsmZ7-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGY1	<i>gacA-</i> with <i>rsmY1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
SAWGY2	<i>gacA-</i> with <i>rsmY1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
OP	Wild-type susceptible to Rifampicin	Laboratory collection
SOP1	OP with <i>rsmA::Sm</i> mutation	This study
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
DH5a	<i>supE44 DlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) gal dcm</i>	Invitrogen

Table 1 continuation

Plasmid	Description	Source or reference
pMCY3	pBluescript II KS carrying a 2.0-kb fragment with <i>rsmA</i>	This study
pMCY4	pUC18 carrying a 2.0-kb fragment with <i>rsmA</i>	This study
pMCY5	pMCY4 with a 160 bp deletion of <i>rsmA</i>	This study
pMCY6	pMCY5 with an Sm cassette inserted instead of <i>rsmA</i>	This study
pCV3	pBluescript II KS+ derivative with a <i>rsmZ1::Km</i> mutation	Manzo et al., 2011

pTZ19R	plasmid with T7 promoter	Fermentas
pAHTRANSR	pTZ19R with RR <i>phbR</i> region	This study
PAHTRANSB	pTZ19R with RR <i>phbB</i> region	This study
pLM1	pTZ19R with RR <i>sodB</i> region	This study
pSAFA3	Plasmid with <i>gacA::Gm</i> mutation	Castañeda et al., 2001
pBSL130	Plasmid with Sm cassette	Alexeyev et al., 1995
pUC18	Cloning vector	Invitrogen
pBluescript II KS	Cloning vector	Stratagene
pAHFUTd	Plasmid for <i>gusA</i> translation fusion	This study
pBSL190	Plasmid with Tc cassette	Alexeyev et al., 1995
pCAM140	Plasmid with <i>gusA</i> gene	Wilson et al., 1995
pCN44	pBluescrip II without polylinker	This study
pCNT54	pBluescrip II carrying a <i>gusA</i> within transposase <i>Avin12230</i>	This study
pAHFUTd-Tc	pAHFUTd with Tc cassette	This study
pAHFUTs-Tc	pCNT54 with Tc cassette	This study
pAHFUTs-R	pAHFUTs-Tc with <i>phbR-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pAHFUTs-B	pAHFUTs-Tc with <i>phbB-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pAHFUTd-R	pAHFUTd-Tc with <i>phbR-gusA</i> translational fusion	This study
pAHFUTd-B	pAHFUTd-Tc with <i>phbB-gusA</i> translational fusion	This study
pSAHFUTs-Z1	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Z2	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ2-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Z3	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ3-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Z4	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ4-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Z5	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ5-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Z6	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ6-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Z7	pAHFUTs-Tc with <i>rsmZ7-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Y1	pAHFUTs-Tc with <i>rsmY1-gusA</i> transcriptional fusion	This study
pSAHFUTs-Y2	pAHFUTs-Tc with <i>rsmY2-gusA</i> transcriptional fusion	This study

Table 1 continuation...

<b>Oligonucleotide</b>	<b>Description</b>	<b>Source or reference</b>
RSMA2D	GGCCGGGCACCCTCATTACCA	This study
RSMA2R	AACTCGCCGCTTCGCCCATCTATC	This study
RSMAdelD	TAGGGAAGTCGACAGGACAACAC	This study
RSMAdelR	ACCAAAGAGGTTCGACGTGCAC	This study
UptransphbR	GTAAGTGCAGCTGTGTTTTGATATC	This study
lowtransphbR	CTAGGTACCCGAAAGATTCTTGAC	This study
UptransphbB	GTAAGTGCAGTCCTTAAAGCGTGAC	This study
lowtransphbB	CTAGGATCCCGTGTTCGCAGACTT	This study
sodBupexp	GCAAGCTTTGACCTACGGCGCCTCG	This study
sodBlwexp	CAGAATCCCATGATTCAACTCTCCATTTTCATCAGG	This study
gyrAFw	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	Noguez et al., 2008
gyrARev	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	Noguez et al., 2008
phbRFw	CCACATGCGTTTGGTTTCTTG	Noguez et al., 2008
phbRRev	TCTGCCCTAAGCGTCTCCTC	Noguez et al., 2008
phbBFw	TCCGCAATCCAAACGCAAAG	Noguez et al., 2008
phbBRev	GTGCTCTCCCAATCGGTTAC	Noguez et al., 2008
Avin16SFw	ACCGCATCCAAAATACTGG	This study
Avin16SRev	GCCACTGGTGTTCCTTCTTA	This study
Gus12230-1	GAGCTCGCCGTAGTGGATCAGC	This study
Gus12230-2	GCAGAACCGAAACGTACTGGTC	This study
Gus12230-3	GACCAGTACGTTTCGGTCTGCATCTAGAGCGGCCGC	This study

	GCGAATTCCG	
Gus12230-4	CCCTTGAAAGACTCCAGGAAGAAAGCTTGTAGCCGA CGAT GGTGCG	This study
Gus12230-5	CTTCCTGGAGTCTTTCAAGGG	This study
Gus12230-6	GAGCTCCCTCAAGCAAATCAATG	
gusAfusionFw	GATATCGAAACCCCAACCCGTGAA	This study
gusAfusionRev	CAGCTGCAGTACAGGACGTAACATAGG	This study
TransFusBFw	ATCGAATTCCCATCACCGCCATATCA	This study
TransFusBRev	ATCGAATTCTAGCTGCGCAGCGTCGTT	This study
TradFusBRev	ATCCTGCAGTTGATGGCTCATAGATT	This study
TransFusRFw	ATCGAATTCTGATGGATGGAGAATGCC	This study
TransFusRRev	ATCGAATCCCGCATGTGGAAAAACCAA	This study
TradFusRRev	ATCCTGCAGGACTGTAAACATATTCCTTT	This study
Z1Fw	ATCGAATTCATCATCGAGACCGAC	This study
Z1Rev	ATCGAATTCTCGACGTGTAAGTG	This study
Z2Fw	ATCGAATTCTGCATGTCGATAGAC	This study
Z2Rev	ATCGAATTCGACACGGACGCGATA	This study
Z3Fw	ATCTCTAGAACGGGAGGCGAAAAC	This study
Z3Rev	ATCTCTAGATCGGTGTGGAAATGAATC	This study
Z4Fw	ATCGAATTCAAACCCGGATTTCCAAT	This study
Z4Rev	ATCGAATTCGTCGATCCTTCGACGCCT	This study
Z5Fw	ATCGAATTCGGCCGCAGCCTCT	This study
Z5Rev	ATCGAATTCTCTCGGTGGAAGCAAA	This study
Z6Fw	ATCGAATTCAGCGTCGGTGCT	This study
Z6Rev	ATCGAATTCGTGGTATTCAATCTACCC	This study
Z7Fw	ATCGAATTCAGCCTGCTCCGG	This study
Z7Rev	ATCGAATTCTCTGGTGGAGTTCAATG	This study
Y1Fw	ATCGAATTCGCGCTTGTGCTCC	This study
Y1Rev	ATCGAATTCTTGAGCAATAGACTAGGC	This study
Y2Fw	ATCTCTAGAGAGGCGAAGCATCCT	This study

---

Y1Rev	ATCTCTAGACCTGAACAATGCCAT	This study
-------	--------------------------	------------

---

TABLE 2. PHB production in *A. vinelandii* strains<sup>a</sup>

---

Strain	PHB Production ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ of protein)
UW136	$236.19 \pm 12.33$
UW <i>rsmZ1</i>	$103.13 \pm 6.81$
UW <i>rmA</i>	$283.83 \pm 15.75$
UW <i>gacA</i>	$\leq 0.01$

---

PHB production was determined as previously described ( ), all determinations were done in triplicate, in cells grown for 48 h in PY liquid medium. Values are means standard errors of the means.

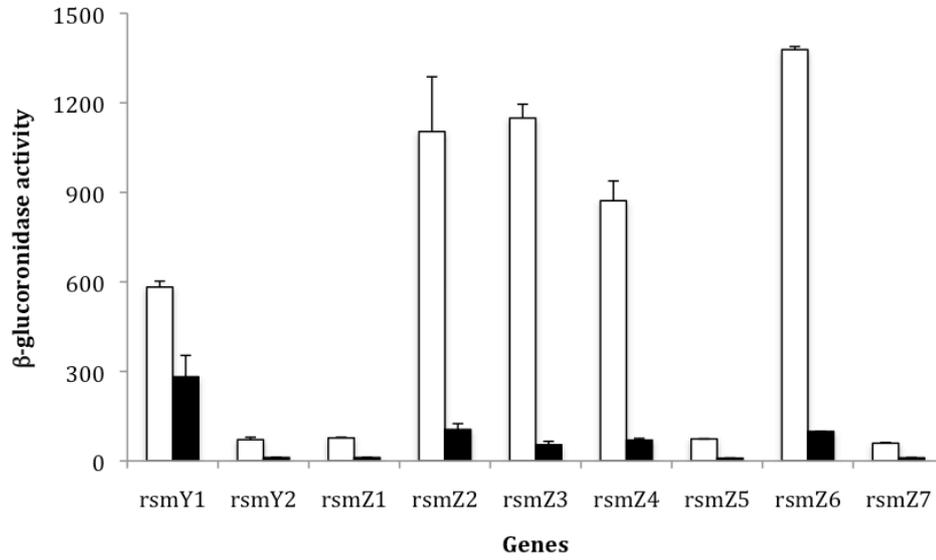


Fig. 1. Gac activates the expression of Rsm regulatory RNAs.  $\beta$ -glucuronidase activity of a *rsm-gusA* gene fusion in the wild type UW136 (white bars) and of the isogenic *gacA* (black bars).

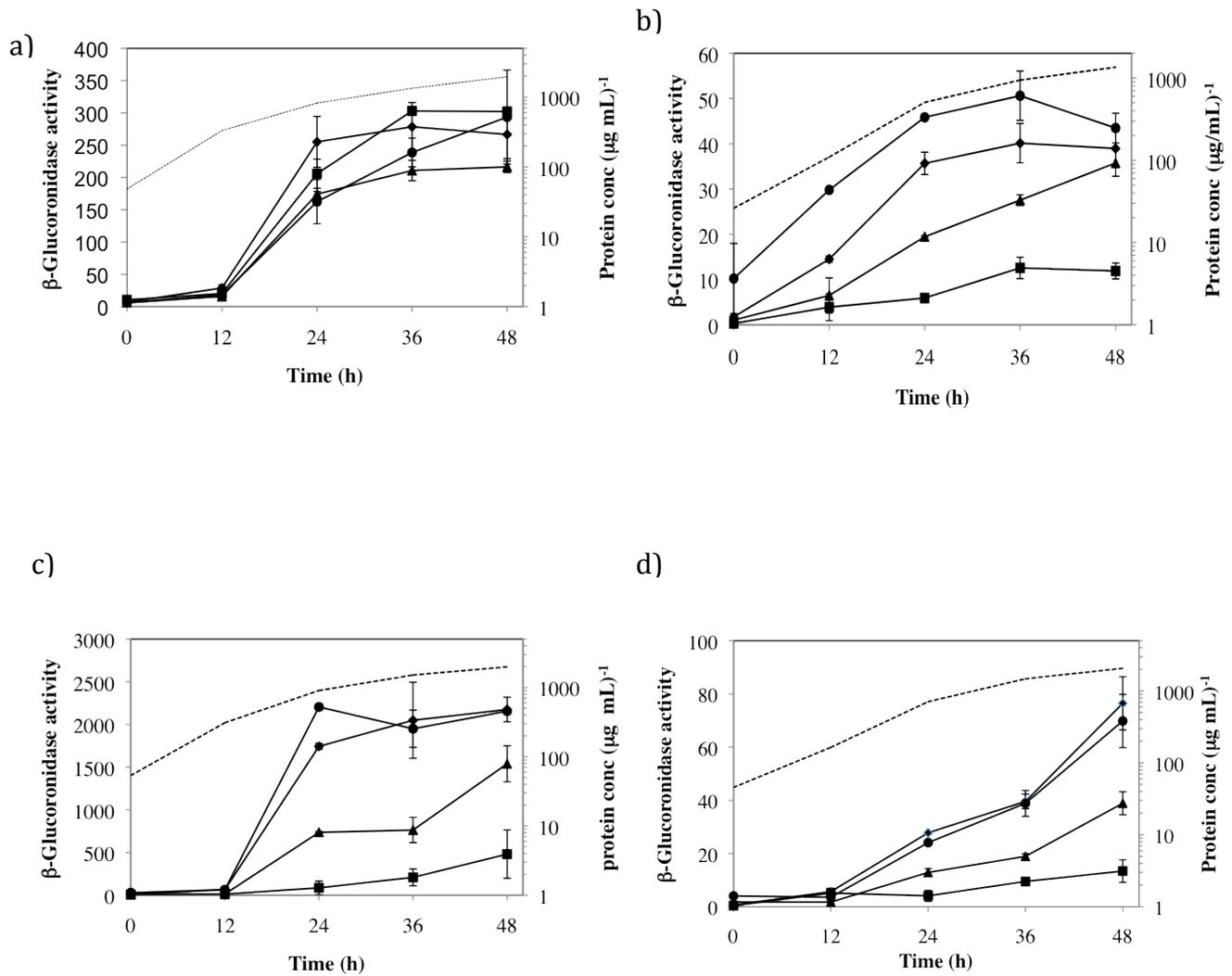
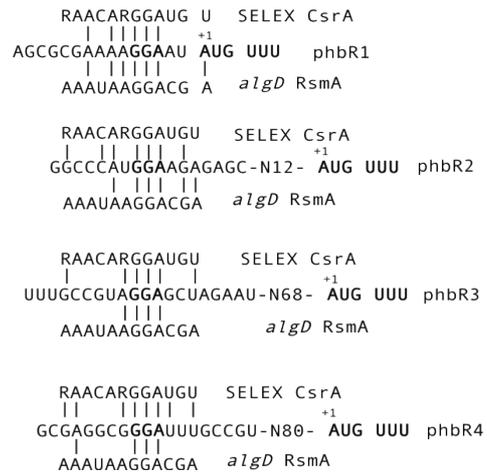


FIG. 2. GacA controls post-transcriptional to  $\textit{phbR}$  and  $\textit{phbR}$ . In all graphs: wild type UW136 (rhombus), and of the isogenic  $\textit{rsmA}$  (circles),  $\textit{rsmZI}$ (triangles) and  $\textit{gacA}$  (squares) strains. The dashed line in all graphs represents the cell growth. A)  $\beta$ -glucuronidase activity of a  $\textit{phbR-gusA}$  gene transcriptional fusion. B)  $\beta$ -glucuronidase activity of a  $\textit{phbR-gusA}$  gene translational fusion. C)  $\beta$ -glucuronidase activity of a  $\textit{phbB-gusA}$  gene transcriptional fusion. D)  $\beta$ -glucuronidase activity of a  $\textit{phbB-gusA}$  gene translational fusion.

a)



b)

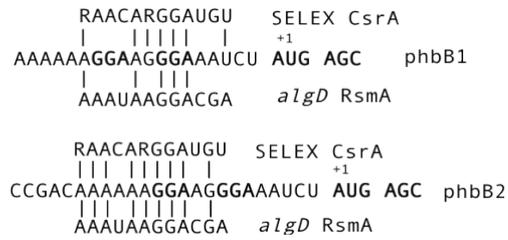


FIG. 3. Putative RsmA binding sites in *phbR* (a) and *phbB* (b) regulatory regions. The SELEX-derived CsrA binding site consensus sequence is shown.

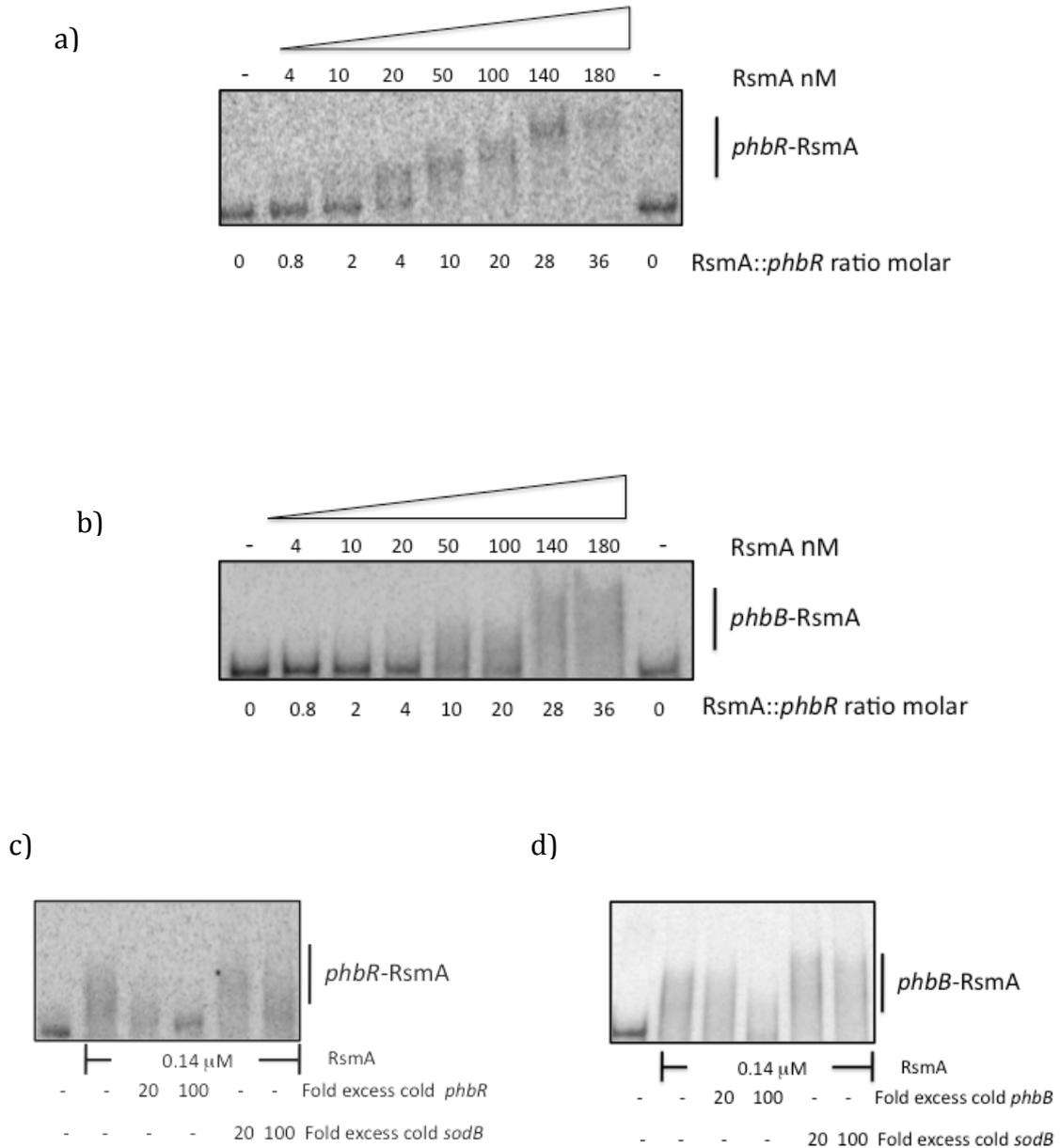


FIG. 4. RNA gel mobility analysis for binding of RsmA to *phbR* (a) and *phbB* (b) RNA. Labelled *phbR* and *phbB* RNA (5 nM) was incubated with the concentrations of RsmA indicated. Reactions were performed in the absence (A and B) or presence (C and D) of specific (*phbR* and *phbB*) or nonspecific (*sodB*) unlabeled competitor RNA at the relative concentrations with respect to labeled RNA that are shown.

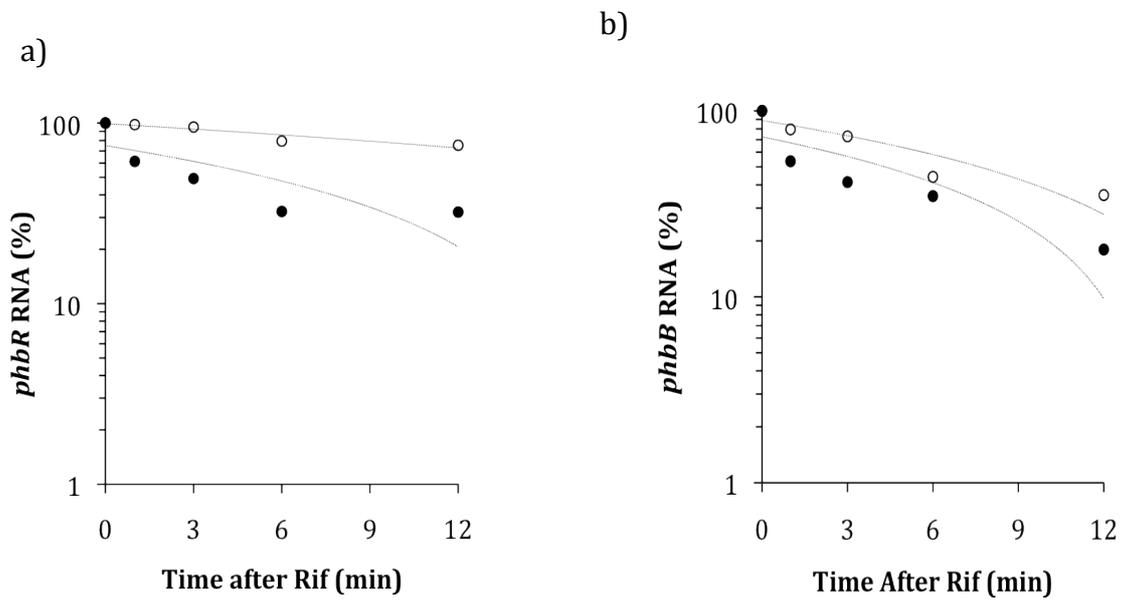


Fig. 5. Stability of *phbR* (A) and *phbB* (B) mRNAs in wild type UW136 and *rsmA* mutant. UW136 (black circles) and *rsmA* (empty circles), the line represent a tendency of the points.

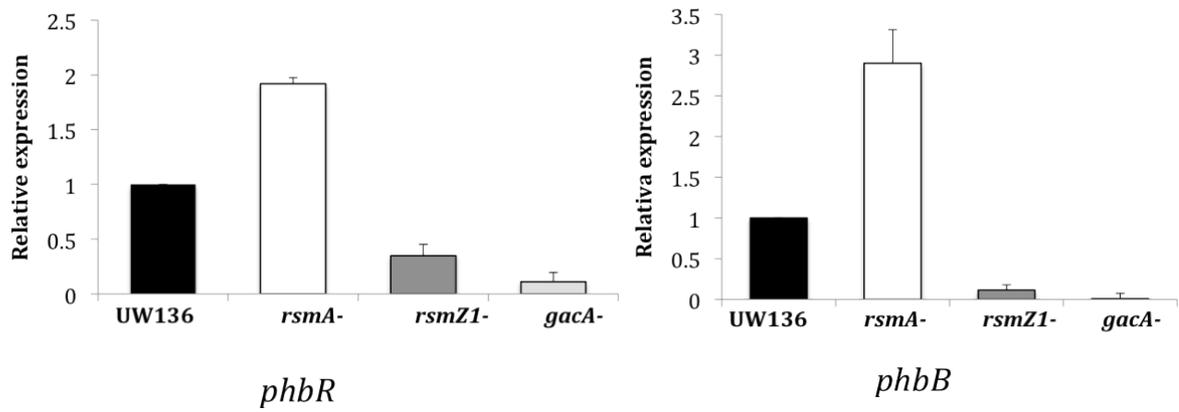


Fig. 6. qRT-PCR analysis of *phbR* (a) and *phbB* (b) transcripts using RNA isolated from cultures of *A. vinelandii*. UW136, *gacA*, *rsmA* and *rsmB* strains. The *A. vinelandii* strains were grown in PYmedium.