



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Estudio de la regulación de la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada sobre la expresión de los genes *phbB* y *phbR* en *Azotobacter vinelandii*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. Ramses Gallegos Monterrosa

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Instituto de Biotecnología - UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

D.C. Miguel Castañeda Lucio
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas – BUAP

D.C. Victor Humberto Bustamante
Instituto de Biotecnología - UNAM

Cuernavaca, Morelos

Enero 2013



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 de la Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la dirección de la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo y la asesoría del Dr. Miguel Castañeda Lucio y el Dr. Víctor Humberto Bustamante.

Se conto con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de su Programa de Becas para Estudios de Posgrado.

Agradecimientos.

INDICE

RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	7
1.2 Composición, aplicaciones y función biológica del PHB.	8
1.3 Biosíntesis y genética del PHB en <i>A. vinelandii</i> .	10
1.4 El sistema de doble componente GacS/GacA.	11
1.5 El sistema de regulación post-transcripcional CrsA/B (RsmA/Z/Y).	12
1.6 El sistema de regulación global GacS/A y el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/Z/Y en <i>A. vinelandii</i> .	14
1.7 El sistema de fosfotransferencia PTS ^{Ntr} .	15
II. ANTECEDENTES	17
III. HIPOTESIS	21
IV. JUSTIFICACION	21
V. OBJETIVOS	22
VI. MATERIAL Y METODOS	23
Tabla 1: Cepas usadas en este trabajo.	23
Tabla 2: Plásmidos utilizados en este trabajo.	24
Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	24
6.1 Medios de cultivo.	25
6.2 Antibióticos.	26
6.3 Condiciones de cultivo.	27
6.4 Extracción de DNA cromosomal de <i>A. vinelandii</i> .	27
6.5 Extracción de RNA total de <i>A. vinelandii</i> .	28
6.6 Extracción de plásmido de <i>E. coli</i> mediante perclorato.	29
6.7 PCR.	30
6.8 Purificación de banda de DNA mediante Glassmilk.	30
6.9 Ligación de DNA.	31
6.10 Precipitación de DNA con glucógeno.	31
6.11 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .	32

6.12 Electroporación de <i>E. coli</i> .	32
6.13 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .	33
6.14 Transformación de <i>A. vinelandii</i> con DNA plasmídico o cromosomal.	33
6.15 Transformación de <i>A. vinelandii</i> con lisado celular.	34
6.16 Cuantificación de proteína por el método de Lowry.	34
6.17 Cuantificación de actividad de β -glucuronidasa.	35
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	37
7.1 Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de <i>phbB</i> y <i>phbR</i> .	37
7.2 Transformación de las fusiones génicas en la cepa DS988 (UW <i>ptsP</i>).	40
7.3 Transformación de las fusiones génicas en la cepa RN4 (UW <i>ptsN</i>).	42
7.4 Cuantificación de la actividad de β -glucuronidasa en las cepas portadoras de las fusiones transcripcionales y traduccionales de <i>phbB</i> y <i>phbR</i> .	43
7.5 Construcción de una fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> .	46
7.6 Transformación de la fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> en las cepas UW y UW <i>ptsP</i> .	49
7.7 Cuantificación de la actividad de β -glucuronidasa en las cepas portadoras de la fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> .	50
7.8 Medición de la transcripción de la fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> en las cepas UW y UW <i>ptsP</i> .	52
7.9 Modelo de Regulación.	53
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. PERSPECTIVAS	58
X. BIBLIOGRAFIA	59

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una gamma-Proteobacteria de vida libre perteneciente a la familia *Pseudomonaceae*; su metabolismo se basa en el consumo de azúcares y sales orgánicas y presenta diversas características metabólicas que la hacen un interesante objeto de estudio; por ejemplo, su capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de aerobiosis, o bien su producción de polímeros de importancia industrial y biotecnológicamente atractivos como el alginato y el poli- β -hidroxibutirato (PHB).

El PHB es un poliéster con importantes aplicaciones biotecnológicas y ecológicas debido a su origen bacteriano y completa biodegradabilidad; su producción en *A. vinelandii* se encuentra finamente regulada por los factores transcripcionales σ^S y PhbR, los cuales controlan la transcripción del operón biosintético *phbBAC*, así como por el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/Z/Y.

También se reportó la participación del sistema de fosfotransferencia PTS^{Ntr} en la regulación de la expresión de *phbR* y *phbB* en *A. vinelandii* (Noguez et al., 2008), sin embargo aun se desconocía a qué nivel se lleva a cabo esta regulación.

En este trabajo se usaron fusiones génicas transcripcionales y traduccionales de *phbR* y *phbB* con el gen reportero *gusA* en cepas de *A. vinelandii* con mutaciones en los genes que codifican para las enzimas del sistema PTS^{Ntr}, con esta estrategia se demostró que existe una regulación a nivel transcripcional sobre *phbR* por la enzima IIA^{Ntr} no fosforilada del sistema PTS^{Ntr}. Se construyó una fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* cuya transcripción depende del promotor del gen *gyrA* de *A. vinelandii*; con esta fusión y ensayos de RT-qPCR se comprobó que existe una regulación a nivel post-transcripcional sobre *phbR* que también está controlada por la enzima IIA^{Ntr} del sistema PTS^{Ntr}.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una gamma-Proteobacteria, Gram-negativa, aerobia, pleomórfica y con un tamaño de 2 a 5 nm de diámetro (5 a 10 veces el volumen de *Escherichia coli*). Es un microorganismo de vida libre quimiorganotrófico; su metabolismo se basa en el consumo de azúcares, alcoholes y sales orgánicas, presenta movilidad gracias a flagelos peritricos (Espín, 2003; Nagpal *et al.*, 1989) (Fig. 1).

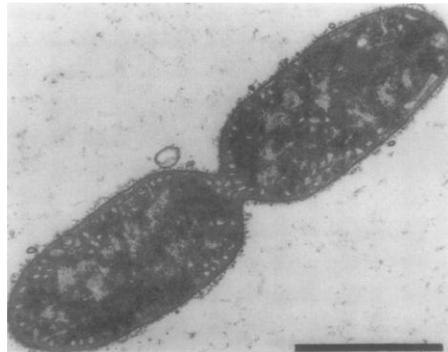


Fig. 1: Célula vegetativa de *A. vinelandii*.

A. vinelandii presenta algunas características que la hacen un interesante objeto de investigación; por ejemplo, bajo condiciones ambientales adversas sufre un proceso de diferenciación para formar estructuras resistentes a la desecación, desintegración mecánica y radiación ultravioleta, a los que se les conoce como quistes (Fig. 2) (Segura *et al.*, 2009), y que le permiten volver a su ciclo de vida vegetativo en cuanto las condiciones ambientales mejoran (Sadoff, 1975; Espín, 2003), además tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno gracias a sus tres diferentes complejos de nitrogenasa y a varios mecanismos de protección de los mismos frente a la inactivación por el oxígeno (Espín, 2003).

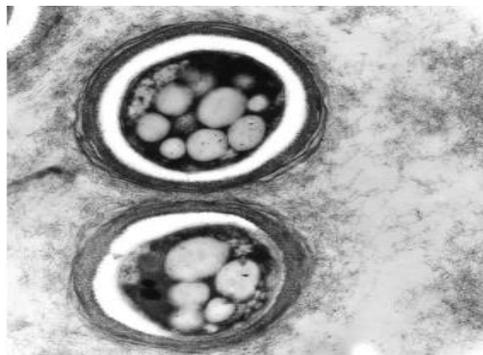


Fig. 2: Quiste de *A. vinelandii*.

Otra interesante propiedad de *A. vinelandii* es su capacidad de producir polí-β-hidroxitirato (PHB), el cual es un polímero utilizado por la bacteria como fuente de carbono en periodos de estrés como disminución de nutrientes en el medio, desecación y temperaturas adversas (Espín, 2003, Anderson y Dawes, 1990). Por otro lado, en ausencia de sustratos oxidables en el medio ambiente, el PHB puede actuar como sustrato, de esta manera al oxidarse disminuye la concentración citoplasmática de oxígeno en *A. vinelandii* protegiendo así al complejo de la nitrogenasa de la bacteria (Anderson y Dawes, 1990).

Las propiedades físicas del PHB son similares a las de los plásticos convencionales como el polipropileno, sin embargo el PHB puede ser degradado en el medio ambiente por microorganismos (que contienen enzimas PHB hidrolasas y depolimerasas) en un período de tiempo que varía de pocos meses a años (Verlinden *et al.*, 2007).

1.2 Composición, aplicaciones y función biológica del PHB.

El PHB es un homopolímero constituido por monómeros de β-hidroxitirato, perteneciente a la familia de los polihidroxicanoatos; su fórmula condensada es $(C_4H_6O_2)_n$, donde “n” puede variar de 5000 hasta 15000 unidades (Fig. 3).

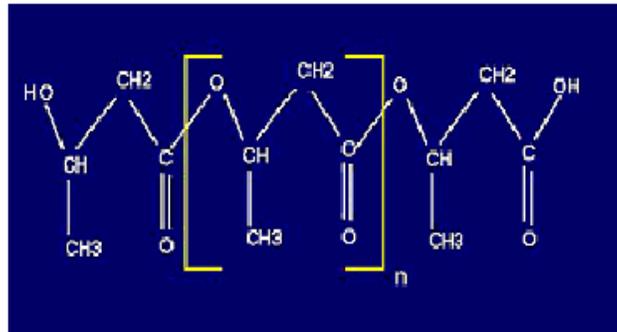


Fig. 3: Estructura química del PHB.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros miembros de la familia de los poliésteres descubiertos en 1925, son sintetizados por diversos microorganismos como parte de su metabolismo normal y son totalmente biodegradables, además pueden ser moldeados, fundidos y conformados como los plásticos derivados del petróleo, y tienen la misma flexibilidad (Madison y Huisman, 1999).

El PHB resulta ser un termoplástico con características muy similares a las del polipropileno: es un polímero frágil con un alto punto de fusión, que a pesar de tener una menor resistencia a la disolución, tiene un comportamiento óptimo ante la luz ultravioleta, resistiendo tiempos prolongados de exposición sin decolorarse (Madison y Huisman, 1999).

Actualmente, el PHB es poco explotado comercialmente ya que tiene rendimientos bajos y altos costos de producción (Madison y Huisman, 1999); el estudio de su metabolismo y mecanismos de producción tendría un impacto no solo en lo económico sino también en el aspecto ecológico.

A nivel industrial, el PHB ha sido empleado en la producción de plásticos biodegradables para envolturas de alimentos, envases para cosméticos, etc. También se ha descrito la aplicabilidad de gránulos de PHB en la purificación de proteínas recombinantes (basado en la interacción de proteínas de la membrana de los gránulos con la proteína de interés) y en la producción de dispositivos médicos como válvulas cardíacas, tornillos para fijación interna, transportadores internos de medicamentos, etc. (Grage *et al.*, 2009; Zin y Egli, 2001) (Fig. 4).



Fig. 4: Diversos productos hechos con PHB.

En *A. vinelandii* la acumulación de PHB se correlaciona con la frecuencia de formación de quistes, aunque no es esencial para el proceso de diferenciación, ya que mutantes no productoras del poliéster en condiciones de laboratorio, enquistan de igual forma que la cepa silvestre (Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, en *A. vinelandii* el PHB podría tener funciones como material de reserva de carbono y energía en periodos de limitación de nutrimentos en el medio, pues el PHB almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula. Existen reportes de bacterias en las que se ha demostrado que el PHB acumulado puede retardar la degradación de algunos componentes celulares y así aumentar la sobrevivencia del microorganismo bajo condiciones adversas (Dawes, 1990).

Otra función que se le ha atribuido al PHB, está relacionada al fenómeno de la fijación del nitrógeno, que tiene que ver con la llamada protección de la nitrogenasa que presenta *A. vinelandii*. Esta bacteria tiene la peculiaridad de llevar a cabo la fijación de nitrógeno, que es un proceso sensible al oxígeno, bajo condiciones de crecimiento aerobio; esto lo logra mediante un mecanismo de protección respiratoria en la que el microorganismo utiliza una velocidad de respiración extremadamente alta para mantener una concentración intracelular

de oxígeno baja, proceso que se lleva a cabo a expensas de un alto consumo de carbono y energía, que en ciertas condiciones pudiera provenir de la degradación del PHB (Dawes, 1990).

1.3 Biosíntesis y genética del PHB en *A. vinelandii*.

La biosíntesis del PHB en *A. vinelandii* se lleva a cabo durante la fase estacionaria; en este proceso están involucradas tres reacciones enzimáticas: la primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa para dar acetoacetil-CoA, este es reducido por la acetoacetil-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D-(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que finalmente se polimeriza por la actividad de la enzima PHB sintasa (Manchak y Page, 1994).

La actividad de la enzima β -cetotiolasa es inhibida por coenzima A (CoA); bajo condiciones limitantes de oxígeno y exceso de fuente de carbono se acumula poder reductor, el cual inhibe a la citrato sintasa disminuyendo la entrada de acetil-CoA al ciclo de Krebs; la alta proporción acetil-Coa/CoA libera la inhibición de la β -cetotiolasa permitiendo la entrada de acetil-CoA hacia la síntesis de PHB (Segura y Espín, 2004; Senior y Dawes, 1973) (Fig. 5).

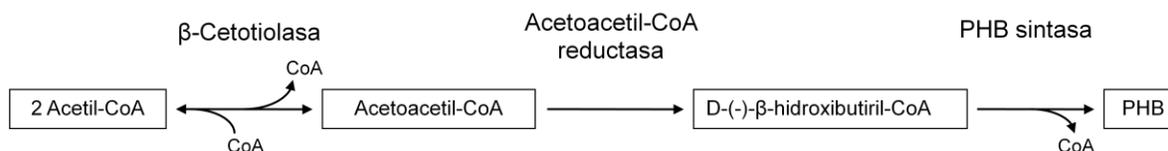


Fig. 5: Ruta biosintética del PHB.

En *A. vinelandii* los genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, que codifican respectivamente para la β -cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHB sintasa, se encuentran agrupados formando el operón *phbBAC* (Segura *et al.*, 2003; Peralta-Gil *et al.*, 2002). En la misma región del cromosoma donde se encuentra el operón *phbBAC* se localizan otros genes involucrados en la síntesis de PHB: *phbR*, que codifica para un miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC; *phbP*, que codifica para una proteína putativa asociada a gránulos y *phbF*, un regulador putativo de *phbP* (Galindo *et al.*, 2007).

La transcripción del operón *phbBAC* es iniciada desde dos promotores sobrepuestos: pB1 y pB2. PhbR, codificada por *phbR*, activa la transcripción del operón desde el promotor pB1, mientras que la transcripción desde pB2 es dependiente del factor sigma RpoS, el cual se expresa durante la fase de crecimiento estacionario. La transcripción de *phbR* está controlada por dos promotores: pR1 y pR2; la transcripción desde pR2 también esta

inducida por el factor sigma RpoS aunque parece ser que esta se lleva a cabo de manera indirecta, mientras que la de pR1 es dependiente de la propia proteína PhbR aunque no se sabe si de manera directa o indirecta (Galindo *et al.*, 2007; Hernandez-Eligio *et al.*, 2011) (Fig. 6).

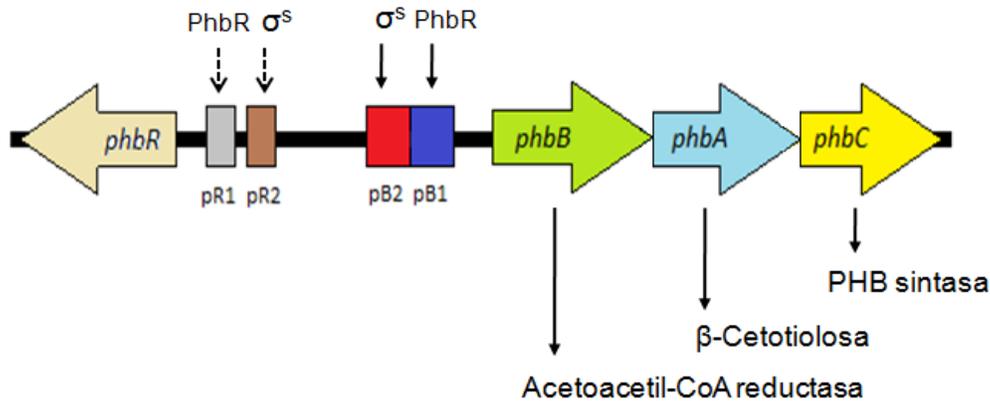


Fig. 6: Operón *phbBAC* y gen *phbR*.

La acumulación de PHB en *A. vinelandii* es un proceso finamente controlado por diversos mecanismos de regulación global; además de los reguladores RpoS y PhbR, la expresión de los genes biosintéticos está regulada por el sistema de doble componente y regulación post-transcripcional GacS/A – RsmA/Z/Y, así como por el sistema de fosfotransferencia conocido como PTS^{Ntr} (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012).

1.4 El sistema de doble componente GacS/GacA.

La cinasa histidinica GacS y el regulador de respuesta GacA son proteínas de un sistema de dos componentes presente en una amplia variedad de bacterias Gram-negativas. Este sistema de transducción de señales es un regulador global que controla diversos fenotipos, como la producción de metabolitos secundarios, enzimas extracelulares, mecanismos de patogenicidad, tolerancia al estrés, formación de biopelículas, movilidad, entre otros (Heeb y Haas, 2001).

GacS se ha descrito como una cinasa histidinica híbrida, con un dominio de entrada en el extremo N-terminal, que contiene dos motivos transmembranales separados por un asa periplásmica, un dominio transmisor o H2, un dominio receptor o D1 y un dominio de fosfotransferencia o HPt. GacA, por su parte, tiene dos dominios: un dominio receptor D2 y un dominio de salida que contiene un motivo de unión a DNA de tipo hélice-vuelta-hélice (Heeb y Haas, 2001).

La figura 7 representa el mecanismo de fosforilación del sistema ortólogo GacS/GacA de *E. coli* conocido como BarA/UvrY. Cuando GacS se autofosforila, el dominio HPt transfiere el grupo fosfato a un residuo de Asp en GacA, el cual efectúa la respuesta.

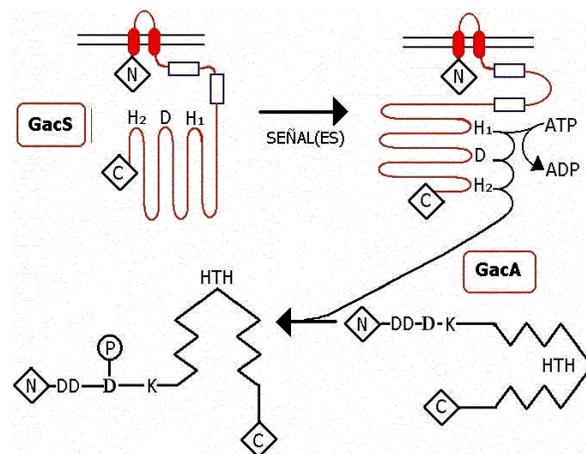


Fig. 7: Mecanismo de fosforilación del sistema GacS/A.

En algunas bacterias el sistema GacS/A controla a su vez a otros sistemas de regulación global como el sistema de regulación post-transcripcional Csr (Rsm), el factor sigma alternativo σ^S ó σ^{32} , y sistemas de *quórum sensing* (Lapouge *et al.*, 2008).

1.5 El sistema de regulación post-transcripcional CsrA/B (RsmA/Z/Y).

Otro nivel de control metabólico que poseen las bacterias es el post-transcripcional. En *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, el sistema Rsm (represor of stationary phase metabolism) es considerado como un regulador global de metabolismo secundario (Sonnleitner y Haas, 2011).

Este sistema de regulación post-transcripcional actúa de la manera siguiente: el elemento proteico CsrA (RsmA) se une a una región cercana al sitio de unión a ribosoma (RBS) de los RNA mensajeros que son sus blancos de regulación, impidiendo así su traducción y promoviendo su degradación. El segundo componente CsrB (RsmZ/Y) es un pequeño RNA regulador no codificante (sRNA) que antagoniza los efectos de CsrA (RsmA).

La molécula de sRNA presenta una estructura secundaria característica formando varias estructuras de tallo y asa, encontrándose en las asas secuencias similares a las que se une CsrA (RsmA) en los mRNA regulados por el sistema. En presencia de CsrB (RsmZ/Y) las

moléculas de CsrA (RsmA) se unen a las asas del sRNA dejando libre al mRNA y permitiendo así su traducción (Romeo, 1998) (Fig. 8).

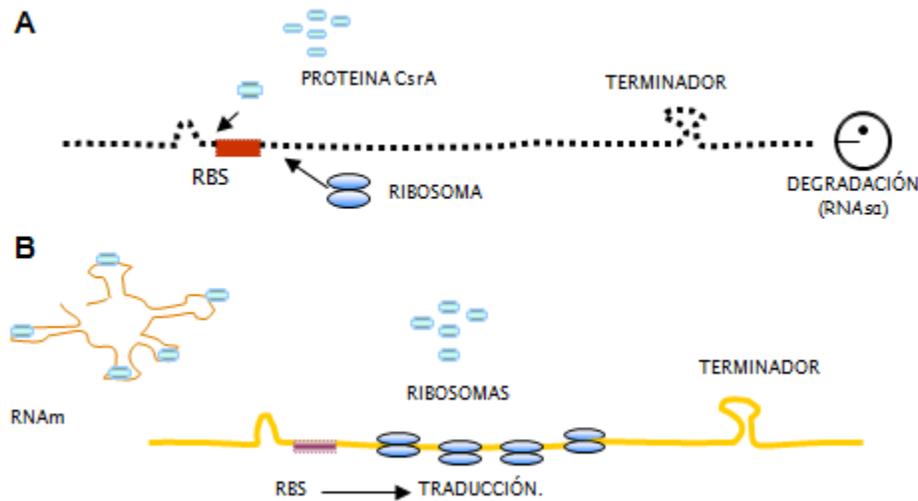


Fig. 8: Modelo de regulación del Sistema RsmA/Z/Y. **A)** Reconocimiento del elemento RsmA sobre su mRNA blanco; **B)** actividad antagonista del elemento RsmZ/Y sobre la proteína RsmA, permitiendo la traducción del mRNA blanco.

El sistema CsrA/B ha proporcionado un modelo para la elucidación de varios sistemas homólogos en otras bacterias Gram-negativas, referidos como RsmA/RsmB (regulator of secondary metabolism) en *Erwinia* o RsmA/RsmZ/Y en *Pseudomonas*.

En *E. coli*, el sistema llamado CsrA/B (carbon storage regulator) controla el metabolismo de carbono, regulando específicamente algunas enzimas involucradas en la glucólisis, biosíntesis y degradación de glucógeno, gluconeogénesis y ciclo del glioxilato (Romeo, 1998).

E. carotovora subsp. *carotovora* produce diversas proteínas extracelulares que aunque son secretadas por diversas vías, son correguladas por señales de *quorum sensing*, por el sistema GacS/A, así como por RsmA-RsmB estableciendo entre ellos una red de regulación (Romeo, 1998).

En *P. aeruginosa*, RsmA funciona directamente como un regulador de metabolitos secundarios donde modula indirectamente al sistema de *quorum sensing* (Pessi *et al.*, 2001).

Otros ortólogos del sistema CsrA/CsrB se han descrito en *P. fluorescens*, donde de igual forma controlan la producción de metabolitos secundarios (Aarons *et al.*, 2000).

En *E. coli*, *E. carotovora*, *P. fluorescens* y *A. vinelandii* GacS/A y CsrA (RsmA)/CsrB (RsmB o RsmZ), forman parte de una cascada de regulación donde los reguladores de respuesta del sistema GacS/A controlan la transcripción del gen que codifica para el sRNA regulador del sistema Csr o Rsm.

1.6 El sistema de regulación global GacS/A y el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/Z/Y en *A. vinelandii*.

En *A. vinelandii* existe un sistema homólogo al Rsm de *Pseudomonas* que cuenta con un gen que codifica para una proteína RsmA y 8 pequeños RNAs reguladores, siete del tipo RsmZ y 1 del tipo RsmY; por otro lado se ha demostrado que el sistema GacS/A es un regulador positivo de la transcripción de los genes *rsmZ1* - *rsmZ7* y *rsmY*, ya que presentan posibles sitios de unión a GacA en sus regiones reguladoras y su transcripción se ve afectada en una mutante *gacA* (Castañeda *et al.*, 2000; Manzo *et al.*, 2011; Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). Esto sugiere una fina red de regulación desde el sistema de doble componente hasta el nivel post-transcripcional.

En *A. vinelandii* los transcritos de *phbR* y *phbB* son blancos de regulación negativa de RsmA (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012), integrándose así la regulación de GacS/A y la de RsmA/Z/Y en la producción de este polímero (Fig. 9).

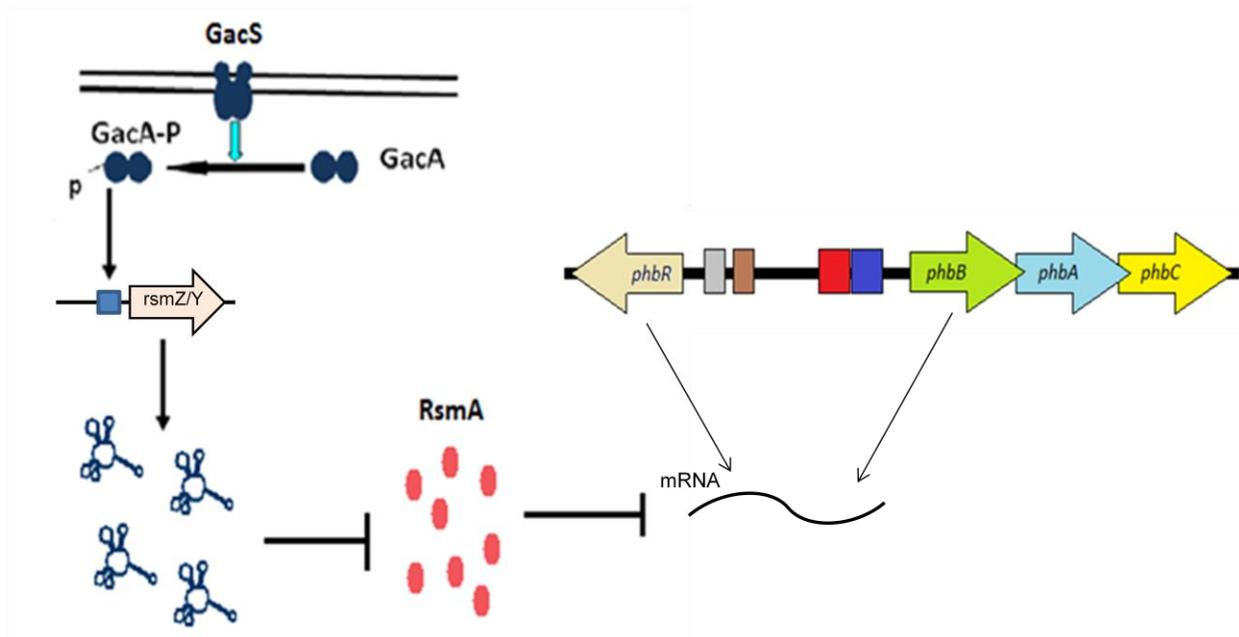


Fig. 9: Participación del sistema de doble componente GacS/A y el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/Z/Y en la regulación del PHB

1.7 El sistema de fosfotransferencia PTS^{Ntr}.

Recientemente se ha descrito en diversas bacterias la presencia de un sistema de fosfotransferencia homólogo a los conocidos sistemas PTS de carbono, los cuales les permiten a las bacterias regular la asimilación y fosforilación concomitante de azúcares preferidos; el nuevo sistema de fosfotransferencia ha sido relacionado con el metabolismo de nitrógeno por lo que ha recibido el nombre PTS^{Ntr}, y está constituido por las enzimas I^{Ntr}, NPr y IIA^{Ntr}, estas proteínas son homologas a las enzimas I, HPr y IIA de los sistema de fosfotransferencia de azúcares (Barabote y Saier, 2005).

En *E. coli* las enzimas I^{Ntr}, NPr y IIA^{Ntr} forman la siguiente cascada de fosforilación: Fosfoenolpiruvato (PEP) → EI^{Ntr} → NPr → IIA^{Ntr}, donde IIA^{Ntr} parece ser el receptor final de la fosforilación en la cascada (Rabus *et al.*, 1999) (Fig. 10).

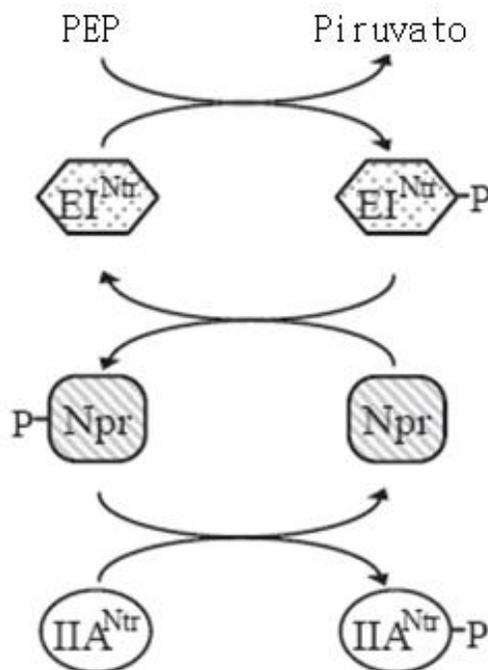


Fig. 10: Modelo de la cascada de fosforilación en el sistema PTS^{Ntr}.

Aun se sabe poco sobre la función de las enzimas del sistema PTS^{Ntr}; a diferencia de los sistemas PTS de carbono, el sistema PTS^{Ntr} no ha sido relacionado con el transporte o fosforilación directa de ningún sustrato, sino que parece tener múltiples papeles regulatorios en diversas bacterias.

En *E. coli* una mutante nula en *ptsN* (gen de la enzima IIA^{Ntr}) muestra una pobre utilización de diversos aminoácidos como fuente de nitrógeno (Powell *et al.*, 1995), y la forma defosforilada de la enzima IIA^{Ntr} es requerida para la desrepresión del operón *ilvBN* (Lee *et al.*, 2005). También se ha demostrado la interacción de la enzima IIA^{Ntr} con la cinasa histidinica PhoR, la cual regula la respuesta celular a la escasez de fosfatos (Lüttmann *et al.*, 2012), así como la regulación directa que la enzima IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada ejerce sobre el transportador de K⁺ TrkA (Lee *et al.*, 2007).

En *Rhizobium etli* la inactivación del gen *ptsN* afecta la producción de melanina (Michiels *et al.*, 1998) y esta misma mutación incrementa la transcripción de promotores σ^{54} en *Klebsiella pneumoniae* (Merrick y Coppard, 1989).

En *P. putida* IIA^{Ntr} controla la sensibilidad del promotor Pu a la represión por glucosa (Cases *et al.*, 1999), mientras que en *Legionella pneumophila* y *P. aeruginosa* la enzima EI^{Ntr} está involucrada en el control de la virulencia (Higa y Edelstein, 2001; Tan *et al.*, 1999).

II. ANTECEDENTES

En *A. vinelandii* el gen *ptsP* codifica para una proteína con una identidad del 43% con la enzima I^{Ntr} de *E. coli* (Segura y Espin, 1998), mientras que los genes *ptsO* y *ptsN*, que codifican para las enzimas NPr y IIA^{Ntr} respectivamente, forman parte del grupo de genes *rpoN-orf102-ptsN-orf284-ptsO*; estas proteínas presentan identidades mayores al 80% con las correspondientes enzimas NPr y IIA^{Ntr} de *P. aeruginosa*, (Noguez et al., 2008) (Fig. 11).

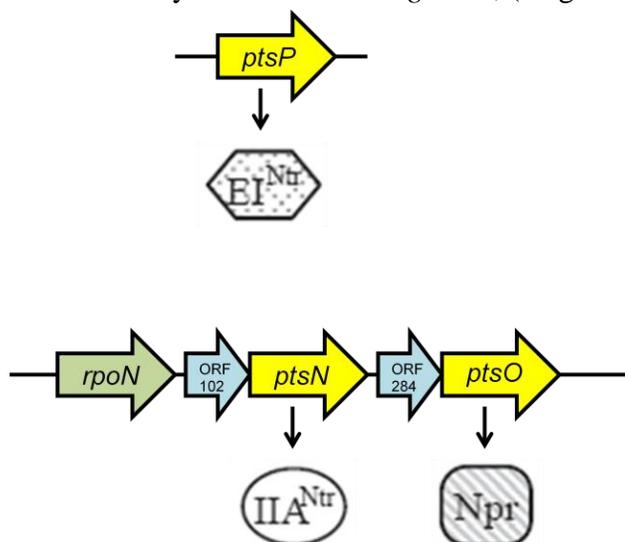


Fig. 11: Disposición de los genes del sistema PTS^{Ntr} en *A. vinelandii*.

Se ha observado que mutaciones en los genes del sistema PTS^{Ntr} de *A. vinelandii* impactan la producción de PHB. Mutantes en el gen *ptsP* y *ptsO* muestran una gran reducción en la producción de PHB, mientras que la inactivación del gen *ptsN* provoca un aumento en la producción de este polímero (Segura y Espin, 1998; Noguez et al., 2008) (Fig. 12).

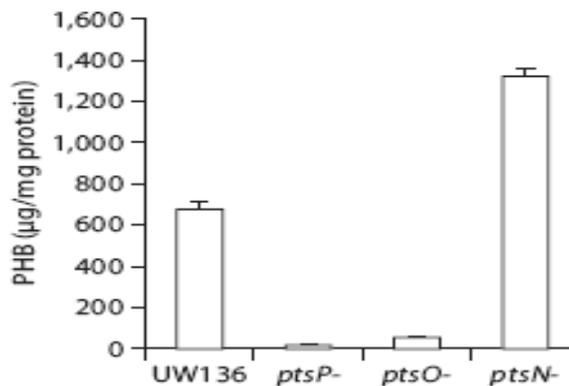


Fig. 12: Cuantificación de la producción específica de PHB en las cepas silvestre y mutantes del sistema PTS^{Ntr} en *A. vinelandii*.

Debido a que la acumulación de PHB en *A. vinelandii* es un proceso complejo; se realizaron determinaciones de los niveles de transcrito de *phbB* y *phbR* mediante RT-qPCR en las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr} para investigar si estas mutaciones afectan la expresión de estos genes, encontrándose que los niveles de transcrito tanto de *phbB* como de *phbR* se encuentran disminuidos hasta en un 70 y 60 % en las mutantes *ptsP* y *ptsO* respectivamente, mientras que se encuentran aumentados casi al doble en la mutante *ptsN* con respecto a la cepa silvestre (Noguez et al., 2008) (Fig. 13).

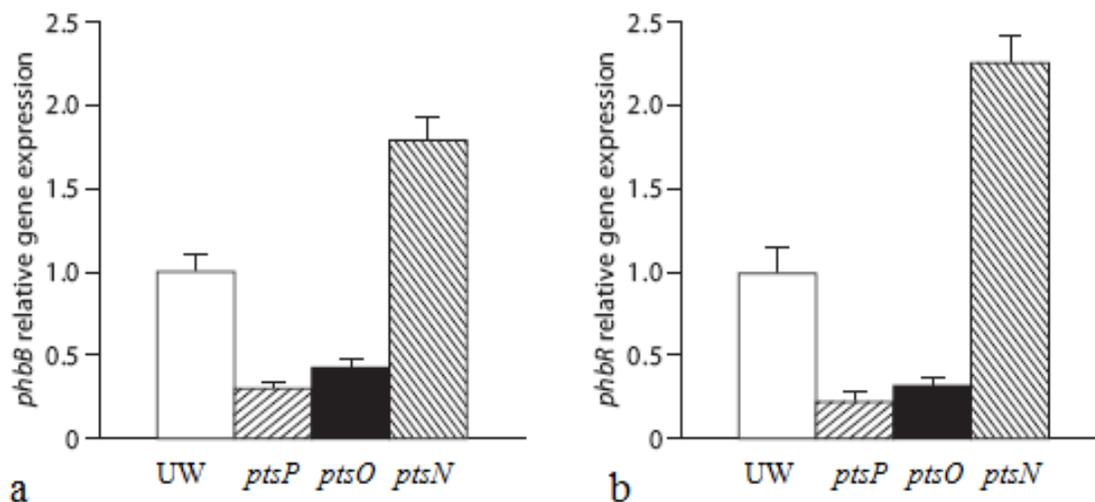


Fig. 13: Cuantificación del transcrito de *phbB* (a) y *phbR* (b) mediante RT-qPCR de las cepa silvestre y mutantes en *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* en *A. vinelandii*.

Estos resultados sugieren que en *A. vinelandii*, como en *E. coli*, existe una cascada de fosfotransferencia entre las proteínas del sistema PTS^{Ntr}, y que la forma no fosforilada de la enzima IIA^{Ntr}, que se encuentra presente en las mutantes *ptsP* y *ptsO*, es responsable de los efectos negativos en la acumulación de PHB.

En *E. coli* se ha demostrado que la fosforilación de IIA^{Ntr} se lleva a cabo en un residuo de histidina (H73), y que al realizar mutaciones puntuales donde se sustituye este residuo de histidina por un residuo no fosforilable como aspartato o alanina, la enzima IIA^{Ntr} pierde la capacidad de fosforilarse *in vivo* (Zimmer et al., 2008).

La enzima IIA^{Ntr} de *A. vinelandii* contiene un residuo de histidina fosforilable muy conservado (H68); para comprobar la importancia del estado de fosforilación de esta proteína en su actividad se produjeron mutantes en esta proteína, sustituyendo la histidina 68 por alanina y compararon sus efectos con la cepa silvestre en cuanto a la acumulación de

PHB; encontrando que la proteína mutante IIA^{Ntr} H68A tiene un efecto negativo sobre la producción de PHB similar a las mutaciones *ptsP* y *ptsO* (Fig. 14) (Noguez et al., 2008).

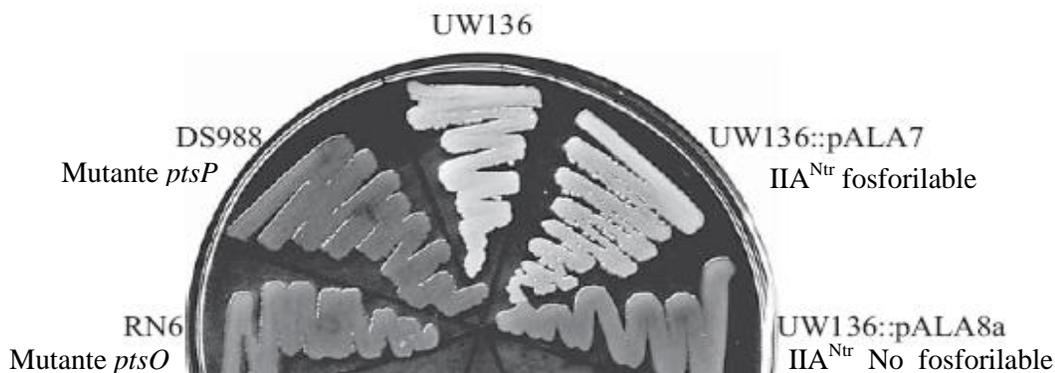


Fig. 14: Fenotipo de opacidad en la cepa silvestre y mutantes del sistema PTS^{Ntr} y de la enzima IIA^{Ntr} en *A. vinelandii*.

Estos experimentos han demostrado la participación del sistema PTS^{Ntr} en el metabolismo de PHB, particularmente que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado juega un papel inhibitorio en la producción del polímero, sin embargo aún queda la duda de cómo se lleva a cabo esta regulación.

Al hacer un análisis bioinformático de la proteína IIA^{Ntr} no se encuentran dominios o motivos de unión a DNA, una comparación mediante el algoritmo DELTA-BLAST (específico para la búsqueda de dominios) reporta solo un dominio correspondiente a la familia de proteínas PTS-IIA (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov), mientras que una búsqueda de motivos mediante la herramienta Motif Scan del Swiss Institute for Bioinformatics solo identifica el residuo fosforilable H68 (www.myhits.isb-sib.ch). Por esta razón se propone que deben existir otros elementos regulatorios para mediar la transducción de señales entre la enzima IIA^{Ntr} y los promotores de *phbB* y *phbR* o bien que la regulación se lleva a cabo post-transcripcionalmente (Fig. 15).

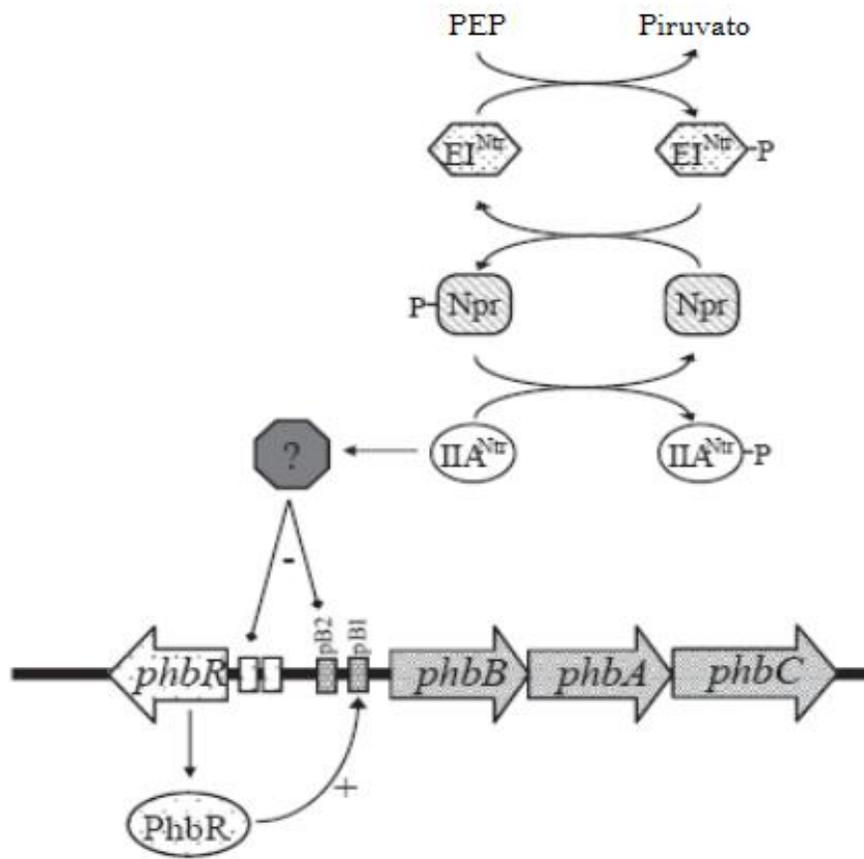


Fig. 15: Modelo propuesto para el control de los genes *phbBAC* y *phbR* por las proteínas del sistema PTS^{Ntr} en *A. vinelandii* (Noguez et al., 2008).

III. HIPOTESIS

En *A. vinelandii* la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado regula negativamente la expresión de los genes *phbB* y *phbR* a nivel transcripcional y/o post-transcripcional.

IV. JUSTIFICACION

El descubrimiento del sistema de fosfotransferencia PTS^{Ntr} y su papel como sistema regulador de importantes fenotipos como virulencia, metabolismo de nitrógeno y asimilación de potasio y fosfato sugieren que este sistema de regulación podría tener una alta jerarquía en múltiples organismos; esto hace que el estudio de este sistema resulte fundamental para entender el metabolismo bacteriano.

En lo particular, la capacidad de *A. vinelandii* para producir PHB, el cual es un polímero con un gran potencial biotecnológico y con importantes implicaciones ecológicas, hace que cobre especial relevancia el estudio de la regulación del metabolismo de este poliéster con el fin de poder utilizar a *A. vinelandii* como un organismo productor de PHB a nivel industrial.

Con este trabajo se profundizara en el conocimiento de la regulación que ejerce el sistema PTS^{Ntr} sobre el metabolismo del PHB en *A. vinelandii* al elucidar a qué nivel se lleva a cabo dicha regulación, esto permitirá descubrir el mecanismo y posibles elementos regulatorios adicionales que participen en la regulación de los genes *phbB* y *phbR*.

V. OBJETIVOS

GENERAL

- Investigar a qué nivel lleva a cabo la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada su regulación sobre la expresión de los genes *phbB* y *phbR*.

PARTICULAR

1. Investigar si el efecto negativo de la proteína IIA^{Ntr} sobre la expresión de los genes *phbB* y *phbR* se lleva a cabo a nivel transcripcional o post-transcripcional mediante fusiones génicas transcripcionales y traduccionales.

ESPECIFICOS

- a) Construir fusiones transcripcionales y traduccionales de los genes *phbR* y *phbB* con el gen reportero *gusA*.
- b) Introducir las fusiones en el genoma de las cepas de *A. vinelandii* UW *ptsP* y UW *ptsN*.
- c) Cuantificar la actividad de β -glucuronidasa para determinar si la regulación de la enzima IIA^{Ntr} no fosforilada se lleva a cabo a nivel transcripcional o post-transcripcional.

VI. MATERIAL Y METODOS

Tabla 1: Cepas usadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>A. vinelandii</i>		
UW 136 (UW)	Cepa silvestre, Nal ^r , baja producción de alginato.	Setubal. <i>et al.</i> , 2009
DS988 (UW <i>ptsP</i>)	UW136 con una mutación <i>ptsP</i> ::Tc ^r	Noguez <i>et al.</i> , 2008
RN4 (UW <i>ptsN</i>)	UW136 con una mutación <i>ptsN</i> ::Km ^r	Noguez <i>et al.</i> , 2008
AHW 13	UW136 con la fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i> cointegrada; Nal ^r Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
AHW 17	UW136 con la fusión traduccional <i>phbR-gusA</i> cointegrada; Nal ^r Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
AHW 21	UW136 con la fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i> cointegrada; Nal ^r Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012)
AHW 25	UW136 con la fusión traduccional <i>phbB-gusA</i> cointegrada; Nal ^r Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
UW <i>ptsP</i> B trans	DS988 con la fusión <i>phbB-gusA</i> transcripcional cointegrada; Nal ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
UW <i>ptsP</i> B trad	DS988 con la fusión <i>phbB-gusA</i> traduccional cointegrada; Nal ^r Tc ^r Km ^r	Este trabajo
UW <i>ptsP</i> R trans	DS988 con la fusión <i>phbR-gusA</i> transcripcional cointegrada; Nal ^r Tc ^r Sp ^r	Este trabajo
UW <i>ptsP</i> R trad	DS988 con la fusión <i>phbR-gusA</i> traduccional cointegrada; Nal ^r Tc ^r Sp ^r	Este trabajo
UW <i>ptsN</i> B trans	RN4 con la fusión <i>phbB-gusA</i> transcripcional cointegrada; Nal ^r Km ^r Tc ^r	Este trabajo
UW <i>ptsN</i> B trad	RN4 con la fusión <i>phbB-gusA</i> traduccional cointegrada; Nal ^r Km ^r Tc ^r	Este trabajo
UW <i>ptsN</i> R trans	RN4 con la fusión <i>phbR-gusA</i> transcripcional cointegrada; Nal ^r Km ^r Tc ^r	Este trabajo
UW <i>ptsN</i> R trad	RN4 con la fusión <i>phbR-gusA</i> traduccional cointegrada; Nal ^r Km ^r Tc ^r	Este trabajo
UW <i>gyrA-R-gusA</i>	UW 136 con la fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> cointegrada; Nal ^r Sp ^r	Este trabajo
UW <i>ptsP gyrA-R-gusA</i>	DS998 con la fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> cointegrada; Nal ^r Tc ^r Sp ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pAHFUTs-R	pAHFU con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i> . Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
pAHFUTs-B	pAHFU con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i> . Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
pAHFUTd-R	pAHFU con fusión traduccional <i>phbR-gusA</i> . Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
pAHFUTd-B	pAHFU con fusión traduccional <i>phbR-gusA</i> . Tc ^r	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> , 2012
pHP45Ω-Km	Vector con un fragmento HindIII que contiene un cassette de resistencia a Km. Amp ^r Km ^r	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pHP45Ω-Sp	Vector con un fragmento HindIII que contiene un cassette de resistencia a Sp. Amp ^r Sp ^r	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pAHFUTs-R-Km	pAHFU con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i> . Km ^r	Este trabajo
pAHFUTs-B-Km	pAHFU con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i> . Km ^r	Este trabajo
pAHFUTd-R-Sp	pAHFU con fusión traduccional <i>phbR-gusA</i> . Sp ^r	Este trabajo
pAHFUTd-B-Sp	pAHFU con fusión traduccional <i>phbR-gusA</i> . Sp ^r	Este trabajo
pRGFTdgyrA-R	Derivado del pAHFUTd-R-Sp, porta la fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i> . Sp ^r	Este trabajo

Tabla 3: Oligonucleotidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Uso
TransB Fw	ATC GAA TTC CCA TCA CCG CCA TAT CA	Delantero para las fusiones <i>phbB-gusA</i> transcripcional y traduccional
TransB Rev	ATC GAA TTC TAG CTG CGC AGC GTC GTT	Reverso para la fusión <i>phbB-gusA</i> transcripcional
TradB Rev	ATC CTG CAG TTG ATG GCT CAT AGA TTT	Reverso para la fusión <i>phbB-gusA</i> traduccional
TransR Fw	ATCG AAT TCT GAT GGA TGG AGA ATG CC	Delantero para las fusiones <i>phbR-gusA</i> transcripcional y traduccional
TransR Rev	ATC GAA TCC CGC ATG TGG AAA AAC CAA	Reverso para la fusión <i>phbR-gusA</i> transcripcional
TradR Rev	ATC CTG CAG GAC TGT AAA CAT ATT CCT TT	Reverso para la fusión <i>phbR-gusA</i> traduccional
Gus12230-1	GAG CTC GCC GTA GTG GAT CAG C	Delantero para el gen Avin12230
Gus12230-6	GAG CTC CCT CAA GCA AA TCA ATG	Reverso para el gen Avin12230
rpoS-5	GAT TTG TCG CAG AGT ATC G	Delantero para el gen <i>rpoS</i>

rpoS-6	GAC AGC GAT CGA GGC CGT TC	Reverso para el gen <i>rpoS</i>
Rtrad Inv Fw	CAC ATG CGT TTG GTT TCT TG	Delantero para PCR reversa de fusión <i>phbR-gusA</i>
Rtrad Inv Rv	GCC GCT CTA GAT GCA GAA CC	Reverso para PCR reversa de fusión <i>phbR-gusA</i>
PgyrA Fw PstI	AGC AGG CCT CGG CAG GGG	Delantero para amplificar el promotor del gen <i>gyrA</i>
PgyrA Rv EcoRI	CTC GAA TTC CGT CAG CAG TGT CCT	Reverso para amplificar el promotor del gen <i>gyrA</i>
Fus <i>gyrAR</i> RT Fw	CAC ATG CGT TTG GTT TCT TG	Delantero para RT-qPCR de fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i>
Fus <i>gyrAR</i> RT Rv	TTT TTG ATT TCA CGG GTT GG	Reverso para RT-qPCR de fusión traduccional híbrida <i>gyrA-phbR-gusA</i>
<i>gyrA</i> Fw RT	CCA GCA AGG GCA AGG TCT A	Delantero para RT-qPCR del gen <i>gyrA</i>
<i>gyrA</i> Rv RT	TCG TCC AGC GGC AAC AGG T	Reverso para RT-qPCR del gen <i>gyrA</i>

6.1 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron:

Medio Luria-Bertani (LB)

Reactivo	Cantidad
Peptona de caseína	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro de sodio	10 g.
Agua destilada c.b.p.	1 L.

Si se desea preparar medio sólido agregar 15 g. de Agar Bacteriológico por litro de medio.

Medio Burk-Sacarosa (BS)

Reactivo	Cantidad
MgCl ₂ a 160 g/L	1 ml
NaMoO ₄ a 0.2 g/L	1 ml
FeSO ₄ a 5 g/L	1 ml
CaCl ₂ a 7.3 g/L	10 ml
Na ₂ SO ₄ a 18.3 g/L	10 ml
Sacarosa al 20%	100 ml
Buffer de fosfatos a pH 7	100 ml
Agua destilada c.b.p.	1 L.

Al preparar este medio se deben esterilizar por separado el agua y cada una de las sales y esperar a que se enfríen antes de mezclarlas, de otra manera, si se agregan las sales al agua caliente estas se precipitaran.

Si se desea preparar medio BS sólido se debe sustituir el agua por Agar-Agua (15 g/L).

Para preparar medio de competencia (CM) solo se debe evitar agregar las sales de Fe y Mo.

Buffer de fosfatos a pH 7

	Para 200 mL	Para 300 mL	Para 600 mL
Reactivo	Cantidad	Cantidad	Cantidad
K ₂ HPO ₄	1.6 g.	2.4 g.	4.8 g.
KH ₂ PO ₄	0.4 g.	0.6 g.	1.2 g.

Medio PY-Sacarosa.

Reactivo	Cantidad
Peptona de caseína	5 g.
Extracto de levadura	3 g.
Sacarosa	20 g.
Agua destilada c.b.p.	1 L.

Si se quiere preparar medio solido agregar 15 g. de Agar Bacteriológico por litro de medio.

6.2 Antibióticos.

Los antibióticos utilizados para cultivar *A. vinelandii* fueron:

Antibiótico	Concentración
Ac. nalidixico	15 µg/ml
Tetraciclina	15 µg/ml
Espectinomicina	50 µg/ml
Kanamicina	1 µg/ml

Los antibióticos utilizados para cultivar *E. coli* fueron:

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	100 µg/ml
Tetraciclina	30 µg/ml
Espectinomicina	50 µg/ml
Kanamicina	30 µg/ml

6.3 Condiciones de cultivo.

Cuando no se especifica lo contrario, las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo fueron:

Para *E. coli*:

Medio Solido: Se utilizaron placas Petri desechables de 100 x 15 mm con 25 ml de medio solido LB adicionado con antibióticos de selección. Las placas se incubaron a 37° C por 24 horas.

Para *A. vinelandii*:

Medio solido: Se utilizaron placas Petri desechables de 100 x 15 mm con 25 ml de medio solido BS adicionado con antibióticos de selección. Las placas se incubaron a 30° C por 48 horas.

Medio líquido: Se utilizaron matraces Erlen-Meyer de 250 ml con 50 ml de caldo BS adicionado con antibióticos de selección. Los matraces se incubaron a 30° C por 48 horas y 200 rpm.

6.4 Extracción de DNA cromosomal de *A. vinelandii*.

1. Cultivar *A. vinelandii* en 50 ml de medio BS durante 48 horas a 200 rpm y 30° C.
2. Centrifugar y separar las células.
3. Lavar las células con buffer TE 50/20 (50 mM de Tris-Cl, 20 mM de EDTA pH 8).
Nota: trabajar con una pastilla celular cuyo volumen no exceda los 100 µl.
4. Resuspender en 450µl de buffer TE 50/20.
5. Agregar 50 µl de lizozima (10mg/ ml), incubar 30 min. a 37° C.
6. Agregar 50 µl de proteasa (10mg/ ml), incubar 30 min. a 37° C.
7. Agregar 50 µl de SDS 10%, incubar 15 min. a 37° C (o más tiempo hasta que se observe una solución turbia y viscosa).
8. Agregar 100 µl de NaCl 5M; mezclar e incubar 10 min. a 65° C.
9. Adicionar 80 µl de solución de CTAB al 10% en NaCl 0.7M (previamente incubada a 65° C) e incubar de 15 a 20 min. a 65° C.

10. Agregar un volumen de una solución de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y mezclar bien. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
11. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar un volumen de una solución de fenol –cloroformo – alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar bien. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
12. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar un volumen de una solución de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y mezclar bien. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
13. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 0.6 ml. de isopropanol. Mezclar bien y centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
14. Desechar el sobrenadante y añadir 1 ml de Etanol al 70%, vortexear, centrifugar y decantar. Repetir este paso 2 veces más.
15. Secar y resuspender la pastilla en 30 µl de RNAasa (20 µg/ ml).
16. Incubar 1hr a 37° C para que actúe la RNAasa.
17. Revisar el producto de extracción mediante electroforesis en gel de agarosa, se deben observar bandas de alto peso molecular.
18. Almacenar a -20° C.

6.5 Extracción de RNA total de *A. vinelandii*.

1. Recuperar las células de un cultivo de *A. vinelandii* por centrifugación a 5 000 rpm por 10 min (el paquete celular adecuado para esta técnica no debe exceder los 100 µl, 50 µl es el volumen idóneo).
2. Resuspender la pastilla en 60 µl en una solución de DEPC 0.1% V/V.
3. Adicionar 5 µl de una solución de DEPC 0.5 % V/V.
4. Adicionar 200 µl de acetona helada, mezclar manualmente y centrifugar a 10 000 rpm por 2 min. Desechar el sobrenadante con cuidado.
5. Resuspender la pastilla en 50 µl de DEPC 0.1 % V/V, agregar 10 µl de lisozima (10 mg/ml) preparada con DEPC 0.5%. Incubar a 37° C por 10 min.
6. Agregar 1 µl de Proteínasa K (100 µl/ ml). Incubar en hielo 10 min.

7. Agregar 3.5 µl de DEPC 0.5% V/V, 200 µl de fenol (precalentado a 70° C), 150 µl de cloroformo, mezclar manualmente y adicionar 120 µl de DEPC 0.1% V/V. Centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
8. Remover la fase acuosa y adicionar 1 ml. de etanol absoluto.
9. Precipitar 1 hr a -20° C o toda la noche. Centrifugar a 12 000 por 15 min. y resuspender en 50 µl de DEPC 0.1 % V/V.
10. Almacenar a -20° C.

DEPC: di-etil pirocarbonato. La solución se prepara adicionando la cantidad adecuada (V/V) de este reactivo en agua tetradestilada. Se incuba con agitación a 37° C toda la noche para inactivar las RNAasas. Al día siguiente se esteriliza por autoclave, lo que también resulta en la inactivación del DEPC.

6.6 Extracción de plásmido de *E. coli* mediante perclorato.

1. Preparar cultivos líquidos de la cepa a la que se le extraerá plásmido con 5 de caldo LB en tubo de ensayo, incubar a 37° C por 12 a 18 horas y 200 rpm.
2. Centrifugar 1.5 ml de cultivo.
3. Resuspender en 175 µl de buffer TES
4. Añadir 25 µl de lisozima (10mg/ ml)
5. Incubar 20 minutos en hielo.
6. Añadir 400 µl de agua helada.
7. Incubar 15 minutos a 73° C.
8. Centrifugar 15 min. a 13 000 rpm.
9. Descartar el pellet con un palillo o transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
10. Añadir 60 µl de NaClO₄ 5M.
11. Añadir 600 µl de isopropanol, mezclar.
12. Centrifugar 15 min. a 13 000 rpm.
13. Lavar pellet con etanol al 70% 2 veces.
14. Secar y resuspender en 50 µl de RNAsa 20µg/ml.

Buffer TES

15% Sacarosa
50mM TROS pH 8.5
50mM EDTA pH 8.0

6.7 PCR.

Las condiciones de PCR usadas en este trabajo fueron: un ciclo de desnaturalización a 95° C por 1 min, un ciclo de alineamiento (temperaturas especificadas en la siguiente tabla) por 30 seg. y un ciclo de extensión a 72° C/(tiempos de extensión especificados en la siguiente tabla).

PCR	Tm	Tiempo de Extensión
Amplificación de fusiones transcripcionales y traduccionales de <i>phbB</i> y <i>phbR</i>	59° C	30 seg.
PCR reversa del pAHFUTd-R	61° C	8:30 min
Amplificación de un fragmento silvestre del gen Avin12230	59° C	2:00 min
Amplificación del promotor de <i>gyrA</i>	56° C	20 seg.
Amplificación de la fusión <i>gyrA-phbR-gusA</i>	62° C	30 seg.

A todas las reacciones se les realizo un ciclo de extensión final de 10 min. a 72° C.

6.8 Purificación de banda de DNA mediante Glassmilk.

1. Correr suficiente DNA en gel de agarosa. Cortar la banda deseada con navaja o bisturí y transferir a un tubo eppendorf.
2. Añadir 700 µl de NaI y calentar de 50 – 55° C por 5 min.
3. Añadir 10 µl de resina Glassmilk (homogenizar la resina agitándola en vortex). Agitar el tubo invirtiéndolo.
4. Incubar en hielo 15 min, agitando suavemente cada 2 min.
5. Centrifugar 15 seg. a 10 000 rpm.
6. Decantar y seguir trabajando con el pellet de resina.
7. Lavar la resina (a la cual se ha pegado el DNA) 3 veces con 700 µl de buffer NEW WASH® de MP frío, mezclar suavemente con pipeta. NO USAR VORTEX.

8. Centrifugar 30 seg y remover el sobrenadante tanto como sea posible. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente por 20 min o a 37° C por 10 min.
9. Agregar 20 µl de agua destilada a la resina e incubar a 55° C por 3 min. Centrifugar 30 seg a 10 000 rpm
10. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, EN ELLA ESTA EL DNA. Evitar arrastrar resina junto con la solución de DNA pues esto impedirá un uso óptimo del DNA.
11. Repetir el paso 9 y 10, recolectar el sobrenadante en el mismo tubo.

Nota: NUNCA exponer la banda a ser cortada a la luz UV intensa pues se daña la estructura del DNA e impide su clonación posterior. Se sugiere tomar una foto al gel DESPUES de cortar la banda para asegurarse de que se ha cortado la banda deseada y tenerlo como evidencia.

6.9 Ligación de DNA.

En la realización de este trabajo se utilizo la enzima T4 DNA ligasa de ROCHE[®], usándola bajo las condiciones recomendadas por el fabricante.

La enzima T4 DNA ligasa une poli-nucleótidos que tienen extremos 5'-fosfato a extremos 3'-hidroxilo usando ATP. Es usada para:

1. Ligación de fragmentos de DNA con extremos romos o cohesivos.
2. Ligación de un vector con el DNA del inserto.
3. Reparación de “nicks” en un dsDNA.

Se realiza la mezcla de reacción, que contiene el DNA del vector y del inserto, el buffer de la enzima y agua destilada para aforar al volumen adecuado. Es muy importante tomar en cuenta que debe mantenerse el orden de relación molar inserto – vector en una proporción 5:1 y se incuba en función de los extremos generados (romos o cohesivos), preferentemente a 16° C durante toda la noche.

6.10 Precipitación de DNA con glucógeno.

1. A un tubo con 50 µl de una solución de DNA (máximo 1 µg/ml) agregar 1 µl. de glucógeno (20 mg/ml.) y 500 µl. de isopropanol.
2. Mezclar suavemente e incubar a -70° C por 30 min.
3. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 min. y eliminar el sobrenadante.

4. Lavar la pastilla con etanol 70% 3 veces.
5. Secar perfectamente la pastilla y resuspender en el volumen deseado de agua estéril.

Si se desea precipitar RNA solo se debe hacer un lavado con etanol 100%.

6.11 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.

1. Inocular 5ml de medio LB con la cepa de *E. coli* con la que se desean preparar células competentes. Incubar por 12 a 18 hr a 37° C y 200 rpm.
2. Inocular 100 ml de medio LB con 1 ml del cultivo obtenido.
3. Incubar a 37° C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O a 650 nm de 0.4 – 0.5 (aprox. 3 horas).
4. Transferir el cultivo a tubos de polipropileno, enfriar en hielo durante 10 min.
5. Recuperar las células por centrifugación fría a 4000 rpm por 10 min. y 4° C.
6. Resuspender las células obtenidas en 30 ml CaCl₂ 0.1 M frío y mantenerlas en hielo por 15 minutos.
7. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min y 4° C.
8. Resuspender las células en 2 ml de una solución fría de CaCl₂ 0.1M y 14% de Glicerol.*
9. Alicuotar 0.2 ml de esta suspensión en tubos eppendorf de 1000µL.
10. Almacenar a -70° C.

NOTA: Es importante seguir las siguientes recomendaciones: Siempre mantenga en hielo las células; Nunca vortexee las células. Para resuspenderlas hágalo suavemente con la punta misma de la micropipeta, succionando repetidas veces.

* Algunos autores han reportado que existe un aumento en la competencia después de incubar las células por 12hr a 4° C, en éste punto. Este aumento es transitorio por lo que se recomienda sólo incubar las células que se transformarán al día siguiente, el resto almacenarlo inmediatamente a -70° C.

6.12 Electroporación de *E. coli*.

1. Mezclar en un tubo Eppendorf 50 µl de células electrocompetentes de *E. coli*. con la cantidad a transformar de DNA (1 a 5 µl normalmente).

- Transferir la mezcla a celdas de electroporación estériles y mediante un electroporador darles un shock de 2.5 KV por 5 mseg.
- Agregar a la celda 1 ml de medio SOC y mezclar.
- Transferir la mezcla a un tubo de ensayo e incubar a 37° C por 1 hora.
- Plaquear 100 µl de cultivo en placas de agar LB adicionado con el antibiótico adecuado e incubar a 37° C por 24 horas.

Medio SOC:

Reactivo	Cantidad
Peptona de caseina	20 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro de sodio	0.5 g.
KCl 0.25 M	10 ml.
MgCl ₂	5 ml.
Glucosa 1 M	20 ml.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

La glucosa se debe preparar y esterilizar por separado ya que esta se carameliza a temperaturas superiores a los 105° C.

6.13 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*.

La preparación de células competentes de *A. vinelandii* consiste simplemente en hacer cultivos y pases de células en medio CM: se inocula la cepa en placa de medio CM y se incuba a 30° C por 48 horas, terminada la incubación se toma un inóculo de esa placa y se siembra nuevamente en placa de medio CM incubándose a 30° C por 48 horas, terminado este segundo cultivo se recoge todo el crecimiento celular con espátula estéril y se lavan las células recuperadas con MgSO₄ 10 mM para eliminar todo el alginato, estas células se siembran en matraces con medio CM líquido y se incuban a 30° C por 48 horas a 200 rpm, las células obtenidas de este tercer cultivo serán ya células competentes de *A. vinelandii*.

6.14 Transformación de *A. vinelandii* con DNA plasmídico o cromosomal.

- Utilizar 100 µL de células competentes y agregar 5 µg de DNA de plásmido linealizado (si el plásmido es super-enrollado utilizar 10 µg) o 5 µg de DNA cromosomal. Realizar esto en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Colocar la mezcla sobre medio CM sólido, extender la solución células – DNA con la punta azul de la micropipeta en una superficie aproximada de 4 cm². Incubar a 30° C por 24 hr.

3. Recolectar el crecimiento celular con espátula esteril y realizar lavados con 1ml de $MgSO_4$ 10mM para eliminar el alginato.
4. Resuspender las células lavadas en 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM.
5. Hacer diluciones si es necesario y plaquear en el medio de selección (por lo general no es necesario hacer diluciones pues la frecuencia de transformacionno es alta).
6. Incubar a 30° C por 2-4 días.

6.15 Transformación de *A. vinelandii* con lisado celular.

1. Cultivar la cepa donadora de DNA.
2. Recuperar las células por centrifugación y lavar el paquete celular con NaCl 0.85%.
3. Resuspender las células en 2 ml de buffer de lisis e incubar a 60° C por 1 hr agitando suavemente.
4. Mezclar en un tubo eppendorf 100 μ l de células competentes con 100 μ l de lisado de células donadoras.
5. Continuar con el paso 2 de la técnica de transformación de células competentes de *A. vinelandii* con DNA plasmídico o cromosomal.

Buffer de lisis:

15mM NaCl.

15mM Citrato de sodio.

SDS 0.05%

Ajustar a pH 7

Para 50mL de buffer de lisis:

NaCl: 0.043g.

Citrato de sodio: 0.22g

SDS: 0.125 ml de una solución de SDS al 20% V/V

Ajustar a pH 7

6.16 Cuantificación de proteína por el método de Lowry.

1. Tomar alícuotas del cultivo a cuantificar y lavar las celulas con $MgSO_4$ 10 mM. Resuspender las celulas en 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM.

2. Tomar una cantidad adecuada de muestra y aforarla a 200 μ l con agua destilada, añadir 1 ml de solución reactiva e incubar por 10' a temperatura ambiente
3. Agregar 100 μ l de reactivo de Folín (Sigma) diluido en un volumen de agua e incubar por 30 min. a temperatura ambiente.
4. Leer absorbancias de los ensayos a 625 nm.

Paralelamente se debe preparar y cuantificar una curva de ajuste con concentraciones conocidas de proteína.

La solución reactiva se debe preparar a partir de soluciones stock de:

- A. Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 M.
- B. Tartrato de sodio y potasio 2%.
- C. CuSO_4 1%.

La solución reactiva se prepara mezclando 98 ml de la solución A con 1 ml de la solución B y 1 ml de la solución C.

6.17 Cuantificación de actividad de β -glucuronidasa.

Se debe prepara el siguiente buffer

Buffer Z	STOCK	ml. Stock / 50 ml.
K_2HPO_4	0.5 M	3.0 ml
KH_2PO_4	0.5 M	2.0 ml
EDTA	0.25 M	0.2 ml
DTT	0.25 M	1.0 ml

Todos los componentes del buffer Z deben esterilizarse por separado (con excepción del DTT) y mezclarse al momento de usar el buffer Z.

1. Tomar alícuotas del cultivo a cuantificar y lavar las células con MgSO_4 10 mM y resuspenderlas en 1 ml de MgSO_4 10 mM.
2. Tomar 20 μ l de muestra (Vol Rx) y agregar 710 μ l de buffer Z. Preparar en paralelo un blanco que contenga 730 μ l de buffer Z y procesarlo con las demás muestras.
3. Agregar 10 μ l de lisozima (10 mg/ml) e incubar 5 min. a 37° C.
4. Agregar 10 μ l de una solución de Triton[®] al 10%.

5. Agregar 100 μl de para-nitrofenilglucuronido (4 mg/ml). Cronometrar el tiempo justo de inicio de reacción
6. Incubar las reacciones a 28° C por 15 min (t Rx).
7. Agregar 150 μl de Na_2CO_3 1.2 M para detener la reacción.
8. Leer la absorbancia a 405 nm contra el blanco.

El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol producido es 18000 D.O.=0.0179 a 405 nm (en un vol. de 1 ml) y representa 1 nM de producto producido.

La actividad específica de β -glucuronidasa (unidades Miller) puede ser calculada fácilmente con la siguiente ecuación:

$$\text{U. Miller} = \frac{\text{D.O. (405 nm)} \times 1000}{(0.018) \times (\text{t Rx minutos}) \times (\text{Vol Rx}) \times (\mu\text{g proteína/ml})}$$

Donde:

1 U. Miller = 1 nmol de p-nitrofenol producido / min / μg de proteína

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

En trabajos previos se demostró la participación del sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la expresión de los genes *phbR* y *phbB*, específicamente que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado ejerce un efecto negativo sobre la expresión de estos genes; sin embargo no se sabía a qué nivel se ejerce esta regulación.

7.1 Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR*.

Previamente se construyeron en el laboratorio plásmidos que contienen fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR* usando como reportero al gen *gusA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa. Las fusiones transcripcionales poseen la región promotora de los genes *phbR* y *phbB* unidas al gen reportero *gusA* con su propia región 5' no traducida; para las fusiones traduccionales se usaron la región promotora, la región 5' no traducida y una pequeña parte de la región codificante de los genes *phbR* y *phbB* (4 y 3 codones respectivamente) unidas en fase con la región codificante del gen *gusA* (Fig. 16).

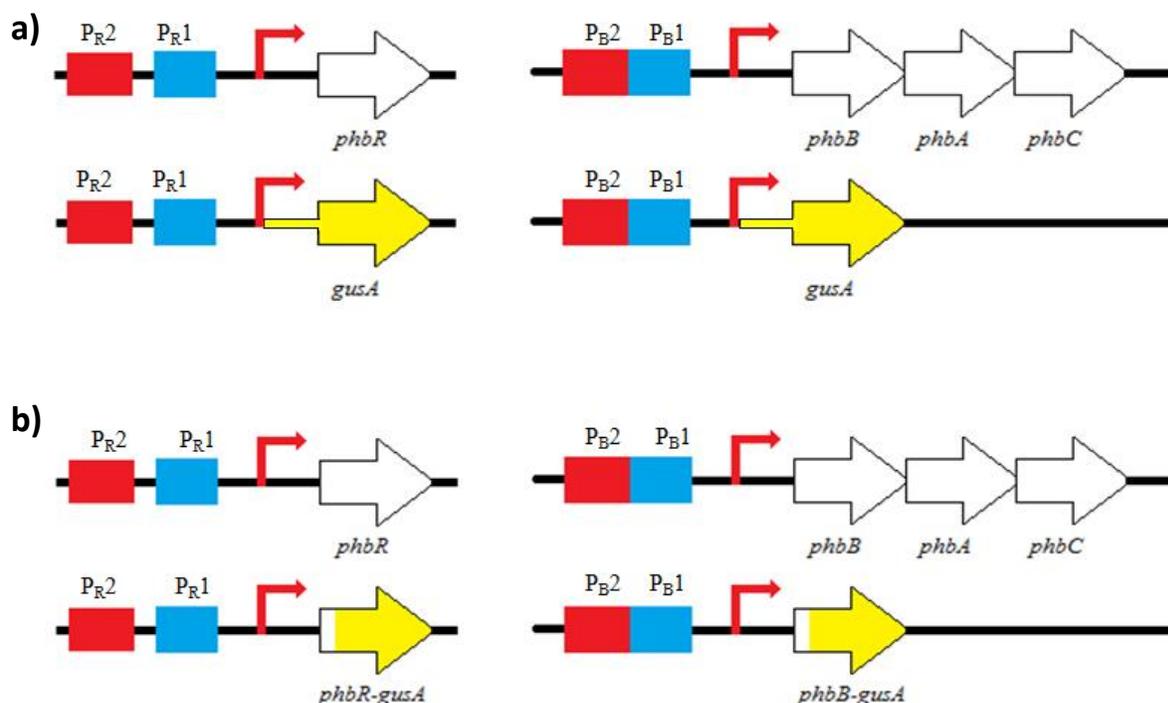


Fig. 16: Representación esquemática de las fusiones con el gen reportero *gusA*, los cuadros azules y rojos representan los promotores de los genes y las flechas rojas representan los sitios de inicio de la transcripción. (a) fusiones transcripcionales de *phbB* y *phbR* (b) fusiones traduccionales de *phbB* y *phbR*.

Todas las fusiones génicas se encuentran flanqueadas por regiones de aproximadamente 460 pb que corresponden a la región reguladora y parte de la codificante del gen Avin12230, que codifica para una proteína hipotética que presenta homología con transposasas y fue elegido como sitio neutro de cointegración para las fusiones génicas (Fig. 17).

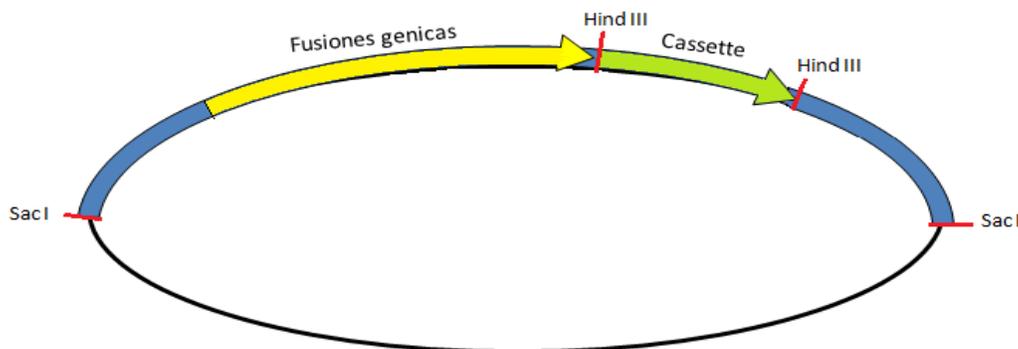


Fig. 17: Arquitectura general de los plásmidos que portan las fusiones génicas *phbB-gusA* y *phbR-gusA* transcripcionales y traduccionales; la línea azul representa el fragmento del gen Avin12230 y las zonas amarilla y verde representan las fusiones génicas y los cassettes de resistencia respectivamente.

Las fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR* se encuentran clonadas en plásmidos derivados del vector pCN154, los cuales poseen un fragmento Hind III con un cassette de resistencia a Tetraciclina (Tc) clonado río abajo y en la misma orientación que el gen *gusA* (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012) (ver Tabla 2 de Materiales y Métodos).

Dado que la cepa DS988 (*UW ptsP*) a utilizarse en este trabajo ya posee la resistencia a Tc como marcador, fue necesario sustituir los cassettes de resistencia a Tc en los plásmidos portadores de las fusiones génicas de *phbB* y *phbR*.

Los plásmidos pAHFUTs-B, pAHFUTs-R, pAHFUTd-B y pAHFUTd-R fueron digeridos con Hind III y los fragmentos correspondientes a las fusiones génicas fueron ligados con cassettes de resistencia a kanamicina (Km) o espectinomicina (Sp) previamente obtenidos a partir de los plásmidos pHP45Ω-Km y pHP45Ω-Sp respectivamente; ambos cassettes se encuentran clonados en fragmentos Hind III en sus plásmidos correspondientes. De esta manera se produjeron los plásmidos pAHFUTs-R-Km, pAHFUTs-B-Km, pAHFUTd-R-Sp y pAHFUTd-B-Sp (ver Tabla 2 de Materiales y Métodos).

Se comprobó la correcta construcción de estos plásmidos mediante PCR para amplificar la fusión génica correspondiente a cada uno (Figs. 18 y 19) y mediante patrón de restricción con la enzima Sac I, donde se observaron 2 bandas de tamaños esperados: una de 5 Kb correspondiente a la fusión génica con el cassette de resistencia y otra de 3 Kb correspondiente al resto del plásmido respectivo.

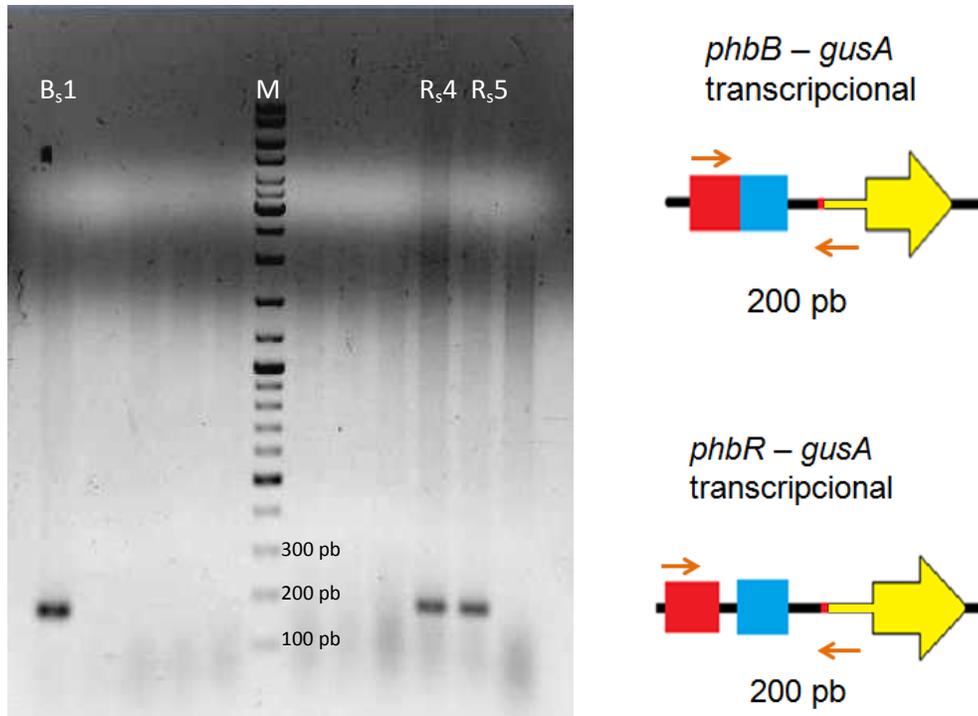


Fig. 18: PCR para confirmar la presencia de las fusiones de *phbB* y *phbR* transcripcionales en los plásmidos pAHFUTs-R-Km y pAHFUTs-B-Km. Bs1: clona con la fusión *phbB-gusA* transcripcional, M: Marcador de peso molecular, Rs4 y Rs5: clonas con la fusión *phbR-gusA* transcripcional.

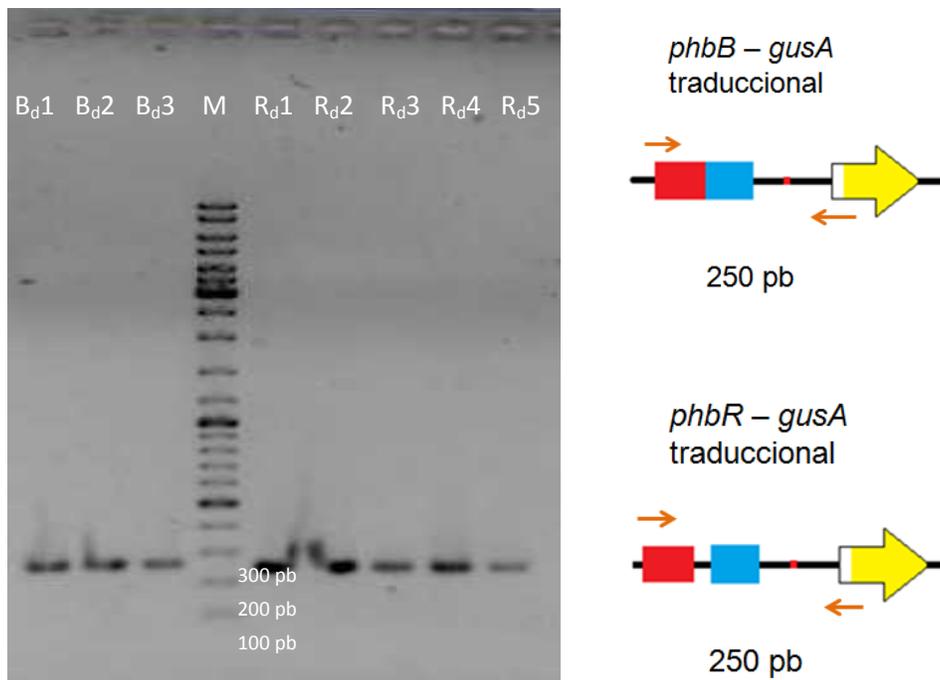


Fig. 19: PCR para confirmar la presencia de las fusiones de *phbB* y *phbR* traduccionales en los plásmidos pAHFUTd-R-Sp y pAHFUTd-B-Sp. Bd1-Bd3: clonas con la fusión *phbB-gusA* traduccional, M: marcador de peso molecular, Rd1-Rd5: clonas con la fusión *phbR-gusA* traduccional.

7.2 Transformación de las fusiones génicas en la cepa DS988 (UW *ptsP*).

Los plásmidos pAHFUTs-R-Km, pAHFUTs-B-Km, pAHFUTd-R-Sp y pAHFUTd-B-Sp fueron digeridos con Sac I y transformados en la cepa UW *ptsP*.

Se aislaron clonas candidatas de cada transformación resistentes a Km y Sp; para comprobar la presencia de las fusiones génicas se hizo PCR para amplificar un fragmento del gen *Avin12230*; el tiempo de amplificación usado fue suficiente para amplificar un fragmento de 1.6 Kb en la cepa silvestre pero no para amplificar el gen con la fusión integrada en las transformantes (Fig. 20 y 21).

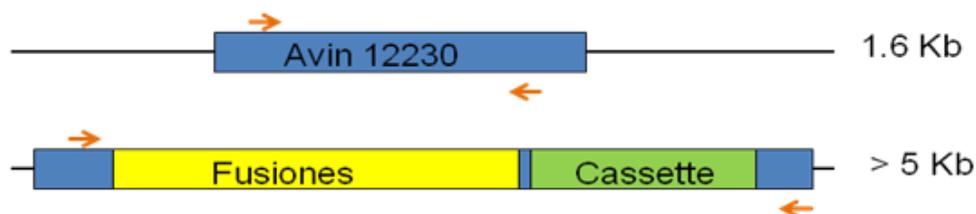


Fig. 20: Representación de los oligonucleótidos (flechas anaranjadas) usados para comprobar la presencia de gen silvestre *Avin 12230* y los tamaños correspondientes a amplificar en un genotipo silvestre y uno con las fusiones integradas.

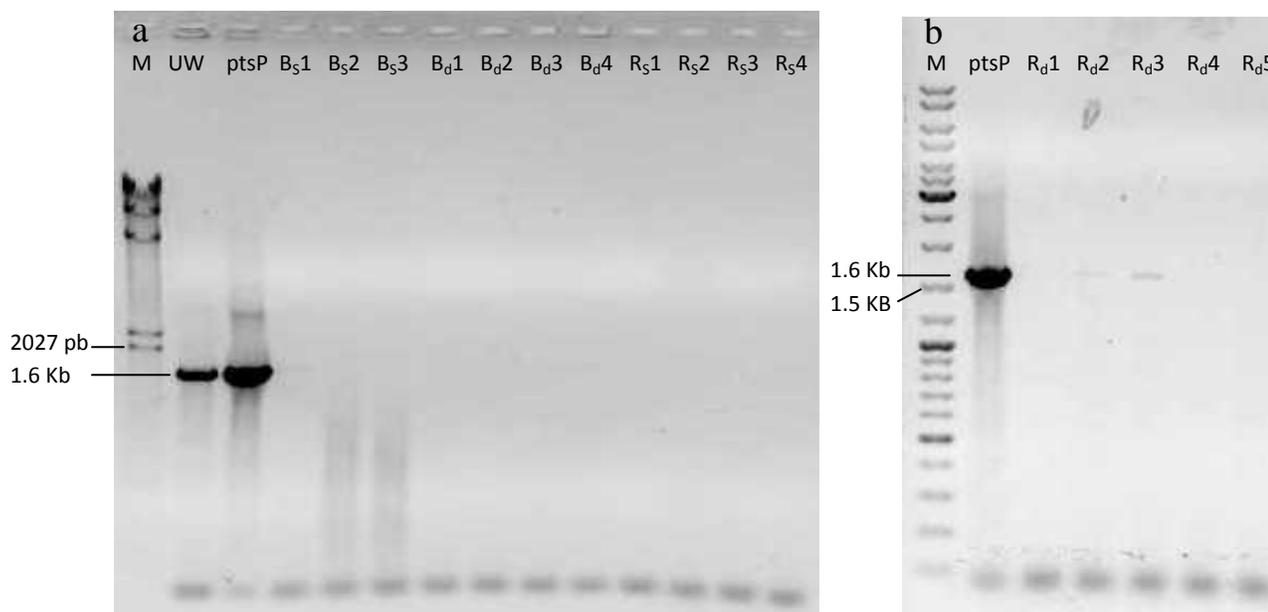


Fig. 21: PCR para verificar la ausencia de copias silvestres del gen *Avin12230* en clonas transformantes **a)** M: marcador de peso molecular, UW: cepa silvestre, *ptsP*: cepa parental, B_s1-B_s3: clonas con la fusión *phbB-gusA* transcripcional, B_d1-B_d4: clonas con la fusión *phbB-gusA* traduccional, R_s1-R_s4: clonas con la fusión *phbR-gusA* transcripcional **b)** M: marcador de peso molecular, *ptsP*: cepa parental, R_d1-R_d5 clonas con la fusión *phbR-gusA* traduccional.

A las clonas que no presentaron amplificado del fragmento silvestre se les hizo PCR para comprobar que efectivamente tuvieran las fusiones deseadas usando oligonucleótidos específicos para cada fusión génica (Fig. 22) (ver Tabla 3 de Materiales y Métodos).

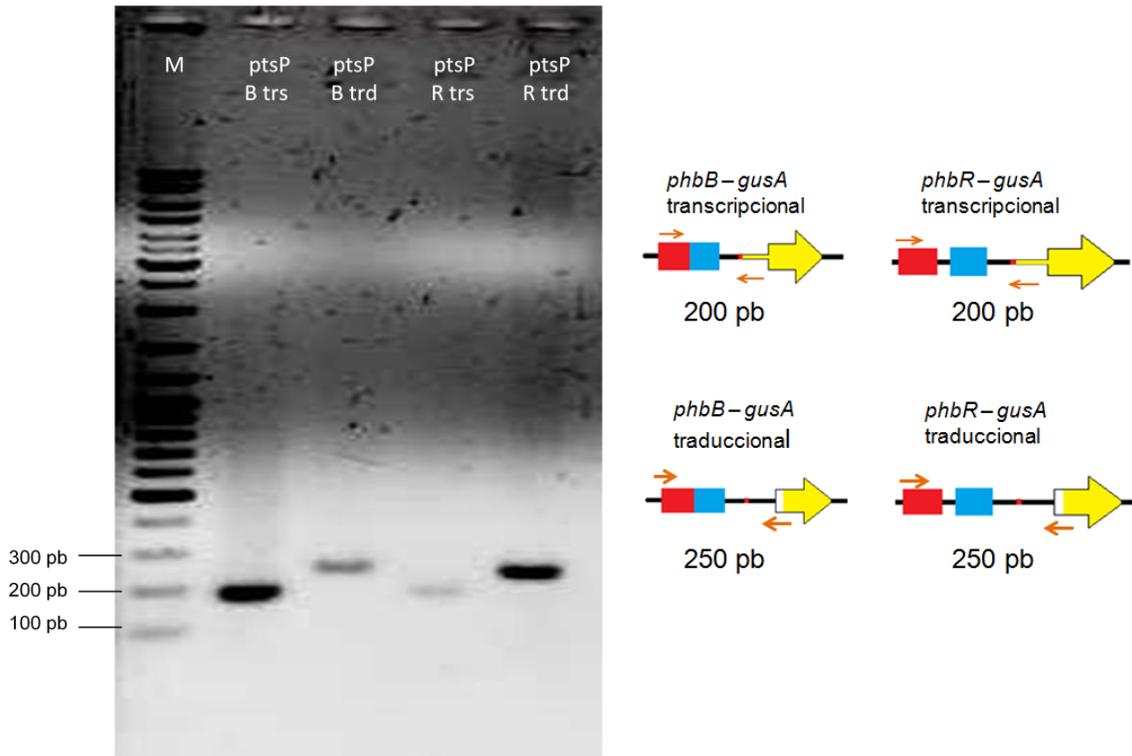


Fig. 22: PCR para confirmar la presencia de las fusiones génicas en clonas transformantes seleccionadas de la cepa UW *ptsP*; M: marcador de peso molecular, ptsP B trs: clona con la fusión *phbB-gusA* transcripcional, ptsP B trd: clona con la fusión *phbB-gusA* traduccional, ptsP R trs: clona con la fusión *phbR-gusA* transcripcional, ptsP R trd: clona con la fusión *phbR-gusA* traduccional.

De esta manera se produjeron las cepas UW *ptsP* B trans, UW *ptsP* B trad, UW *ptsP* R trans y UW *ptsP* R trad (Ver tabla 1 de Materiales y Métodos).

7.3 Transformación de las fusiones génicas en la cepa RN4 (UW *ptsN*).

Para introducir las fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR* en la cepa UW *ptsN* se utilizó un procedimiento similar al usado para la cepa UW *ptsP*; los plásmidos pAHFUTs-B, pAHFUTs-R, pAHFUTd-B y pAHFUTd-R se sometieron a restricción con la enzima Sac I y se transformaron en la cepa UW *ptsN*.

Se aislaron clonas candidatas de cada transformación resistentes a Tc y se les hizo PCR para amplificar un fragmento del gen *Avin12230*, el tiempo de amplificación usado fue suficiente para amplificar un fragmento de 1.6 Kb en la cepa silvestre pero no para amplificar el gen con la fusión integrada en las transformantes (Fig. 23).

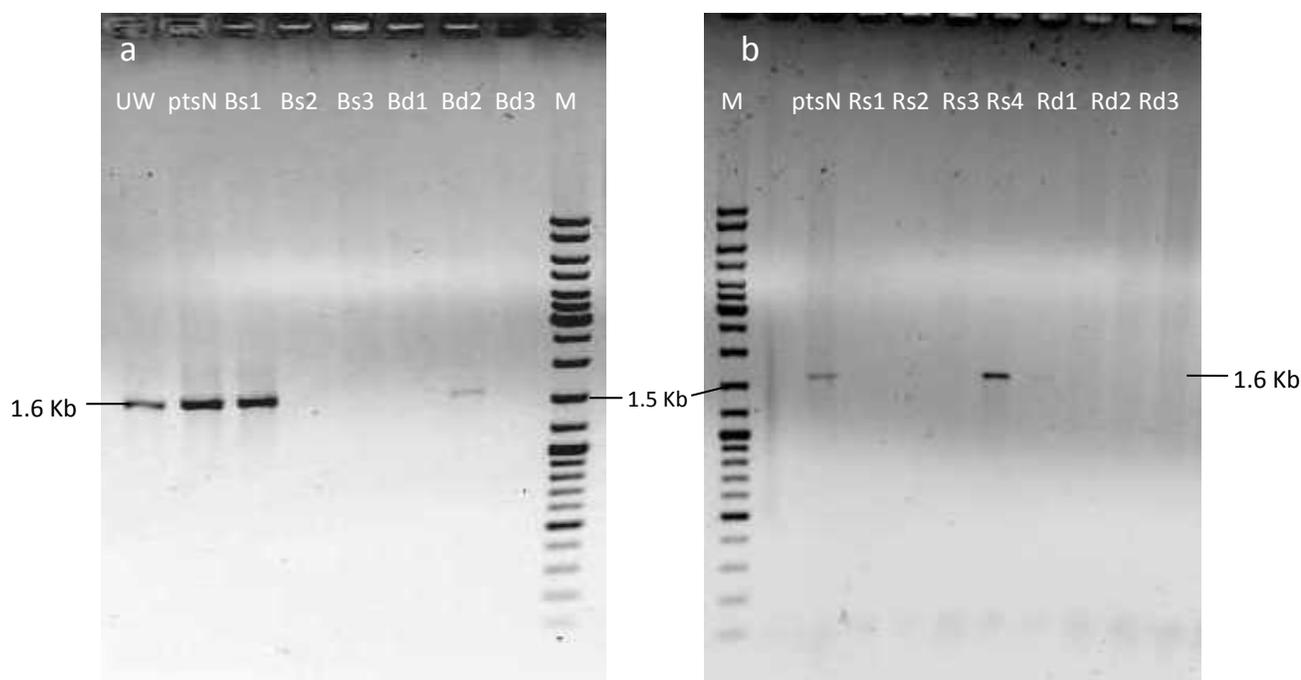


Fig. 23: PCR para verificar la ausencia de copias silvestres del gen *Avin12230* en clonas transformantes (a) UW: cepa silvestre, *ptsN*: cepa parental, Bs1-Bs3: clonas con la fusión *phbB-gusA* transcripcional, Bd1-Bd3: clonas con la fusión *phbB-gusA* traduccional, M: marcador de peso molecular, (b) M: marcador de peso molecular, *ptsN*: cepa parental, Rs1-Rs4: clonas con la fusión *phbR-gusA* transcripcional Rd1-Rd3 clonas con la fusión *phbR-gusA* traduccional.

A las clonas que no presentaron amplificado del fragmento silvestre se les hizo PCR para comprobar que efectivamente tuvieran las fusiones deseadas usando oligonucleótidos específicos para cada fusión génica (Fig. 24) (ver Tabla 3 de Materiales y Métodos).

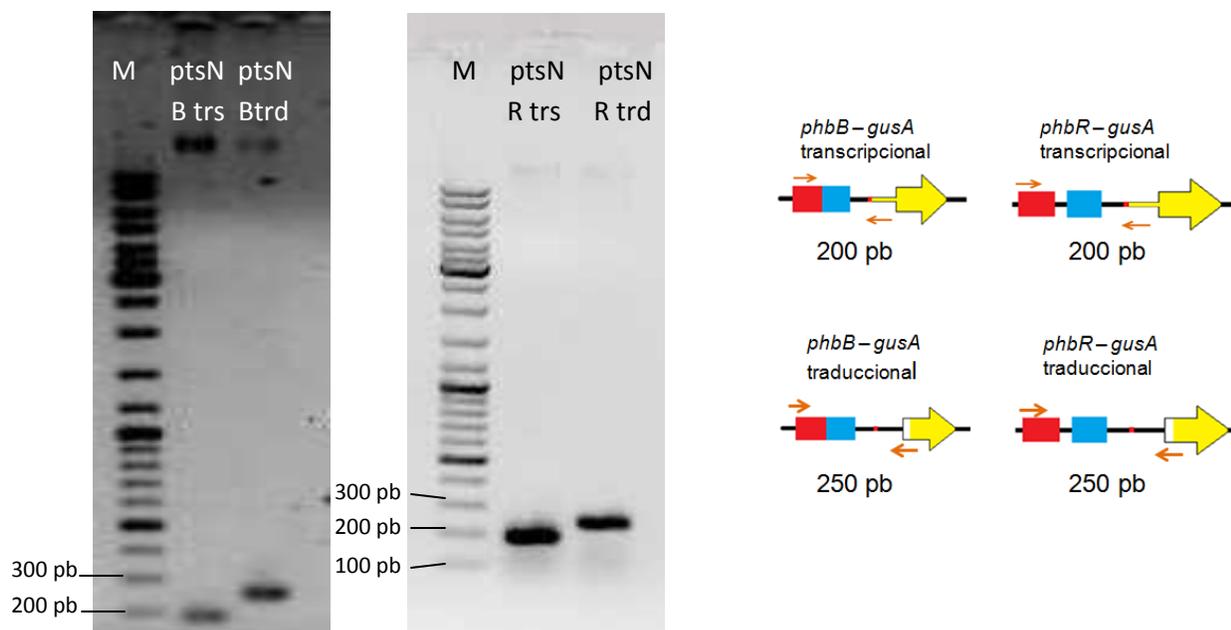


Fig. 24: PCR para confirmar la presencia de las fusiones génicas en clonas transformantes seleccionadas de la cepa UW *ptsN*; M: marcador de peso molecular, ptsN B trs: clona con la fusión *phbB-gusA* transcripcional, ptsN B trd: clona con la fusión *phbB-gusA* traduccional, ptsN R trs: clona con la fusión *phbR-gusA* transcripcional, ptsN R trd: clona con la fusión *phbR-gusA* traduccional.

De esta manera se produjeron las cepas UW *ptsN* B trans, UW *ptsN* B trad, UW *ptsN* R trans y UW *ptsN* R trad (Ver tabla 1 de Materiales y Métodos).

7.4 Cuantificación de actividad de β -glucuronidasa en las cepas portadoras de las fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR*.

Con el objeto de identificar a qué nivel lleva a cabo el sistema PTS^{Ntr} su regulación sobre los genes *phbR* y *phbB*, las cinéticas de inducción de la transcripción y traducción de *phbB* y *phbR* fueron evaluadas *in vivo* usando las cepas de *A. vinelandii* generadas que portan las fusiones transcripcionales y traduccionales de estos genes (ver Tabla 1 de Materiales y Métodos).

Para hacer esto se sembraron matraces de 250 ml con 50 ml de caldo PY-sacarosa con inoculos estandarizados de todas las cepas; los matraces se incubaron a 30° C y 200 rpm por 72 horas, cada 12 horas se tomaron muestras de los cultivos y se cuantifico la concentración de proteína total en lisado celular por el método de Lowry (Fig. 25) y la actividad específica de β -glucuronidasa (Fig. 26). Todos estos experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente entre sí.

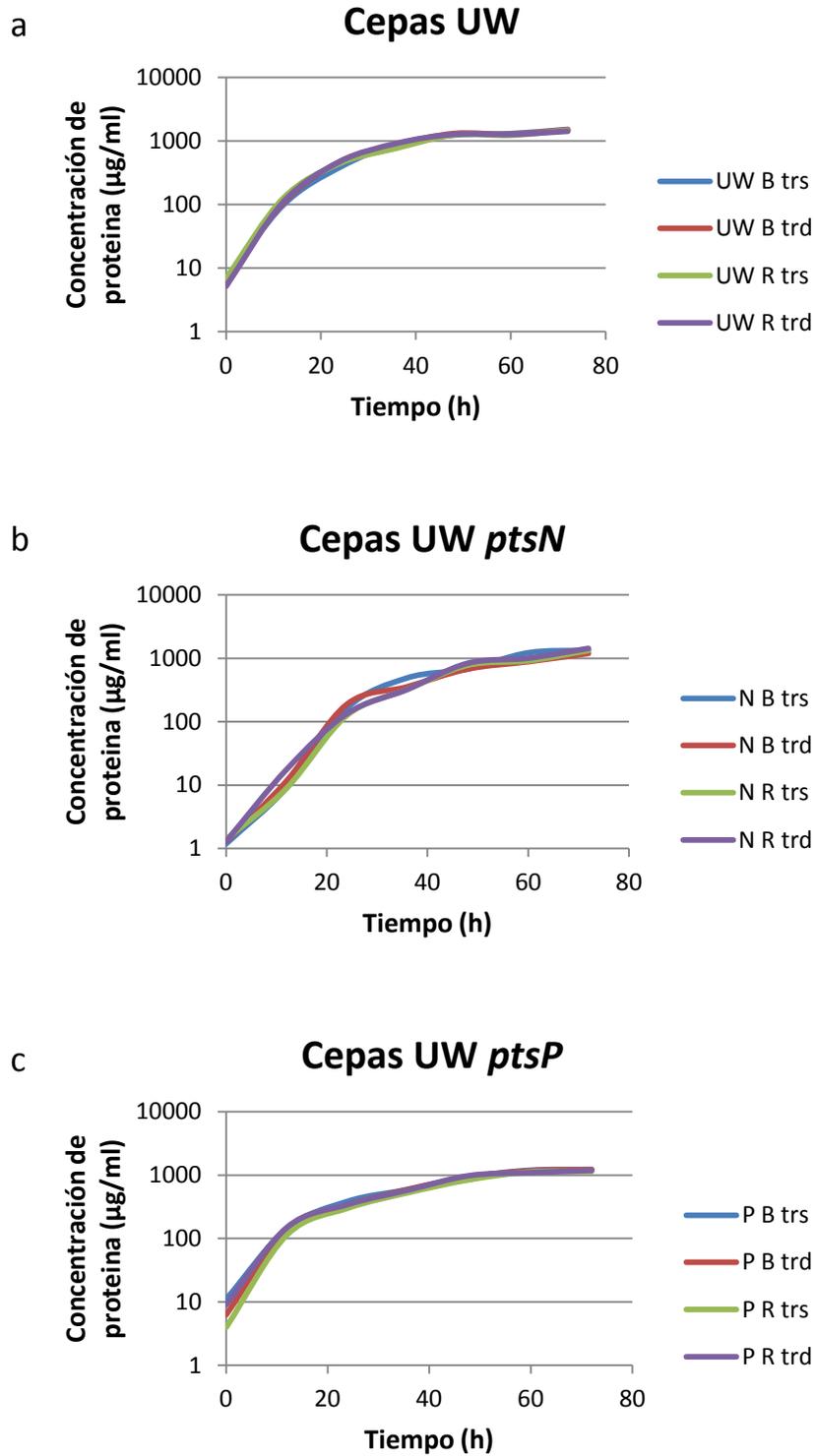


Fig. 25: Cinéticas de crecimiento de las cepas portadoras de las fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR*; para cada grafico: B trs: fusión transcripcional de *phbB*, B trd: fusión traduccional de *phbB*, R trs: fusión transcripcional de *phbR*, R trd: fusión traduccional de *phbR*. **a)** Cepas UW **b)** Cepas UW *ptsN* **c)** Cepas UW *ptsP*.

Los resultados de las cinéticas de crecimiento nos indican que la presencia de las fusiones génicas no afecta significativamente el crecimiento de las cepas monitoreadas; por lo que los resultados de actividad del reportero se deben solo a fenómenos regulatorios ejercidos sobre las fusiones.

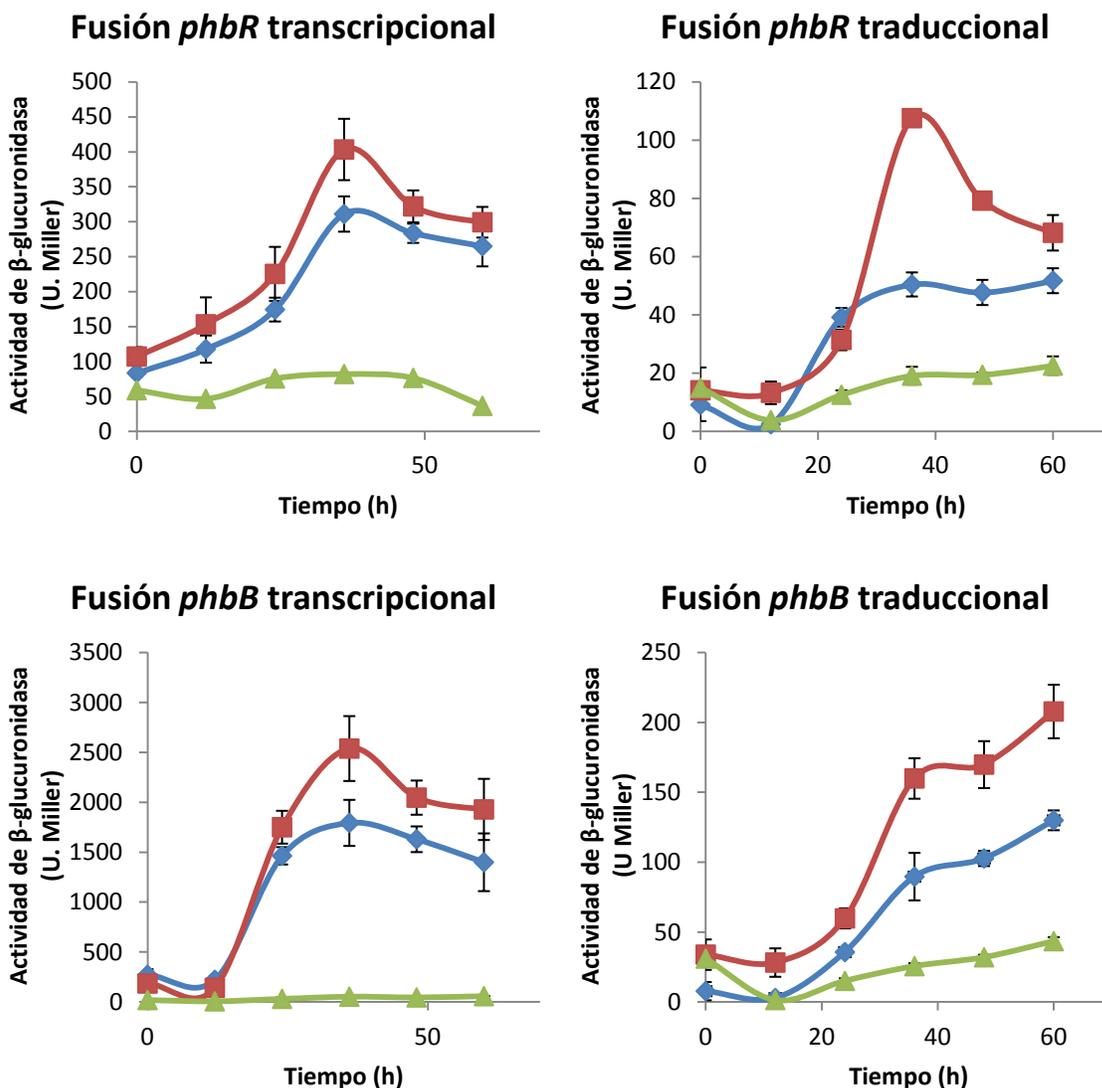


Fig. 26: Cinéticas de actividad específica de β -glucuronidasa para las cepas portadoras de las fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* y *phbR*; cepa UW (\diamond), cepa UW *ptsN* (\blacksquare), cepa UW *ptsP* (\blacktriangle).

Los resultados de la cinética de inducción de la fusión transcripcional de *phbR* en las cepas UW, UW *ptsP* y UW *ptsN* nos indican que existe una regulación negativa ejercida por la enzima IIA^{Ntr} no fosforilada sobre la transcripción de este gen; podemos ver una disminución de hasta 5 veces en la actividad del reportero en la cepa UW *ptsP* una vez que se llega a fase de crecimiento estacionario en comparación con la cepa silvestre, mientras

que la cepa UW *ptsN* presenta una actividad de β -glucuronidasa superior a la de la cepa silvestre. Con este resultado y con los antecedentes que se tienen sobre el funcionamiento del sistema PTS^{Ntr} podemos concluir que existe una regulación a nivel transcripcional sobre el gen *phbR* controlada por la enzima IIA^{Ntr} y que dicha regulación depende de la actividad de las proteínas del sistema PTS^{Ntr} que transmiten la fosforilación a IIA^{Ntr}.

Al analizar los resultados de la cinética de inducción de la fusión traduccional de *phbR* podemos ver nuevamente una disminución de la actividad del reportero en la cepa UW *ptsP* comparada con la cepa silvestre, lo cual concuerda con los efectos sobre la transcripción de *phbR* previamente observados; sin embargo, en esta cinética podemos apreciar también una mayor diferencia en los niveles de traducción de la fusión entre la cepa UW y la UW *ptsN*; este resultado sugiere que existe una regulación post-transcripcional ejercida por la enzima IIA^{Ntr}. Sin embargo, estas cinéticas no nos permiten discernir si existe dicho efecto regulador post-transcripcional sobre la expresión de *phbR* debido a que en las fusiones traducionales aun se ejercen fenómenos regulatorios transcripcionales ya que poseen la región promotora de sus respectivos genes; además, PhbR regula la transcripción de su propio gen, por lo que cualquier efecto inhibitorio sobre su transcripción se verá reflejado sobre su traducción, y así mismo cualquier efecto negativo sobre su traducción tendrá consecuencias en su propia transcripción, esta autorregulación dificulta el análisis de la cinética de la fusión traduccional de *phbR*.

Las cinéticas de inducción de las fusiones transcripcionales y traducionales de *phbB* concuerdan con los efectos observados sobre *phbR*: la transcripción de la fusión es menor en la cepa UW *ptsP* en comparación con la cepa silvestre y aumenta en la cepa UW *ptsN*; el mismo comportamiento ocurre en la traducción; estos resultados son congruentes con lo esperado debido a la regulación positiva que ejerce PhbR sobre la transcripción del operón *phbBAC*.

Debido a este efecto regulador de PhbR sobre el operón *phbBAC*, no podemos determinar si los efectos observados sobre la transcripción y traducción de dicho operón en las mutantes UW *ptsP* y UW *ptsN* se deben a una regulación directa sobre los genes biosintéticos de PHB por parte de la proteína IIA^{Ntr} o bien son solo consecuencia de su regulación sobre *phbR*.

7.5 Construcción de una fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA*.

Con el objeto de determinar si la proteína IIA^{Ntr} ejerce también un efecto regulador sobre la traducción de *phbR*, se decidió hacer una fusión traduccional de este gen cuya transcripción estuviese controlada por un promotor diferente al del propio gen *phbR*; para este propósito se decidió utilizar el promotor del gen *gyrA* de *A. vinelandii*.

Esta fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* se construyó a partir de la fusión traduccional *phbR-gusA* del plásmido pAHFUTd-R. Se hizo PCR reversa con este vector para eliminar la región promotora del gen *phbR*. En la Fig. 27 se representa la fusión traduccional de *phbR*, en texto azul claro se muestra un fragmento del gen Avin12230; en texto rojo esta la región promotora, región 5' no traducida y los primeros 4 codones del gen *phbR*, resaltando en texto negro las cajas -10 de sus dos promotores y 2 regiones Shine-Dalgarno putativas; en codones azul oscuro está representado el gen reportero *gusA*; las flechas negras sobre texto subrayado representan los oligonucleótidos utilizados en la PCR reversa.



Fig: 27: Secuencia de la región promotora de la fusión traduccional *phbR-gusA*.

Al producto de PCR reversa que contiene el plásmido pAHFUTd-R sin el promotor de *phbR* se le ligó la región promotora del gen *gyrA*, la cual fue amplificada previamente mediante PCR, produciéndose así el plásmido pRGFTdgyrA-R. La Fig. 28 representa la fusión híbrida: se muestra en texto azul claro el fragmento del gen Avin12230; en texto verde el promotor del gen *gyrA*, resaltando las cajas putativas -35 y -10; el texto rojo corresponde a la región 5' no traducida del gen *phbR* con sus primeros 4 codones y en codones azules parte del gen reportero *gusA*.

GATGGCCCGGCCGATGCCGCGGGTACCGCCGGTGACCGTACGTTTCGGTTCGTCATCTAGAGCGGCAGCAGGCCTCGGCAGGGGCGGGCCGGCGCGGCTTC
 CTACCGGGCCGGCTACGGCGCCCATGGCGGCCACTGGTCATGCAAGCCCAAGACGTAGATCTCGCCGTCGTCGGAGCCGTCGCCGCCGCGCCGCAAG
 CGGCCTCCGCTCGCCGCGTACGGCGTGCAGCCGGCGGTGGCTCCCC**TGTGTT**ACCATTCCGCGCTTAAACGCAGGACTGCTGACG**cacatgcgttt**
 GCCGGAGGCGAGCGCGCATGCCG**CACGTC**GGCCGCCACCGAGGGG**CACAAT**GGTAAGGCGCGAATTTGCGTCTGTGACGACTGC**gtgtacgcaaa**
ggtttcttggcccatggaagagagcgcgaaaaaggaat atg ttt aca gtc CTG CAG CTG GAT ATC GAA ACC CCA ACC
ccaagaaccgggtaccttctctcgcgctttt**ccta** tac aaa tgt cag GAC GTC GAC CTA TAG CTT TGG GGT TGG
 ▶Met Phe Thr Val Leu Gln Leu Asp Ile Glu Thr Pro Thr
 CGT GAA ATC AAA AAA CTC GAC GGC CTG TGG GCA TTC AGT CTG GAT CGC GAA AAC TGT GGA ATT GAT CAG CGT TGG TGG
 GCA CTT TAG TTT TTT GAG CTG CCG GAC ACC CGT AAG TCA GAC CTA GCG CTT TTG ACA CCT TAA CTA GTC GCA ACC ACC
 ▶Arg Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu Asn Cys Gly Ile Asp Gln Arg Trp Trp
 GAA AGC GCG TTA CAA GAA AGC CGG GCA ATT GCT GTG CCA GGC AGT TTT AAC GAT CAG TTC GCC GAT GCA GAT ATT CGT
 CTT TCG CGC AAT GTT CTT TCG GCC CGT TAA CGA CAC GGT CCG TCA AAA TTG CTA GTC AAG CGG CTA CGT CTA TAA GCA
 ▶Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala Asp Ile Arg
 AAT TAT GCG GGC AAC GTC TGG TAT CAG CGC GAA GTC TTT ATA CCG AAA GGT TGG GCA GGC CAG CGT ATC
 TTA ATA CGC CCG TTG CAG ACC ATA GTC GCG CTT CAG AAA TAT GGC TTT CCA ACC CGT CCG GTC GCA TAG
 ▶Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile

Fig. 28: Secuencia de la región promotora de la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA*.

Se comprobó la correcta construcción de este plásmido mediante PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* (Fig. 29) (ver Tabla 3 de Materiales y Métodos) y mediante patrón de restricción con la enzima *SacI*, donde se observaron 2 bandas de tamaños esperados: una de 5 Kb correspondiente a la fusión génica con su cassette de resistencia y otra de 3 Kb correspondiente al resto del vector pRGFTdgyrA-R.

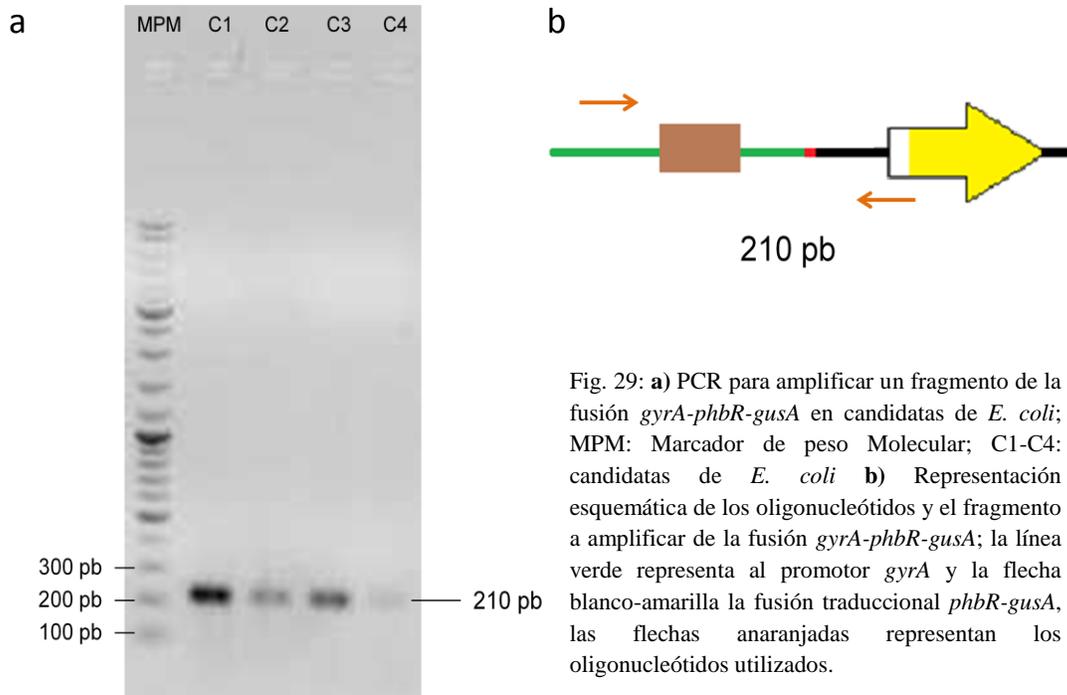


Fig. 29: a) PCR para amplificar un fragmento de la fusión *gyrA-phbR-gusA* en candidatas de *E. coli*; MPM: Marcador de peso Molecular; C1-C4: candidatas de *E. coli* b) Representación esquemática de los oligonucleótidos y el fragmento a amplificar de la fusión *gyrA-phbR-gusA*; la línea verde representa al promotor *gyrA* y la flecha blanco-amarilla la fusión traduccional *phbR-gusA*, las flechas anaranjadas representan los oligonucleótidos utilizados.

7.6 Transformación de la fusión traduccional híbrida en las cepas UW y UW *ptsP*.

El plásmido pRGFTdgyrA-R fue digerido con la enzima SacI y transformado en las cepas UW y UW *ptsP*.

Se aislaron clonas candidatas de cada transformación resistentes a Sp; para comprobar la presencia de la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA*, se hizo PCR para amplificar un fragmento del gen Avin12230; el tiempo de amplificación usado fue suficiente para amplificar un fragmento de 1.6 Kb en las cepas parentales pero no para amplificar el gen con la fusión integrada en las transformantes (Fig. 30).

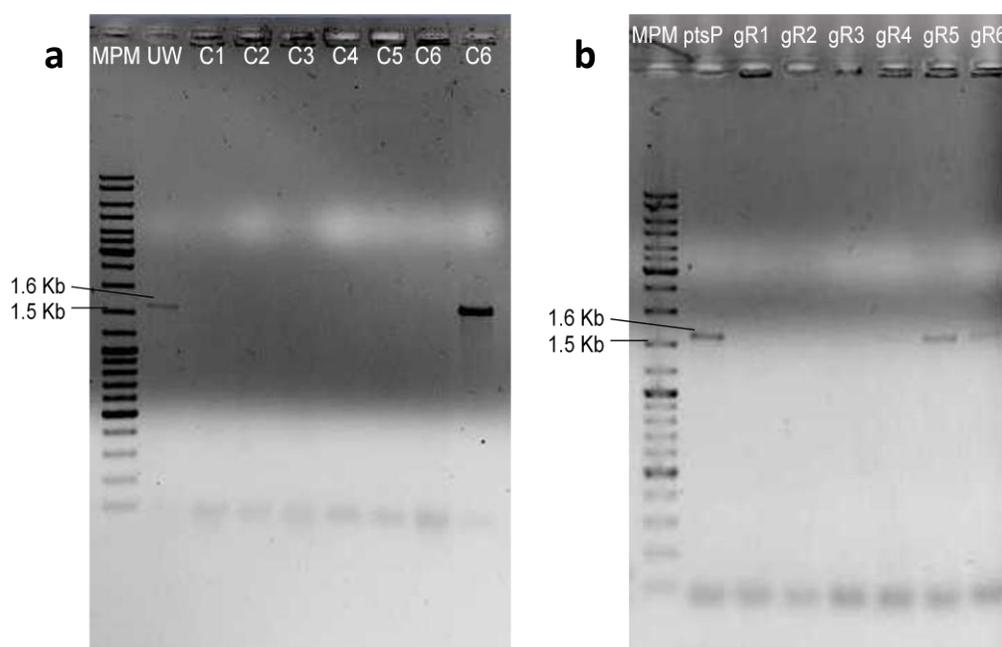


Fig. 30: PCR para amplificar el gen silvestre Avin12230 en candidatas de *A. vinelandii*. **a)** MPM: Marcador de peso molecular; UW: cepa parental; C1-C6: Candidatas de la cepa UW. **b)** MPM: Marcador de peso molecular; *ptsP*: cepa parental; gR1-gR6: Candidatas de la cepa UW *ptsP*.

A las clonas que no amplificaron el fragmento silvestre se les hizo PCR para comprobar que efectivamente tuvieran la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* usando oligonucleótidos específicos para esta fusión génica (Fig. 31).

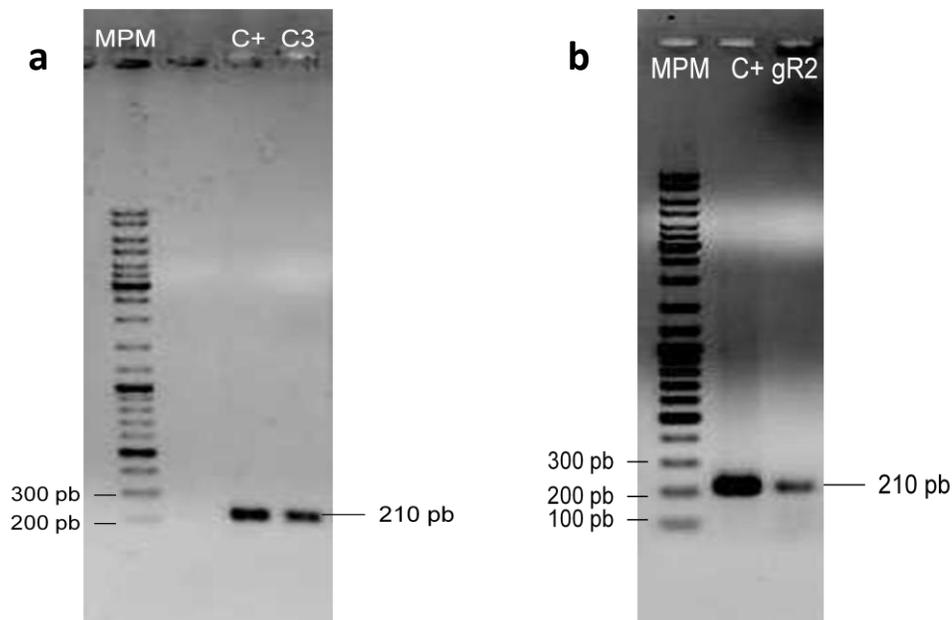


Fig. 31: PCR para comprobar la presencia de la fusión *gyrA-phbR-gusA* en candidatas de *A. vinelandii* **a**) MPM: marcador de peso molecular; C+: reacción de control positivo; C3: clona candidata UW **b**) MPM: marcador de peso molecular; C+: reacción de control positivo; gR2: clona candidata UW *ptsP*.

De esta manera se produjeron las cepas UW *gyrA-R-gusA* y UW *ptsP gyrA-R-gusA* (Ver tabla 1 de Materiales y Métodos).

7.7 Cuantificación de actividad de β -glucuronidasa en las cepas portadoras de la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA*.

Con el objeto de determinar si el sistema PTS^{Ntr} ejerce un efecto regulador post-transcripcional sobre el gen *phbR*, las cinéticas de la traducción de *phbR* fueron evaluadas *in vivo* usando las cepas de *A. vinelandii* generadas que portan la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* (ver Tabla 1 de Materiales y Métodos).

Para hacer esto se sembraron matraces de 250 ml con 50 ml de caldo BS con inoculos estandarizados de ambas cepas; los matraces se incubaron a 30° C y 200 rpm por 48 horas y se tomaron alícuotas cada 6 horas durante las primeras 24 horas de cultivo y posteriormente cada 12 horas. Con las muestras obtenidas se cuantificó la concentración de proteína total en lisado celular por el método de Lowry (Fig. 32) y actividad específica de β -glucuronidasa (Fig. 33). Todos estos experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente entre sí.

Cepas portadoras de la fusión traduccional híbrida

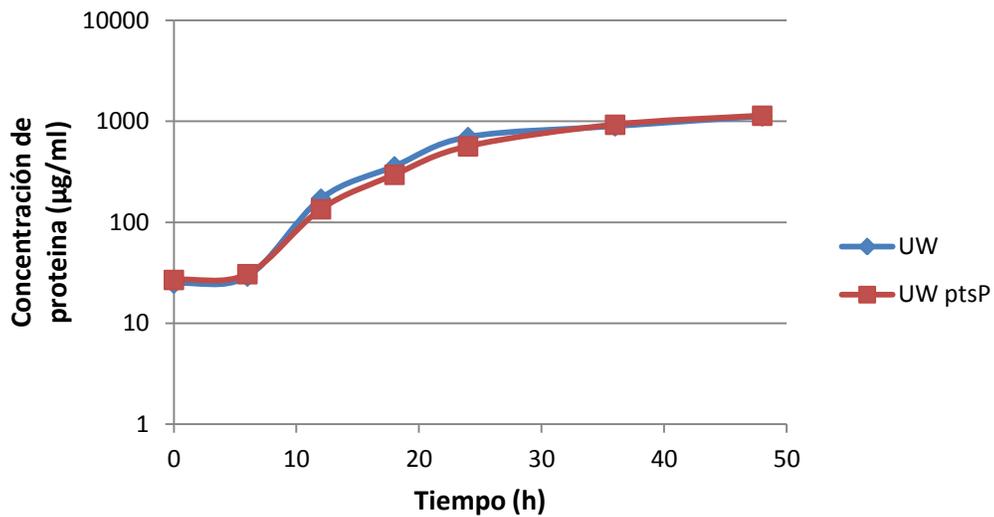


Fig. 32: Cinética de crecimiento de las cepas portadoras de la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA*.

Los resultados de las cinéticas de crecimiento nos indican que la presencia de la fusión traduccional híbrida no afecta significativamente el crecimiento de las cepas monitoreadas; por lo que los resultados de actividad del reportero se deben solo a fenómenos regulatorios ejercidos sobre la fusión.

Fusión *gyrA-phbR-gusA* traduccional

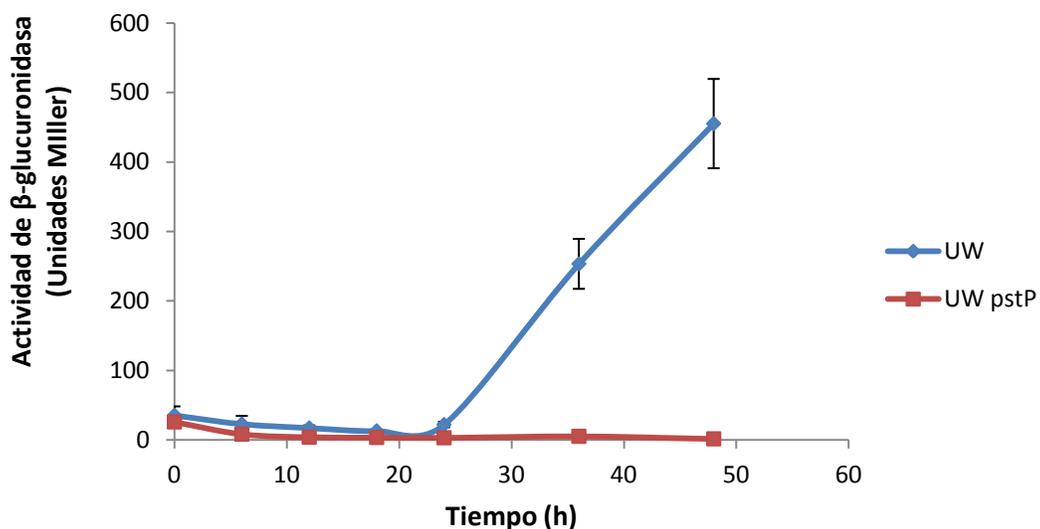


Fig. 33: Cinética de actividad específica del gen reportero (β -glucuronidasa) de las cepas portadoras de la fusión traduccional *gyrA-phbR-gusA*.

En las cinéticas de actividad de β -glucuronidasa podemos observar una clara diferencia en la traducción de la fusión *gyrA-phbR-gusA* entre las cepas UW y UW *ptsP*. Esto nos sugiere que además de la regulación a nivel transcripcional, existe también un mecanismo de regulación post-transcripcional sobre el gen *phbR* que esta mediado por la proteína IIA^{Ntr} y que depende de la actividad de las proteínas del sistema PTS^{Ntr} que transmiten la fosforilación a IIA^{Ntr}.

Debido a que la fusión híbrida *gyrA-phbR-gusA* está diseñada solamente para monitorear diferencias en su traducción en las cepas estudiadas, cabía la posibilidad de que las diferencias observadas en la actividad del reportero se debieran a efectos regulatorios ejercidos sobre la transcripción de la fusión; es decir, que el sistema PTS^{Ntr} llevara a cabo algún efecto inhibitorio sobre la transcripción a partir del promotor *gyrA*; si esto fuera cierto, las diferencias observadas en la actividad de β -glucuronidasa podrían deberse a dicha inhibición y no a un efecto de regulación post-transcripcional.

7.8 Medición de la transcripción de la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* en las cepas UW y UW *ptsP*.

Con el fin de determinar si la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* se transcribe eficientemente en las cepas UW *gyrA-R-gusA* y UW *ptsP gyrA-R-gusA* portadoras de dicha fusión, se decidió comparar los niveles de RNA mensajero (transcrito) de la fusión *gyrA-phbR-gusA* en dichas cepas mediante RT-qPCR.

Para hacer esto se sembraron matraces de 250 ml con 50 ml de caldo BS con inoculos estandarizados de ambas cepas; los matraces se incubaron a 30° C y 200 rpm por 48 horas, a las células obtenidas se les extrajo RNA total y a partir de ellos se sintetizo cDNA mediante el Revert Aid[®] H First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Inc.), los cDNAs se utilizaron para hacer PCR cuantitativa mediante el LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) usando LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) (Fig. 34).

Expresión Relativa de *gyrA-phbR-gusA*

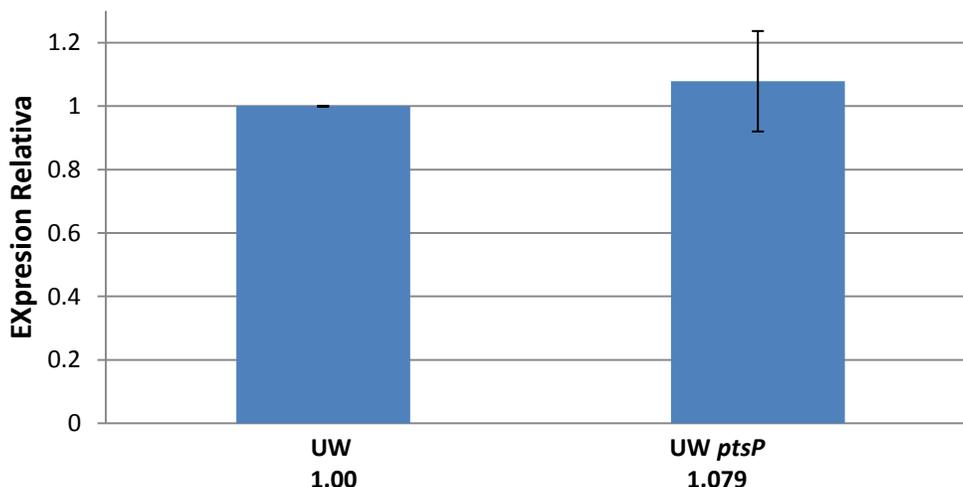


Fig. 34: Expresión relativa de la fusión traduccional híbrida en las cepas UW y UW *ptsP*.

Este resultado indica que si se lleva a cabo la transcripción de la fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* a niveles similares tanto en la cepa UW como en la UW *ptsP*.

La fusión traduccional híbrida *gyrA-phbR-gusA* fue construida para evitar el efecto del ciclo de autorregulación de PhbR; los resultados de la cinética de inducción de esta fusión indican que existe una regulación a nivel post-transcripcional ejercida por la enzima IIA^{Ntr} sobre el gen *phbR*. Los resultados de RT-qPCR para cuantificar los transcritos de esta fusión en las cepas UW y UW *ptsP* apoyan esta afirmación, pues comprobamos que la fusión se transcribe a niveles similares en ambas cepas y las diferencias observadas en la traducción solo se deben a efectos regulatorios ejercidos sobre la región 5' no traducida de su mensajero, la cual corresponde a *phbR*.

7.9 Modelo de Regulación.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un modelo de regulación en el cual la enzima I^{Ntr} se autofosforila usando fosfoenolpiruvato, la fosforilación es transmitida a la enzima Npr y esta a su vez la transmite a IIA^{Ntr}; la enzima IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada ejerce una regulación negativa tanto sobre la transcripción como la traducción de *phbR* y, como consecuencia, sobre la expresión de los genes *phbBAC* (Fig. 35)

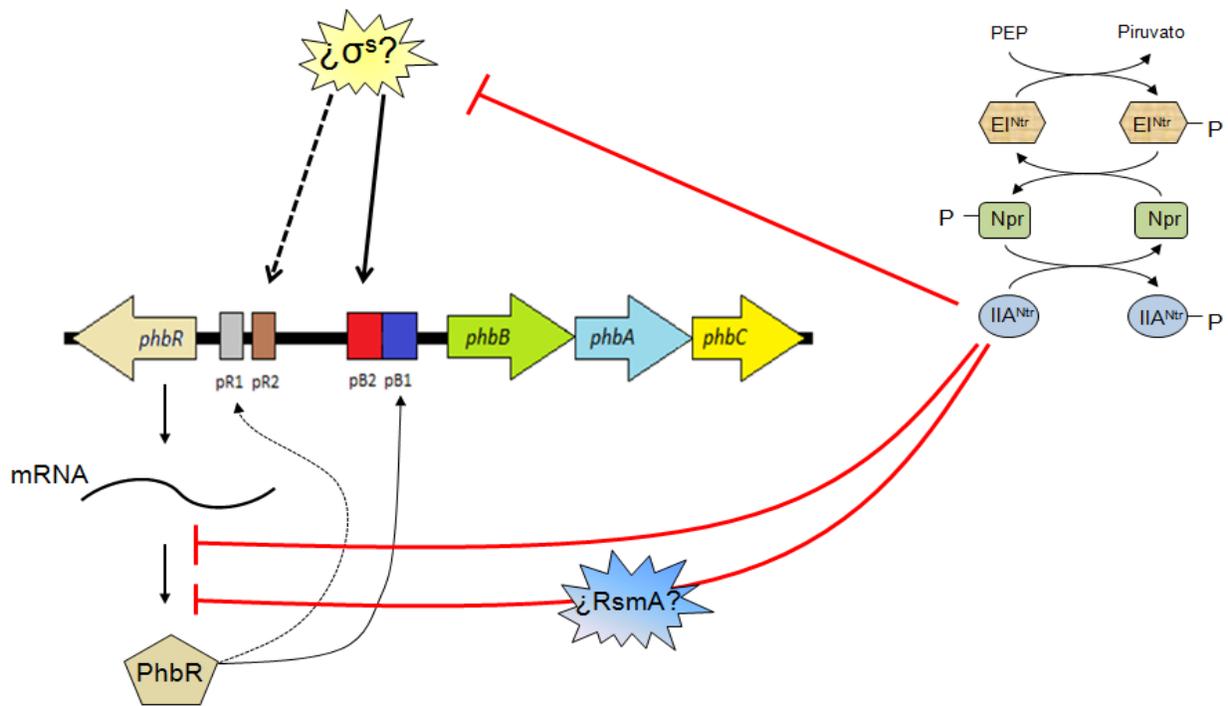


Fig. 35: Modelo propuesto para la regulación de la expresión de *phbR* y *phbBAC* por el sistema PTS^{Ntr} en *Azotobacter vinelandii*

Debido a que IIA^{Ntr} no posee dominios conocidos de unión a DNA, la inhibición que ejerce sobre la transcripción de *phbR* debe ser indirecta; proponemos que el intermediario que media esta regulación podría ser el factor transcripcional σ^S , se sabe que este factor activa la transcripción de *phbR* a partir del promotor pR1 (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011), por lo que es un buen candidato para funcionar como el intermediario entre IIA^{Ntr} y *phbR*; esta propuesta esta además apoyada por evidencia que se ha obtenido en el laboratorio recientemente y que sugiere que la enzima IIA^{Ntr} no fosforilada promueve la degradación del factor transcripcional σ^S .

En cuanto a la regulación a nivel post-transcripcional, esta podría llevarse a cabo tanto directa como indirectamente; se hizo una búsqueda de homología a proteínas y predicción de estructuras mediante el algoritmo HHpred del Instituto Max Planck para la Biología del Desarrollo (HHpred, 2005) usando la secuencia de la proteína IIA^{Ntr} de *A. vinelandii* (Fig. 36).

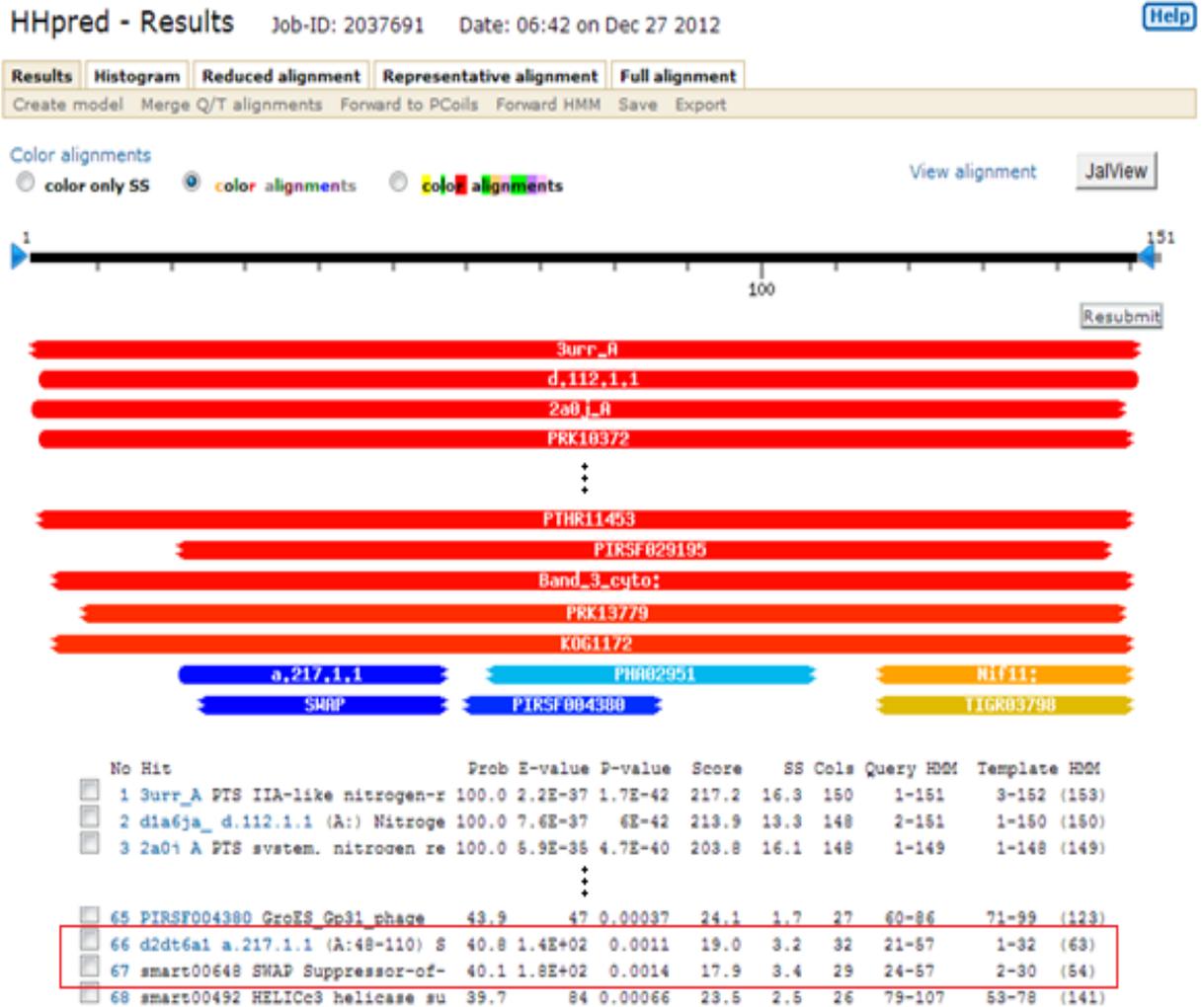


Fig. 36: Resultado de búsqueda de HHpred para la secuencia de la enzima IIA^{Ntr} de *A. vinelandii*.

El algoritmo HHpred realiza su comparación revisando fragmentos pequeños de la secuencia proporcionada y comparando estos fragmentos con motivos de proteínas conocidas, los primeros resultados obtenidos indican naturalmente una alta homología a otras proteínas IIA^{Ntr} reportadas en otros organismos y a proteínas IIA de sistemas PTS de carbono, sin embargo, se obtuvieron también homologías con 2 dominios de proteínas involucradas en procesamiento de RNA: la primera, anotada como a.217.1.1 en el RCSB Protein Databank, con la cual presenta una homología del 40.76% y que esta reportada como la subunidad 1 del factor 3 de splicing de RNA en humano y la segunda, anotada como domino SWAP de reguladores de splicing de RNA, con la cual presenta una homología del 40.14%. Esta primera revisión bioinformática sugiere que la proteína IIA^{Ntr} podría ser capaz de interactuar directamente con mRNAs.

La regulación post-transcripcional de *phbR* por la enzima IIA^{Ntr} también podría llevarse a cabo de manera indirecta; se ha reportado recientemente la interacción entre la enzima IIA^{Ntr} y proteínas reguladoras como cinasas histidínicas (Lüttmann *et al.*, 2012; Lüttmann *et al.*, 2009), transportadores (Lee *et al.*, 2007) y enzimas de metabolismo central (Pflüger-Grau *et al.*, 2011), una primera hipótesis es que la enzima IIA^{Ntr} no fosforilada podría estar regulando de manera positiva la actividad de RsmA, la cual es un inhibidor post-transcripcional conocido de *phbR* en *A. vinelandii*.

En cualquier caso, es aun necesario investigar el mecanismo por el cual la enzima IIA^{Ntr} no fosforilada ejerce su regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional sobre *phbR* y, en consecuencia, sobre la expresión del operón biosintético *phbBAC*

VIII. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

- La enzima IIA^{Ntr} regula negativamente la transcripción del gen *phbR* de *Azotobacter vinelandii*. Esta regulación depende de la actividad de las proteínas del sistema PTS^{Ntr} que transmiten la fosforilación a IIA^{Ntr}.
- La enzima IIA^{Ntr} no fosforilada regula negativamente la traducción del gen *phbR* de *Azotobacter vinelandii*. Esta regulación depende de la actividad de las proteínas del sistema PTS^{Ntr} que transmiten la fosforilación a IIA^{Ntr}.
- El trabajo realizado permitió proponer un modelo de la regulación del sistema PTS^{Ntr} sobre la expresión de *phbR* y *phbB* donde se representan los niveles a los cuales se lleva a cabo dicha regulación, así como proponer posibles intermediarios que participen en esta regulación.

IX. PERSPECTIVAS

Se sugieren las siguientes perspectivas para continuar con la investigación del mecanismo de regulación de la enzima IIA^{Ntr} sobre el gen *phbR*:

- Investigar si la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con el factor transcripcional σ^S mediante coimmunoprecipitación o ensayos de doble híbrido.
- Hacer ensayos tipo EMSA entre el líder de *phbR* y la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada.
- Buscar posibles intermediarios que regulen la traducción de *phbR* mediante una interacción con la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada.
- Analizar el estado de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr} para comprobar el funcionamiento del sistema PTS^{Ntr}.

X. BIBLIOGRAFIA

1. **Aarons S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, and F. O'Gara.** 2000. A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*. 14: 3913-3919.
2. **Anderson A. J. and E. A. Dawes.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*. 54: 450-472.
3. **Barabote R. D. and M. H. Saier Jr.** 2005. Comparative genomic analysis of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 608-634.
4. **Cases I., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo.** 1999. The IIA^{Ntr} (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the σ^{54} -dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 1032-1037.
5. **Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno and G. Espín.** 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -Hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 182: 2624-2628.
6. **Dawes, E. A.** 1990. Novel microbial polymers: an introductory overview. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers* ed. Dawes, E. A. 3-16. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
7. **Espin G.** 2003. *Biología de Azotobacter vinelandii*. IBT-UNAM. Available from: <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/>.
8. **Fellay R., J. Frey and H. Krisch.** 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gramnegative bacteria. *Gene*. 52: 47-54.
9. **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*. *Microbial Cell Factories*. 6:7
10. **Grage K., J. A. Parlane, N. Palanisamy, R. Rasiah, I. A. Atwood and J. A. Rehm.** 2009. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*. 10: 660-9.
11. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 166: 557-580.
12. **Heeb S. and D. Haas.** 2001. Review: Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14: 1351-1363.
13. **Hernandez-Eligio A., M. Castellanos, S. Moreno and G. Espín.** 2011. Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiology*. 157: 3014-3023.
14. **Hernandez-Eligio A., S. Moreno, M. Castellanos, M. Castañeda, C. Nuñez, L. F. Muriel-Millan and G. Espin.** 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR

- expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 158: 1956-1963.
15. **HHpred: Söding, J.** 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21: 951-960.
 16. **Higa F. and P.H. Edelstein.** 2001. Potential virulence role of the *Legionella pneumoniae* *pstP* ortolog. *Infection and Immunity*. 69: 4782-4789.
 17. **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. *Molecular Microbiology*. 67: 241-253.
 18. **Lee C. R., B. M. Koo, S. H. Cho, Y. J. Kim, M. J. Yoon, A. Peterkofsky and Y. J. Seok.** 2005. Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Molecular Microbiology*. 58: 334-344.
 19. **Lee C.R., S. H. Cho, M. J. Yoon, A. Peterkofski and Y.J. Seok.** 2007. *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 4124-4129
 20. **Lüttmann D., Y. Göpel and B. Görke.** 2012. The phosphotransferase protein EIIANtr modulates the phosphate starvation response through interaction with histidine kinase PhoR in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 86(1): 96–110.
 21. **Lüttmann D., R. Heermann, B. Zimmer, A. Hillmann, I. S. Rampp, K. Jung and B. Görke.** 2009. Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 72(4): 978–994
 22. **Madison L. L. and G. W. Huisman.** 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxialkanoates): from DNA to plastic. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* March, 21-53.
 23. **Manchak, J. and W. J. Page.** 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology*. 140: 953-963.
 24. **Manzo J., M. Cocotl-Yañez, T. Tzontecomani, V. M. Martínez, R. Bustillos, C. Velásquez, Y. Goiz, Y. Solís, L. López, L. E. Fuentes, C. Nuñez, D. Segura, G. Espín and Castañeda M.** 2011. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 21(3-4): 147-59.
 25. **Merrick M.J., J. R. Coppard.** 1989. Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding σ^{54}) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from σ^{54} -dependent promoters. *Molecular Microbiology*. 3: 1765–1775.
 26. **Michiels P, T. Van Soom, I. D’Hooghe, B. Dombrecht, T. Benhassine, P. de Wilde and J. Vanderleyden.** 1998. The *Rhizobium etli* *rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN* , *ptsN* and *ptsA* mutants. *Journal of Bacteriology*. 180: 1729–1740.
 27. **Nagpal, P., S. Jafri, M. A. Reddy and H. K. Das.** 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 171: 3133-3138.
 28. **Noguez, R., D. Segura, S. Moreno, A. Hernandez, K. Juarez and G. Espin.** 2008. Enzyme I^{Ntr} , NPr and IIA^{Ntr} Are Involved in Regulation of the Poly- β -

- Hydroxybutyrate Biosynthetic Genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15: 244-254.
29. **Peralta-Gil M., D. Segura, J. Guzman, L. Servin-Gonzalez and G. Espin.** 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. *Journal of Bacteriology*. 184(20): 5672-7.
 30. **Pessi, G., F. Williams, Z. Hindle, K. Heurlier, M. T. G. Holden, M. Cámara, D. Haas D and P. Williams.** 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 183: 6676-6683.
 31. **Pflüger-Grau K., M. Chavarría and V. de Lorenzo.** 2011. The interplay of the EIIA^{Ntr} component of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) of *Pseudomonas putida* with pyruvate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810: 995–1005
 32. **Powell B.S., D. L. Court, T. Inada, Y. Nakamura, V. Michotey, X. Cui, A. Reizer, M. H. Saier, A. Pries, N. Priefert, H. Krüger and A. Steinbüchel.** 1995. Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(β-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to the *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 173: 5843-5853.
 33. **Rabus R., J. Reizer, I. T. Paulsen and M. H. Saier Jr.** 1999. Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*: A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 26185–26191.
 34. **Romeo T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology* 29: 1321-30.
 35. **Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*. 39: 516-539.
 36. **Segura D. and G. Espín.** 1998. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-β-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 180: 4790–4798.
 37. **Segura D. and G. Espín.** 2004. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-β-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 414-418
 38. **Segura D., O. Vite, Y. Romero, S. Moreno, M. Castañeda and G. Espin.** 2009. Isolation and Characterization of *Azotobacter vinelandii* Mutants Impaired in Alkylresorcinol Synthesis: Alkylresorcinols Are Not Essential for Cyst Desiccation Resistance. *Journal of Bacteriology*. May 3142–3148
 39. **Segura D., J. Guzmán and G. Espín.** 2003. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-β-hydroxybutyrate or alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 159-163
 40. **Segura D., T. Cruz and G. Espin.** 2003. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology*. 179: 437-43.

41. Senior P.J. and E. A. Dawes. 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutirate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry Journal*. 134: 225-238
42. Setubal J. C., P. dos Santos, B. S. Goldman, H. Ertesvåg, G. Espin, L. M. Rubio, S. Valla, N. F. Almeida, D. Balasubramanian, L. Cromes, L. Curatti, Z. Du, E. Godsy, B. Goodner, K. Hellner-Burris, J. A. Hernandez, K. Houmiel, J. Imperial, C. Kennedy, T. J. Larson, P. Latreille, L. S. Ligon, J. Lu, M. Maerk, N. M. Miller, S. Norton, I. P. O'Carroll, I. Paulsen, E. C. Raulfs, R. Roemer, J. Rosser, D. Segura, S. Slater, S. L. Stricklin, D. J. Studholme, J. Sun, C. J. Viana, E. Wallin, B. Wang, C. Wheeler, H. Zhu, D. R. Dean, R. Dixon, and D. Wood. 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*. 191: 4534-4545.
43. Sonnleitner, E and D. Haas. 2011. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91: 63-79.
44. Tan M.W., L. G Rahme, J. A. Sternberg, R. G. Tomkins and F. M. Ausebel. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 2408-2413.
45. Verlinden R. A., D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams and I. Radecka. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1437-49.
46. Zimmer B., A. Hillman and B. Gorke. 2008. Requirements for the phosphorylation of the *Escherichia coli* EIIA^{Ntr} protein in vivo. *FEMS Microbiology Letters*. 286: 96-102.
47. Zinn M. and Egli T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53: 5-21.