



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EI SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASA ASOCIADO A
NITRÓGENO (PTS^{Ntr}) Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA
SÍNTESIS DE POLI-B-HIDROXIBUTIRATO Y
ALQUILRESORCINOLES EN *Azotobacter vinelandii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

LUIS FELIPE MURIEL MILLÁN

TUTOR PRINCIPAL

Dra. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO.
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guadalupe Espín por su excelente tutoría, apoyo y confianza.

A los integrantes del comité tutorial, la Dra. Gloria Soberón y el Dr. Victor Bustamante; por sus observaciones y sugerencias para la realización del presente trabajo.

Al jurado conformado por: Dr. David René Romero Camarena, Dra. Claudia Martínez Anaya, Dr. Christian Sohlenkamp, Dra. Rosa María Gutiérrez y Dr. Guillermo Gosset Lagarda; por la revisión de tesis y sus comentarios para la culminación del presente trabajo.

A Soledad Moreno por su gran apoyo en la parte experimental de este trabajo.

A todos los integrantes del grupo de la Dra. Espín: Cinthia Núñez, Daniel Segura, Josefina Guzmán, Leidy, Elva, Julieta, Libertad, Claudia, Adán, Leonel y Jose Luis. También a los que pertenecieron al grupo: Mildred, Miguel Cocotl, Armando, Jose Alberto, Pablo y Yanet.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) y CONACyT por el apoyo económico recibido.

DEDICATORIA

A mi hija Itzel y a mi esposa Leidy, quienes me han dado todo su amor.

A mi madre Luz Dary y hermanos Diana y Carlos; por su apoyo incondicional.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
1.2 Biosíntesis de poli- β -hidroxibutirato en <i>A. vinelandii</i>	4
1.2.1 Regulación genética de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	6
1.3 Biosíntesis de alquilresorcinoles en <i>A. vinelandii</i>	7
1.3.1 Regulación genética de la síntesis de ARs en <i>A. vinelandii</i>	7
1.4 Sistema fosfoenolpiruvato: fosfotransferasa de carbohidratos (PTS).....	8
1.5 PTS asociado a nitrógeno (PTS ^{Ntr}).....	10
1.6 Proteasas ClpAP y ClpXP.....	14
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	17
2.1 PTS ^{Ntr} controla la síntesis de PHB y ARs en <i>A. vinelandii</i>	17
2.2 El complejo ClpAP y PTS ^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.....	19
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo General.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	22
5.2 Condiciones de crecimiento.....	28
5.3. Procedimientos con ácidos nucleicos.....	29
5.4 Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de <i>arsA</i> y <i>arpR</i>	29

5.5 Construcción del plásmido pBpgyA-arpR para la expresión de arpR independiente de RpoS.	30
5.6 Medición de los niveles de transcritos de arsA y arpR por PCR en tiempo real.	30
5.7 Complementación de la mutación en clpP.	31
5.8 Construcción de mutantes en clpX y clpS.	32
5.9 Expresión y purificación de RpoS de A. vinelandii.	32
5.10 Producción de antisuero anti-RpoS en conejo.	33
5.11 Determinación de niveles y estabilidad de RpoS por Western-blot.	34
5.12 Ensayo de dos híbridos en Escherichia coli para la determinación de interacción entre EIIA ^{Ntr} y RpoS.	34
5.13 Cuantificación de poli-β-hidroxibutirato y alquilresorcinoles.	35
CAPÍTULO 6. RESULTADOS.	37
6.1 Caracterización del efecto de PTS ^{Ntr} sobre la síntesis de ARs en A. vinelandii.	37
6.1.1 Efecto de las mutaciones en los genes pts sobre la síntesis de ARs.	37
6.1.2 Efecto de las mutaciones en los genes pts sobre la expresión de arsA.	37
6.1.3 Efecto de las mutaciones en los genes pts sobre la expresión de arpR.	39
6.1.4 La mutación H68A en el sitio de fosforilación de EIIA ^{Ntr} disminuye la transcripción de arpR.	40
6.1.5 La poza de acetoacetyl-CoA en A. vinelandii no es afectada por EIIA ^{Ntr} no fosforilada.	41
6.1.6 El efecto negativo de EIIA ^{Ntr} H68A sobre la transcripción de arpR es dependiente de RpoS.	42
6.2 Estudio de la relación entre EIIA ^{Ntr} y ClpAP en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.	43
6.2.1 Las mutaciones en clpA y clpP restauran parcialmente la síntesis de PHB y ARs en la cepa ptsP.	43

6.2.2 Complementación de la mutación en <i>clpP</i>	45
6.2.3 La mutación en <i>clpS</i> no restaura la síntesis de PHB y ARs en la cepa <i>ptsP⁻</i>	45
6.2.4 PTS ^{Ntr} afecta los niveles de proteína de RpoS en <i>A. vinelandii</i>	46
6.2.5 La proteína no fosforilable EIIA ^{Ntr} H68A reduce los niveles y estabilidad de RpoS.....	51
6.2.6 El complejo ClpXP degrada a RpoS en condiciones silvestres.	53
6.2.7 RpoS y EIIA ^{Ntr} de <i>A. vinelandii</i> no interaccionan in vivo mediante el sistema de dos híbridos en <i>E. coli</i>	54
6.2.8 Las mutaciones en <i>clpP</i> y <i>clpA</i> restauran la transcripción de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs en la cepa <i>ptsP⁻</i>	55
6.2.9 Represión postranscripcional de <i>phbB</i> y <i>arsA</i> por EIIA ^{Ntr} no fosforilada.	56
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	58
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS	63
CAPÍTULO 10. REFERENCIAS	64
ANEXO. ARTÍCULO	71

RESUMEN.

El sistema de fosfotransferasa asociado a nitrógeno (PTS^{Ntr}) es un sistema de regulación global presente en la mayoría de las bacterias Gram negativas y está conformado por las proteínas EI^{Ntr} (*ptsP*), NPr (*ptsO*) y EIIA^{Ntr} (*ptsN*) que participan en una cascada de fosforilación a partir del fosfoenolpiruvato. En *Azotobacter vinelandii* la proteína EIIA^{Ntr} en su forma no fosforilada, mediante un mecanismo desconocido, reprime la expresión de los genes asociados a la síntesis de poli-β-hidroxi-butarato (PHB) y posiblemente también la de los genes relacionados a la síntesis de los lípidos específicos de enquistamiento, alquilresorcinoles (ARs); debido a que una mutación en *ptsP* (que impide la fosforilación de EIIA^{Ntr}) produce un fenotipo negativo de síntesis de ARs. Una mutagénesis al azar por transposición de la cepa *ptsP*, permitió identificar que una mutación en los genes *clpA* o *clpP*, que codifican para la proteasa ClpAP, restaura los fenotipos de síntesis de PHB y ARs en dicha cepa, lo cual sugiere que EIIA^{Ntr} y ClpAP están asociados en la regulación de la síntesis de ambos compuestos. Por lo tanto en este trabajo se caracterizó el efecto de PTS^{Ntr} sobre la síntesis de ARs y se elucidó la relación entre EIIA^{Ntr} y ClpAP en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.

La inactivación mutacional de cada componente de PTS^{Ntr} permitió demostrar que efectivamente EIIA^{Ntr} no fosforilada reprime la síntesis de ARs, debido a una represión de la expresión del gen *arpR*, el cual codifica para el activador transcripcional del operón biosintético de ARs.

Por otro lado, se logró identificar que EIIA^{Ntr} no fosforilada reduce los niveles y estabilidad de proteína del factor sigma de fase estacionaria, RpoS, el cual es necesario para la activación de la transcripción de los genes de la síntesis de PHB y ARs. La mutación en *clpA* o *clpP* restauró la estabilidad de RpoS en las cepas que contienen a EIIA^{Ntr} no fosforilada, y por lo tanto la transcripción de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs. Colectivamente, estos resultados sugieren que PTS^{Ntr} regula de manera global la expresión génica en *A. vinelandii* mediante la inducción de la degradación de RpoS por ClpAP.

ABSTRACT.

The nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) is a global regulatory system present in most of gram-negative bacteria and is composed of the EI^{Ntr} (*ptsP*), NPr (*ptsO*) and EIIA^{Ntr} (*ptsN*) proteins that participate in a phosphorylation cascade from phosphoenolpyruvate. In the soil bacterium *Azotobacter vinelandii*, EIIA^{Ntr} regulates, by unknown mechanism, the expression of genes related to the synthesis of bioplastic polyester poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and possibly also regulates the expression of genes related to the synthesis of the cyst-specific lipids alkylresorcinols (ARs), as a mutation on *ptsP* (which impairs the phosphate transfer to EIIA^{Ntr}) abrogates the ARs synthesis. A random transposon mutagenesis of the *ptsP* mutant, allowed us to identify that a mutation on *clpA* or *clpP* genes (ClpAP protease), restored the phenotypes of PHB and ARs synthesis in the *ptsP* strain, suggesting that EIIA^{Ntr} and ClpAP are related in the regulation of the synthesis of both compounds. Therefore, in this work we characterized the regulatory effect of PTS^{Ntr} on ARs synthesis and elucidated the relation between EIIA^{Ntr} and ClpAP in the regulation of synthesis of PHB and ARs.

The mutational inactivation of each PTS^{Ntr} component allowed us to confirm that EIIA^{Ntr}, in its unphosphorylated state, represses the synthesis of ARs, due to a negative effect on expression of *arpR* gene, which encodes the transcriptional activator of ARs biosynthetic operon.

On the other hand, we identified that the unphosphorylated EIIA^{Ntr} protein reduces the levels and stability of the stationary sigma factor RpoS protein, which is necessary for transcriptional activation of genes related to PHB and ARs synthesis. In strains that carry unphosphorylated EIIA^{Ntr}, the mutation on *clpA* or *clpP* restored the stability of RpoS that in turn, restored the transcription of PHB and ARs related genes. Collectively, these results suggest that, in *A. vinelandii*, PTS^{Ntr} globally regulates the gene expression by inducing the RpoS degradation by ClpAP.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una γ -proteobacteria de vida libre perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno gracias a que posee tres complejos diferentes de nitrogenasa y varios mecanismos para su protección (1). Es aerobia estricta y quimiorganotrófica, es decir, usa carbohidratos, sales, ácidos orgánicos y alcoholes para su crecimiento. Es pleomórfica y puede llegar a tener hasta 80 copias de su cromosoma (poliploide), dependiendo del medio y fase de crecimiento (2). Su tamaño es de aproximadamente $2 \times 5 \mu\text{m}$ y posee un volumen hasta 16 veces mayor al de *Escherichia coli*, lo cual se ha asociado con la poliploidía. *A. vinelandii* sintetiza alginato, un exopolisacárido de interés en la industria alimenticia y farmacéutica (3). El alginato está constituido por ácido manurónico y ácido gulurónico y le sirve a la bacteria como una barrera física de la difusión de metales pesados y el oxígeno(4).

En condiciones adversas como falta de nutrientes, *A. vinelandii* puede sufrir un proceso de diferenciación a quistes, los cuales son células inactivas constituidas por un cuerpo central, rodeado por dos capas (exina e intina) compuestas principalmente por alginato (fig. 1) (5). Los quistes confieren resistencia a la desecación, radiación gamma y en menor medida a la luz ultravioleta y se ha reportado que pueden sobrevivir entre 22 y 24 años en suelo seco (6, 7). Una vez que las condiciones son nuevamente favorables, los quistes pueden germinar dando inicio a un nuevo ciclo de vida de la bacteria (5).

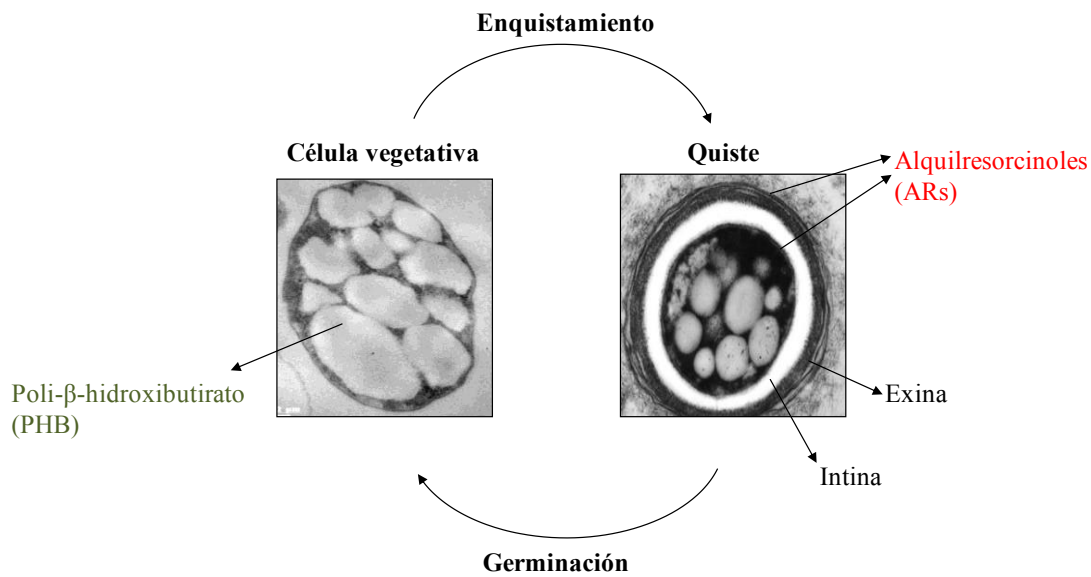


Figura 1. Propiedades de células vegetativas y quistes de *A. vinelandii*. En fase vegetativa, *A. vinelandii* produce PHB. Puede sufrir un proceso de diferenciación a quiste, el cual comprende un cuerpo basal rodeado de dos capas (exina e intina). Durante el enquistamiento sintetiza los lípidos fenólicos que reemplazan los fosfolípidos de la membrana y se localizan en la exina. Los quistes pueden germinar dando inicio a un nuevo ciclo de vida.

1.2 Biosíntesis de poli-β-hidroxi-butarato en *A. vinelandii*.

Una de las propiedades interesantes de *A. vinelandii* es la capacidad de sintetizar poli-β-hidroxi-butarato (PHB); un poliéster perteneciente a la familia de poli-hidroxi-alcanoatos (PHAs) los cuales son de interés industrial para la producción de plástico biodegradable (8). El PHB es almacenado en forma de gránulos insolubles citoplasmáticos (fig. 1) sin afectar la presión osmótica de la célula y es usado por la bacteria como fuente de carbono durante la limitación de nutrientes (9).

La síntesis de PHB ocurre principalmente en fase estacionaria e inicia con la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA por la enzima β-cetotiolasa (*phbA*), formando acetoacetyl-CoA, el cual es reducido por la acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y finalmente polimerizado por la PHB sintasa (*phbC*) (fig. 2) (10).

En presencia de oxígeno, el acetil-CoA es conducido al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y la coenzima A producida inhibe la actividad de la β -cetotiolasa. Mientras que en limitación de oxígeno y en presencia de un exceso de fuente de carbono, la síntesis de PHB es favorecida debido a que se acumula NADH, el cual inhibe la actividad de la citrato sintasa, disminuyendo la entrada de acetil-CoA al TCA. Altas concentraciones de acetil-CoA activan a la β -cetotiolasa, dando inicio a la síntesis de PHB (11). Por otro lado, la limitación de hierro también favorece la síntesis del polímero; bajos niveles de hierro disminuyen la actividad de la succinato deshidrogenasa del TCA y aumentan la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB (12).

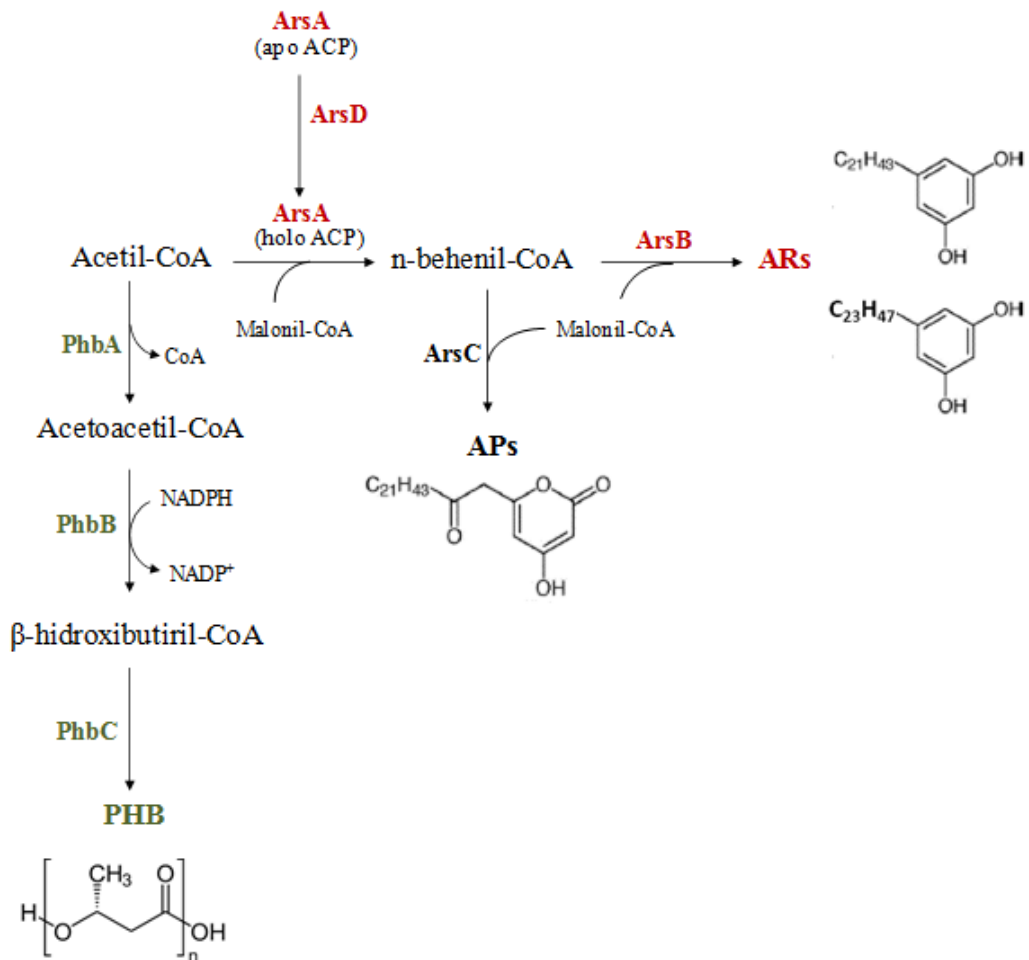


Figura 2. Síntesis de PHB y ARs en *A. vinelandii*. La síntesis de PHB inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA, el cual es reducido a β -hidroxibutiril-CoA y polimerizado a PHB. La síntesis de ARs y APs inicia con la formación de n-behenil-CoA a partir de acetil-CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA para formar 5-heneicosilresorcinoles (21C) y 5-tricosilresorcinoles (23C).

1.2.1 Regulación genética de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

Los genes que codifican para las enzimas de la síntesis de PHB se encuentran organizados en el operón *phbBAC*, el cual se transcribe a partir de dos promotores p_{B1} y p_{B2} . Corriente arriba del operón y de manera divergente se encuentra el gen *phbR* que codifica para el regulador PhbR perteneciente a la familia AraC/XylS, el cual activa de manera directa la transcripción de *phbBAC* a partir del promotor p_{B1} (10, 13, 14). La transcripción de *phbR* también se da a partir de dos promotores; p_{R1} y p_{R2} , siendo p_{R1} dependiente de PhbR. El factor sigma de fase estacionaria RpoS, es necesario para la transcripción de *phbBAC* a partir del promotor p_{B2} y de *phbR* a partir de p_{R2} (fig. 3) (13, 14).

A nivel postranscripcional, el sistema RsmA/RsmZ-Y (homólogo a CsrA/CsrB en *E. coli*) regula la expresión tanto de *phbR* como de *phbBAC*. RsmA es una proteína pequeña que se une a la región 5' no traducida de los mRNAs de *phbR* y *phbB*, bloqueando su traducción (15). La actividad de RsmA es contrarrestada por la acción de los RNAs pequeños (sRNAs) RsmZ₁₋₇ y RsmY, los cuales poseen varios sitios de unión para RsmA (fig. 3) (16).

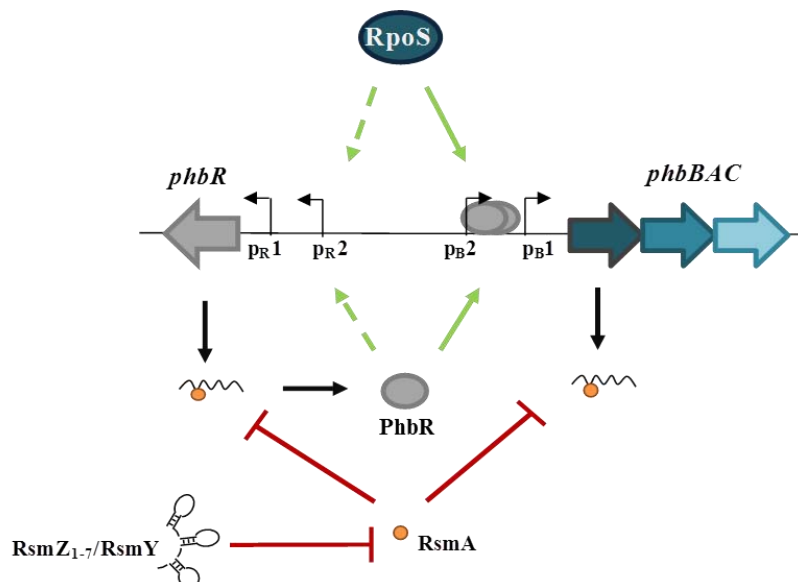


Figura 3. Regulación de la expresión de *phbBAC* y *phbR* en *A. vinelandii*. La transcripción de *phbBAC* y *phbR* es activada por PhbR a partir del promotor p_{B1} y p_{R1} , respectivamente. La transcripción de *phbR* y de *phbBAC* (p_{B2}) es dependiente del factor sigma RpoS. A nivel postranscripcional la proteína RsmA regula negativamente la expresión de *phbR* y *phbBAC* uniéndose a la región líder de sus mRNAs. Los sRNAs RsmZs y RsmY titulan a RsmA.

1.3 Biosíntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii*.

Durante el enquistamiento, *A. vinelandii* sintetiza unos lípidos fenólicos llamados alquilresorcinoles (ARs) y alquilpironas (APs), los cuales reemplazan los fosfolípidos de la membrana plasmática, representando el 95% de los lípidos presentes en los quistes (17). Los principales ARs sintetizados son el 5-heneicosilresorcinol y 5-*n*-tricosilresorcinol, con cadenas de 21 y 23 carbonos, respectivamente y sus derivados galactosidados (18). Los ARs también se localizan en la capa externa del quiste (exina) (fig. 1) y tienen una función estructural, debido a que cepas incapaces de producir ARs presentan una exina desorganizada y un fenotipo de aglutinación, lo cual posiblemente afecte la segregación de los quistes. Sin embargo, a pesar de estos fenotipos estas cepas siguen siendo resistentes a la desecación (19).

La síntesis de ARs y APs está dada por cuatro enzimas. ArsA y ArsD constituyen una sintasa de ácidos grasos; ArsD une de manera covalente un brazo de 4-fosfopanteteína proveniente de coenzima A al dominio ACP (proteína acarreadora de acilos) de ArsA, la cual sintetiza ácidos grasos de C₂₂-C₂₃ a partir de una unidad de acetil-CoA y la condensación de varias moléculas de malonil-CoA, formando *n*-behenil-CoA. ArsB y ArsD usan el *n*-behenil-CoA para la síntesis de 5-*n*-heneicosilresorcinoles y 6-*n*-alquilpironas, respectivamente (fig. 2) (20).

1.3.1 Regulación genética de la síntesis de ARs en *A. vinelandii*.

Los genes que codifican para la síntesis de ARs y APs se encuentran organizados en el operón *arsABCD* (20). Su transcripción inicia a partir de un único promotor, el cual es activado de manera directa por la proteína ArpR, un regulador perteneciente a la familia LysR cuyo coinductor es acetoacetil-CoA (fig. 4). La transcripción del gen *arpR* es activada por ArpR y es dependiente de RpoS (21). Adicionalmente la proteína RsmA reprime la expresión de *arpR* a nivel postranscripcional uniéndose a la región 5' no traducida de su mRNA (fig. 4) (Romero Y., datos no publicados).

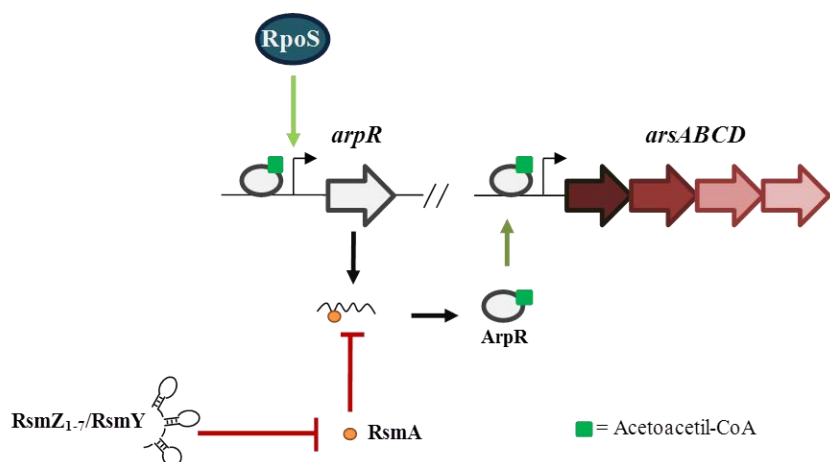


Figura 4. Regulación de la expresión de *arsABCD* y *arpR* en *A. vinelandii*. La transcripción de *arsABCD* y *arpR* es activada por ArpR, el cual utiliza acetoacetyl-CoA como coinductor. La transcripción de *arpR* es dependiente de RpoS. La proteína RsmA interacciona con la región líder del mRNA de *arpR* inhibiendo su traducción.

1.4 Sistema fosfoenolpiruvato: fosfotransferasa de carbohidratos (PTS).

Muchas bacterias y algunas arqueas emplean el PTS de carbohidratos para el transporte y fosforilación de diferentes azúcares y algunos de sus derivados. De manera general, el PTS se conforma por dos proteínas citoplasmáticas (EI y HPr) y varios complejos tripartitos específicos para cada azúcar (EII). EIIA y EIIB también son proteínas solubles, mientras que EIIC se encuentra unido a la membrana y presenta un sitio de unión de substrato (22). Se han clasificado siete familias PTS de acuerdo a las permeasas identificadas: glucosa, fructosa, lactosa, sorbitol, dulcitol, manosa y ascorbato (23).

El fosfoenolpiruvato (PEP) es utilizado como donador de fosfato para la fosforilación del azúcar durante su transporte, para lo cual se forma una cascada de fosforrelevo que inicia con la autofosforilación de la proteína EI, la cual transfiere el grupo fosfato a HPr y esta a su vez a una de las EIIA específicas de azúcar. EIIB recibe el grupo fosfato y finalmente lo transfiere al azúcar unido a EIIC (fig. 5) (22).

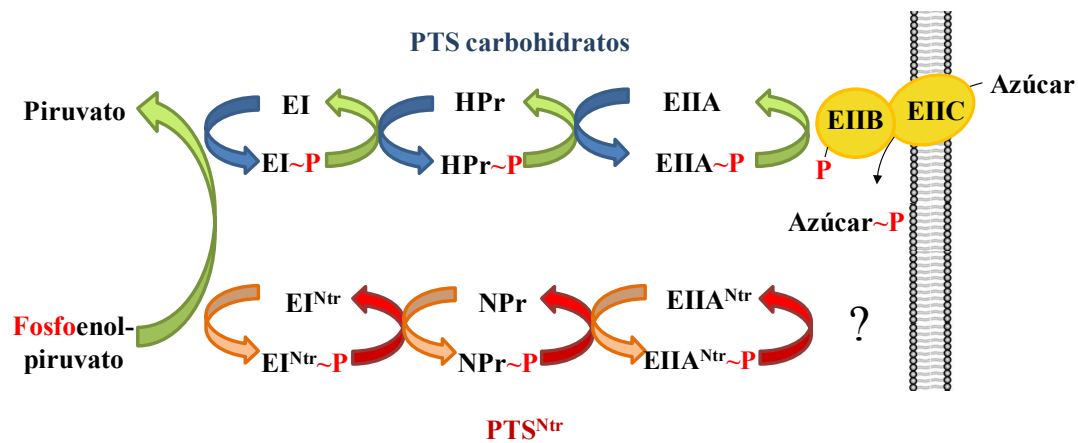


Figura 5. PTS de carbohidratos y PTS^{Ntr}. La proteína EI se autofosforila a partir del fosfoenolpiruvato (PEP), sucediendo la transferencia del grupo fosfato en el orden EI→HPr→EIIA→EIIB y finalmente al azúcar. En el PTS^{Ntr} también EI^{Ntr} se autofosforila a partir del PEP, fosforila a NPr y esta última a EIIA^{Ntr}, sin embargo hasta el momento no se conoce un sustrato que reciba el fosfato por parte de EIIA^{Ntr}. Adaptado de Pflüger-Grau y Görke (24).

Además del transporte de carbohidratos, PTS también lleva a cabo procesos de regulación. En enterobacterias, la proteína EIIA de glucosa (EIIA^{Glc}) es el regulador central del metabolismo de carbono, debido a su función en la represión catabólica; cuando EIIA^{Glc} se encuentra predominantemente fosforilada (ausencia de glucosa en el medio) activa la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) por la enzima unida a membrana adenilato ciclasa. El cAMP interacciona con la proteína CRP (*cAMP receptor protein*) para la activación de la transcripción de genes y operones para el catabolismo de azúcares (25). Adicionalmente, EIIA^{Glc} en su forma no fosforilada interacciona e inhibe la actividad de proteínas involucradas en metabolismo de fuentes de carbono secundarias como GlpK (glicerol cinasa) y LacY (lactosa permeasa) (22).

1.5 PTS asociado a nitrógeno (PTS^{Ntr}).

En todas las proteobacterias (con excepción de las ϵ -bacterias) se encuentra altamente conservado un sistema homólogo a PTS de carbohidratos llamado PTS asociado a nitrógeno (PTS^{Ntr}), el cual está constituido por las proteínas EI^{Ntr} (EI), Npr (HPr) y EIIA^{Ntr} (EIIA). Hasta el momento no se han identificado homólogos a EIIB y EIIC, por lo que EIIA^{Ntr} es considerado como el aceptor final del grupo fosfato (fig. 5). Otra diferencia interesante entre PTS de carbohidratos y PTS^{Ntr} es la presencia de un dominio GAF (inicialmente identificado en fosfodiesterasas cGMP; adenilato ciclasas de *Anabaena* y FhlA de *E. coli*) en el extremo N-terminal de la proteína EI^{Ntr}, el cual es un módulo sensorial que puede unir varios ligandos (24). De hecho, en *E. coli* la fosforilación de PTS^{Ntr} es influenciada por el estado de nitrógeno celular mediante la interacción de glutamina o α -cetoglutarato con el dominio GAF de EI^{Ntr} (26).

Los genes *ptsO* y *ptsN* codifican para las proteínas Npr y EIIA^{Ntr}, respectivamente; se encuentran en el operón que contiene a *rpoN*, el gen codificante del factor sigma 54 para la asimilación de nitrógeno (fig. 6). Se propone que el ancestro putativo de este locus es el que se encuentra en *Desulforomonas acetoxidans*, el cual conserva los genes del complejo EII para el transporte de manosa y que la mayoría de las proteobacterias han perdido durante su evolución (incluyendo a *E. coli*, *Pseudomonas* sp y *A. vinelandii*) (fig. 6). El gen *ptsP* (EI^{Ntr}) se localiza en otra región del genoma; en *E. coli* y *A. vinelandii*, *ptsP* se encuentra en operón y corriente abajo del gen *nudH*, el cual codifica para una pirofosfohidrolasa NUDIX (27).

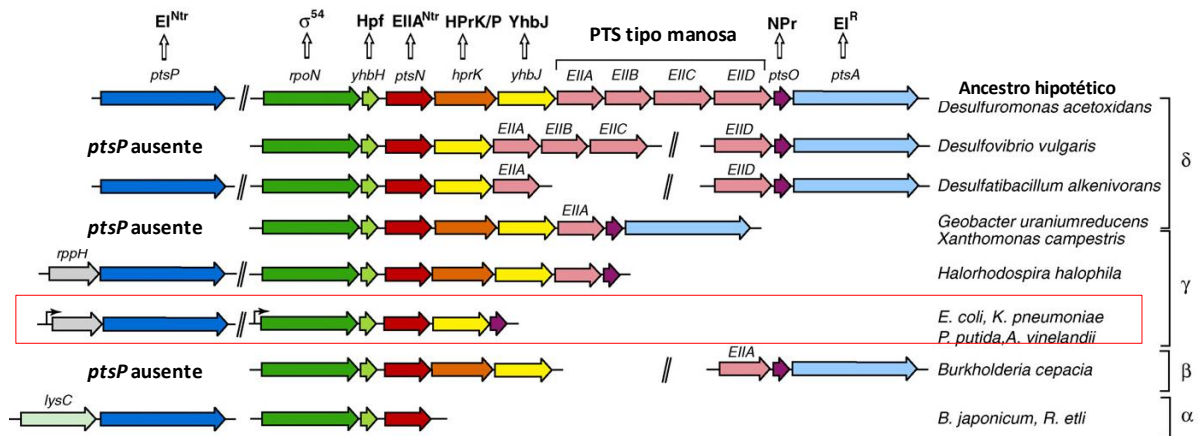


Figura 6. Organización de los genes PTS^{Ntr}. En *A. vinelandii* y *E. coli*, los genes *ptsO* y *ptsN* se encuentran en el cluster que contiene a *rpoN* (sigma 54), mientras que *ptsP* está en otro lugar del genoma corriente abajo del gen *rppH*. Adaptado de Pflüger-Grau y Görke (24).

PTS^{Ntr} regula una variedad de procesos celulares en diferentes géneros bacterianos. En *E. coli* la síntesis del lípido A del lipopolisacárido (LPS) es reducida mediante la interacción entre NPr y LxpD (enzima de la síntesis del lípido A) (28). Por otro lado, EIIA^{Ntr} interacciona con la cinasa sensora PhoR, aumentando la fosforilación del regulador respuesta PhoB y a su vez la expresión del regulón *pho*, el cual es necesario para la respuesta a la escasez de fosfato (29). EIIA^{Ntr} también controla la homeostasis de potasio y lo hace mediante dos vías: en presencia de niveles bajos de K⁺, EIIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con la cinasa sensora KdpD estimulando su actividad cinasa sobre el regulador respuesta KdpE, el cual activa la transcripción del operón *kdpFABC* que codifica para un transportador de K⁺ de alta afinidad (fig. 7) (30). En presencia de altos niveles de K⁺, EIIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con TrkA (una subunidad del transportador de potasio de baja afinidad Trk) y bloquea el transporte del catión (fig. 7) (31). Adicionalmente, en ausencia de EIIA^{Ntr} (en una mutante *ptsN*) la actividad de RpoS es favorecida debido a que los niveles altos de K⁺ (debido a una alta actividad de Trk) favorece la unión del core de RNA polimerasa a RpoS en vez de RpoD (32).

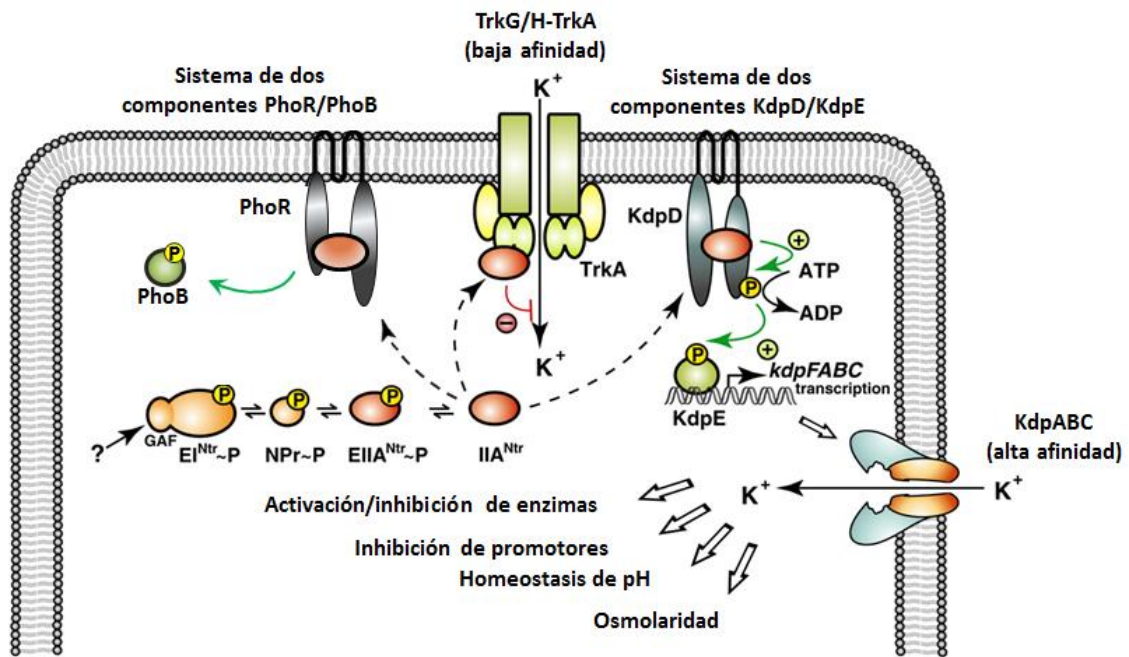


Figura 7. Regulación del transporte de K^+ en *E. coli* por PTS^{Ntr} . En presencia de una fuente de K^+ , $EIIA^{Ntr}$ interacciona con el transportador de baja afinidad TrkA e inhibe el transporte del catión, mientras que en limitación de K^+ , $EIIA^{Ntr}$ interacciona con la cinasa sensora KdpD para la activación transcripcional del transportador de alta afinidad KdpABC. $EIIA^{Ntr}$ también interacciona con la cinasa sensora PhoR para la activación del regulón de PhoB en respuesta a la limitación de fosfato. Modificado de Pflüger-Grau y Görke (24).

En *Salmonella*, $EIIA^{Ntr}$ interacciona con el regulador respuesta SsrB y modula su actividad sobre la expresión de la isla de patogenicidad II (SPI II) (33). A diferencia de lo descrito en *E. coli*, en otras bacterias aún se desconoce como PTS^{Ntr} lleva a cabo su efecto regulatorio sobre diferentes procesos celulares como virulencia, síntesis de PHB, fijación de nitrógeno, síntesis de melanina, etc (tabla 1).

Tabla 1. Procesos regulados por PTS^{Ntr}

Microorganismo	Proceso	Agente regulatorio	Mecanismo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Regulación de la homeostasis de K ⁺	EIIA ^{Ntr}	EIIA ^{Ntr} interacción con la cinasa sensora KdpD y el transportador TrkA	(30, 31)
	Modulación respuesta a escasez de fosfato	EIIA ^{Ntr}	Interacción entre EIIA ^{Ntr} y la cinasa sensora PhoR	(29)
	Síntesis del lípido A (LPS)	NPr	NPr interacciona con LpxD	(28)
	Sensibilidad a estrés osmótico y estrés por SDS y etanol cuando aumenta NPR no fosforilada (mutante <i>ptsP</i>)	NPr	Desconocido	(34)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Una mutación en <i>ptsP</i> aumenta la producción de piocianina, debido a una disminución de la expresión del represor QssR	Desconocido	Desconocido	(35)
<i>Salmonella</i>	Modulación de la expresión de la SPI II	EIIA ^{Ntr}	Interacción entre EIIA ^{Ntr} y el regulador respuesta SsrB	(33)
<i>Rhizobium etli</i>	Una mutación en <i>ptsN</i> disminuye la síntesis de melanina y expresión de <i>nifH</i>	Desconocido	Desconocido	(36)
<i>Legionella pneumophila</i>	Una mutación en <i>ptsP</i> disminuye su replicación en macrófagos (cobayos)	Desconocido	Desconocido	(37)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aumento en la fijación de nitrógeno por mutación en <i>ptsN</i> (desrepresión de <i>nifL</i> y <i>nifH</i>)	EIIA ^{Ntr}	Desconocido	(38)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Una mutación en <i>ptsP</i> disminuye la actividad de nitrogenasa	Desconocido	Desconocido	(39)
	Regulación de la síntesis de PHB (represión de la expresión de <i>phbR</i> y <i>phbBAC</i>)	EIIA ^{Ntr}	Desconocido	(39, 40)
	Una mutación en <i>ptsP</i> abate la síntesis de ARs	Desconocido	Desconocido	Muriel-Millán LF (Tesis de Maestría)

1.6 Proteasas ClpAP y ClpXP.

La proteólisis intracelular es un proceso crucial para la regulación de la expresión génica y la remoción de proteínas mal plegadas para el mantenimiento de la homeóstasis. En bacterias Gram negativas, la proteólisis regulada es llevada a cabo por proteasas dependientes de ATP como Lon, FtsH, HslUV y los complejos ClpXP y ClpAP (41).

ClpP (*caseinolytic protease*) es una serina proteasa organizada en dos anillos heptaméricos, conteniendo en la parte interior 14 sitios catalíticos. ClpA y ClpX son chaperonas de ClpP pertenecientes a la superfamilia AAA⁺ (*ATPases associated with diverse cellular activities*), llevan a cabo el reconocimiento de los substratos, su desdoblamiento y translocación al interior de ClpP para su degradación (42). El reconocimiento de los substratos por parte de ClpA y ClpX depende de ciertas secuencias (*degrons*) presentes en las proteínas blanco, ya sea en los extremos N- o C-terminal, o bien en una región interna que es expuesta debido a un estímulo (cambio conformacional, corte endoproteolítico, etc) (43). ClpA y ClpX pueden reconocer substratos marcados en el extremo C-terminal por el sistema de reciclaje de ribosomas SsrA-SmpB (44) o bien reconocer substratos de manera específica gracias a proteínas adaptadoras. Adicionalmente, en condiciones de estrés, ambos complejos ClpAP y ClpXP pueden degradar proteínas mal plegadas evitando la formación de grandes agregados(42).

El complejo ClpAP participa en la vía de degradación denominada *N-end rule*, la cual también se encuentra en eucariotes y determina la estabilidad de una proteína de acuerdo al aminoácido presente en el extremo N-terminal (si es estabilizante o desestabilizante). En *E. coli* los aminoácidos Phe, Tyr, Trp y Leu son clasificados como desestabilizantes primarios, mientras que Lys, Arg y Met son desestabilizantes secundarios. La enzima leucil-fenilalanil tRNA transferasa (LFTR) adiciona residuos desestabilizantes primarios (Leu o Phe) a los desestabilizantes secundarios (fig. 8). La proteína adaptadora ClpS reconoce todos los residuos desestabilizantes primarios en el N-terminal del substrato y lo entrega a ClpA (fig.

8) (45). Hasta el momento no se comprende muy bien la función fisiológica de la vía N-end rule en bacterias, sin embargo en *E. coli*, en dos estudios diferentes, se identificaron a PATasa, Dps y PutA como blancos reconocidos por ClpS y degradados por ClpAP (46, 47).

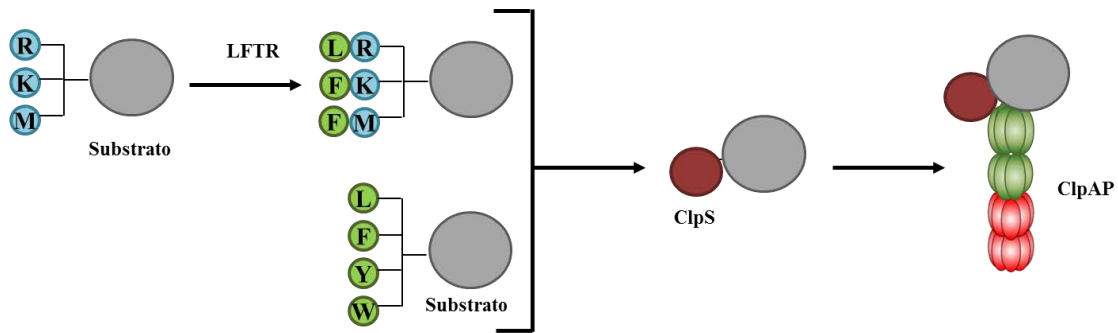


Figura 8. Representación de la vía N-end rule en *E. coli*. Si el N-terminal de una proteína presenta un aminoácido desestabilizante primario (L, F, Y W), es reconocido por la proteína ClpS, la cual interacciona con ClpA y le presenta el sustrato para su degradación. Adaptado de Dougan DA et al (45).

Por otro lado, en *E. coli* se ha estudiado el mecanismo por el cual la chaperona ClpX participa en la degradación de RpoS. Durante la fase exponencial, la proteína adaptadora RssB (el cual es un regulador respuesta huérfano) en su forma fosforilada interacciona con RpoS, lo cual permite que ClpXP reconozca al factor sigma (probablemente por un cambio conformacional de RpoS) y lo degrade. Durante la fase estacionaria se da la activación de varios antiadaptadores como IraP, IraM e IraD, los cuales interaccionan con RssB, resultando en la liberación y estabilización de RpoS (fig. 9) (48). El reconocimiento de RpoS por ClpXP es específico, debido a que la inactivación del gen *clpA* no aumenta los niveles de RpoS como si sucede con mutaciones en *clpX* o *clpP* (49).

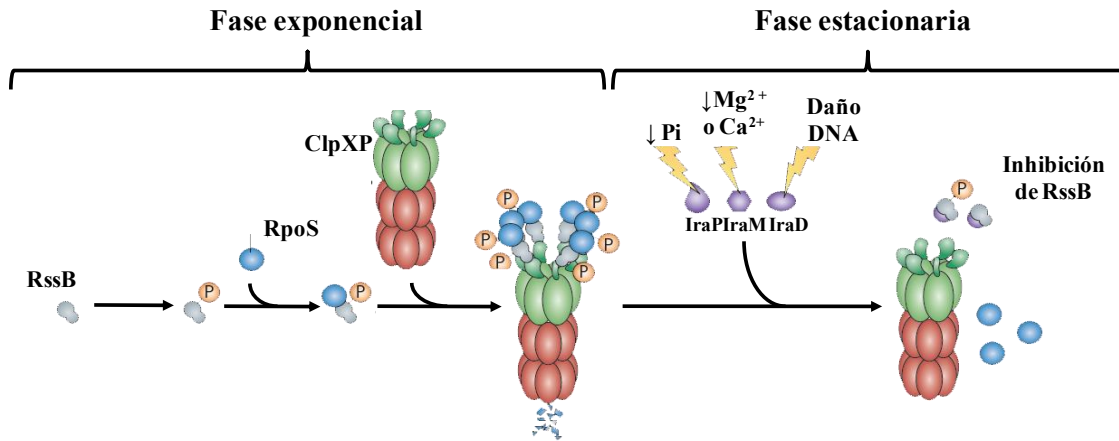


Figura 9. Reconocimiento y degradación de RpoS por ClpXP en *E. coli*. Durante la fase exponencial la proteína RssB en su forma fosforilada, interacciona con RpoS, permitiendo su reconocimiento y degradación por el complejo ClpXP. En fase estacionaria, se activa la síntesis de las proteínas IraP, IraM e IraD las cuales interaccionan con RssB, haciendo que RpoS ya no sea degradado por ClpXP. Adaptado de Kirstein et al (43).

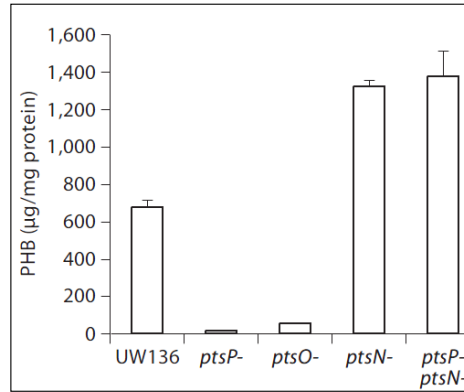
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

2.1 PTS^{Ntr} controla la síntesis de PHB y ARs en *A. vinelandii*.

A. vinelandii carece de PTS de carbohidratos [con excepción para fructosa, para el cual el operón *fruBKA* se encuentra en el genoma de *A. vinelandii* (1)], por lo tanto el transporte de carbohidratos es mediante otros mecanismos de transporte activo (50). No obstante, un PTS^{Ntr} completo se encuentra en *A. vinelandii* y regula varios procesos. Inicialmente, en nuestro grupo se identificó que una mutación en el gen *ptsP* (EI^{Ntr}) disminuye drásticamente la síntesis de PHB y afecta la fijación de nitrógeno (39). La inactivación del gen *ptsO* (NPr) también disminuye la síntesis del polímero, mientras que una mutación en el gen *ptsN* (EIIA^{Ntr}) produce un efecto opuesto; aumenta los niveles de PHB tanto en la cepa silvestre como en la cepa *ptsP* (cepa *ptsP-ptsN*) (fig. 10A). Estos fenotipos se deben a que las mutaciones en los genes *pts* afectan la expresión del operón *phbBAC* y de *phbR*; mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyen los niveles de transcritos de *phbB* y de *phbR*, mientras que una mutación en *ptsN* los aumenta (40) (fig.10B).

De acuerdo a la cascada de fosforilación de PTS^{Ntr}, las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* afectarían la transferencia del grupo fosfato hacia EIIA^{Ntr}, por lo que sería esta última proteína en su forma no fosforilada la que ejerce el efecto negativo sobre la síntesis del polímero. Esta hipótesis fue confirmada mediante la construcción de una cepa que porta un gen *ptsN* con cambio en el codón que codifica para la histidina fosforilable por un codón de alanina (H68A), por lo tanto expresa una EIIA^{Ntr} no fosforilable. Esta cepa (UW136::pALA8a) presentó un fenotipo negativo de síntesis de PHB (fig. 11), lo cual confirma que EIIA^{Ntr} no fosforilada afecta de manera negativa la síntesis del polímero(40).

(A)



(B)

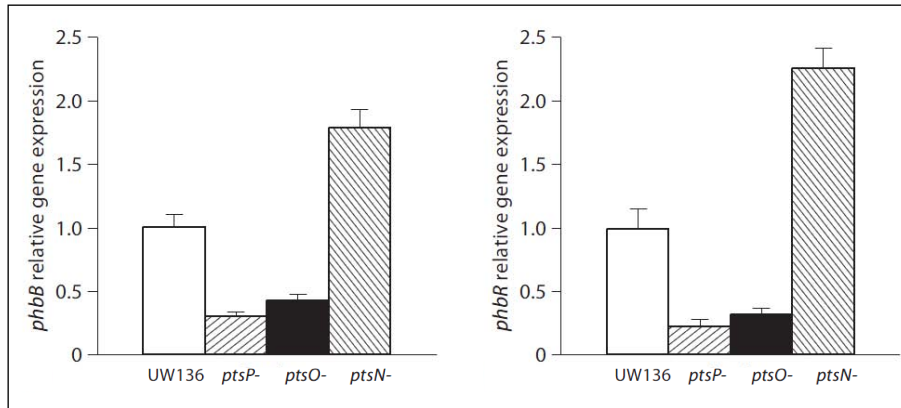


Figura 10. Efecto de PTS^{Ntr} sobre la síntesis de PHB (A) y expresión de *phbB* y *phbR* (B) en *A. vinelandii*. Las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyen la síntesis de PHB y la expresión de *phbB* y *phbR*, mientras que la mutación en *ptsN* produce un efecto contrario. Tomado de Noguéz et al (40).

UW136

UW136::pALA8a

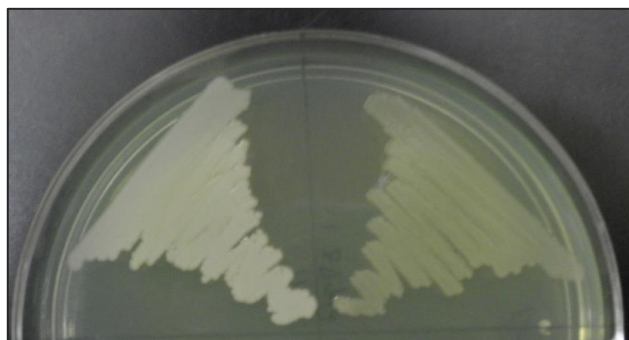


Figura 11. Fenotipo de síntesis de PHB en las cepas de *A. vinelandii* UW136 y UW136::pALA8a (EIIA^{Ntr} H68A no fosforilable). Cepas crecidas en medio sólido PY a 72 horas de incubación a 30°C. El fenotipo de síntesis de PHB produce un aspecto blanquecino de la cepa y es más opaca (cepa silvestre), mientras que un fenotipo negativo o de disminución en la acumulación del polímero se caracteriza por una apariencia menos blanca y transparente.

Más adelante, se identificó que la síntesis de ARs también es afectada por PTS^{Ntr}, debido a que una mutación en *ptsP* produce un fenotipo negativo de la síntesis de los lípidos fenólicos en la cepa UW136 (fig. 12A) (Muriel-Millán LF, Tesis de maestría) sugiriendo que posiblemente EIIA^{Ntr} no fosforilada también reprime la expresión de los genes asociados a la síntesis de ARs.

Debido a que la proteína EIIA^{Ntr} no presenta dominios de unión a DNA (40), se asume que su efecto negativo sobre la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs es de manera indirecta, involucrando al menos a un intermediario.

2.2 El complejo ClpAP y PTS^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.

Con el fin de identificar posibles intermediarios entre EIIA^{Ntr} no fosforilada y la regulación de la síntesis de PHB y ARs, se realizó una mutagénesis al azar (con el transposón mini-Tn5) en la mutante *ptsP*⁻ (EIIA^{Ntr} no fosforilada presente) esperando obtener nuevas cepas capaces de sintetizar ambos compuestos. Esta estrategia permitió identificar que una mutación en el gen *clpA* (que codifica para la

chaperona ClpA), restaura nuevamente la síntesis de PHB y ARs en la mutante *ptsP* (fig. 12). La mutación en *clpP* también restaura la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP* (fig. 12) (Muriel Millán LF, tesis de maestría). Estos resultados sugieren que la proteasa ClpAP y EIIA^{Ntr} no fosforilada regulan la síntesis de ambos compuestos, probablemente mediante una misma vía.

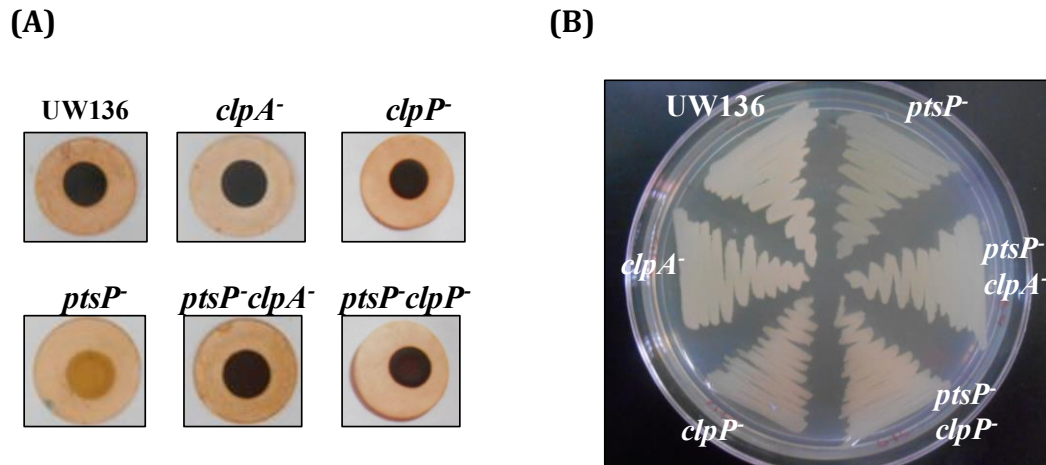


Figura 12. Las mutaciones en *clpA* y *clpP* restauran el fenotipo de síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*⁻. (A) Tinción de alquilresorcinoles producidos en medio sólido Burk 0.2% Butanol (BBOH) a 120 horas de incubación a 30°C. Las células fueron crecidas en medio BS por 48 horas, lavadas con 10 mM MgSO₄ y resuspendidas en la misma solución. 10 μL de cada suspensión celular fueron colocados en filtros de 0.22 μm previamente puestos sobre la superficie del medio. Las células fueron teñidas con el colorante Fast Blue B. La coloración roja indica fenotipo positivo de síntesis de ARs (B). Fenotipo de síntesis de PHB en medio PY a 72 horas de incubación a 30°C. La cepa silvestre presenta un aspecto blanquecino (fenotipo positivo de PHB), mientras que la cepa *ptsP*⁻ es menos blanca (fenotipo negativo de PHB). (Muriel-Millán LF. Tesis de maestría)

De acuerdo a lo anterior en el presente trabajo se decidió caracterizar el efecto de PTS^{Ntr} sobre la síntesis de ARs y elucidar la relación entre ClpAP y EIIA^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS.

La proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada, mediante la proteasa ClpAP ejerce un efecto negativo sobre la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB y alquilresorcinoles en *A. vinelandii* (fig. 13).

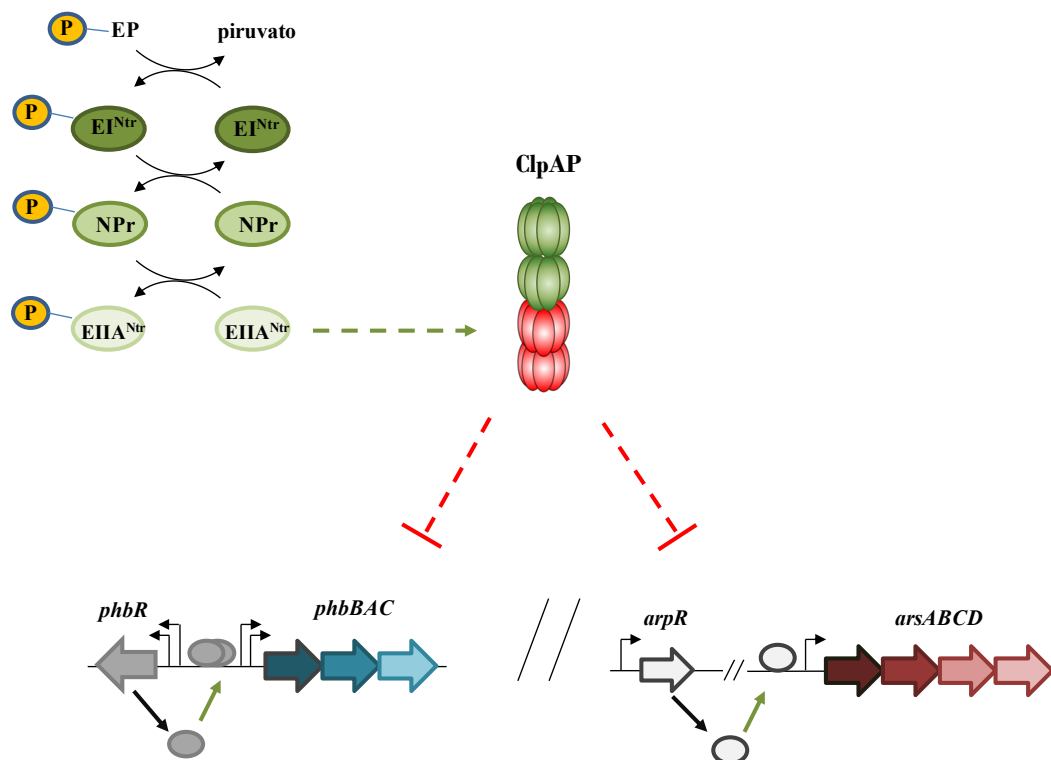


Figura 13. Modelo hipotético de la regulación de PTS^{Ntr} sobre la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs en *A. vinelandii*. Las líneas verdes y rojas indican activación y represión, respectivamente.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Caracterizar el mecanismo por el cual las proteínas EIIA^{Ntr} y ClpAP regulan la síntesis de PHB y ARs en *A. vinelandii*.

4.2 Objetivos específicos.

1. Caracterizar el efecto regulatorio que ejerce PTS^{Ntr} sobre la síntesis de ARs en *A. vinelandii*
2. Establecer una relación entre ClpAP y EIIA^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.
3. Caracterizar el efecto de la proteasa ClpAP sobre la expresión de los genes asociados a PHB y ARs.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

En las tablas 2, 3 y 4 se describen las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos, respectivamente, utilizados en el presente trabajo.

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>A. vinelandii</i>		
UW136	Mutación natural en <i>algU</i> , Nal ^r , Rif ^r	(39)
RN4	UW136 con mutación <i>ptsN</i> ::Km	(40)
RN6	UW136 con mutación <i>ptsO</i> ::Sp	(40)
LSW1	UW136 con mutación <i>ptsP</i> ::Tc	Este trabajo
LSW2	UW136 con mutación <i>ptsN</i> ::Sp	Este trabajo
LSW3	LSW1 con mutación <i>ptsN</i> ::Sp	Este trabajo
UW136::pALA7	UW136 con plásmido pALA7 cointegrado en el cromosoma para expresar a EIIA ^{Ntr} -6His fosforilable	(40)
UW136::pALA8a	UW136 con plásmido pALA8 cointegrado en el cromosoma para expresar a EIIA ^{Ntr} -6His H68A no fosforilable	(40)
LMW3	UW136 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW4	LSW1 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW5	RN6 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW6	RN4 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW7	LSW3 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW8	UW136::pALA7 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW9	UW136::pALA8a con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW10	UW136 con fusión traduccional <i>arsA'-gusA</i>	Este trabajo
LMW11	LSW1 con fusión traduccional <i>arsA'-gusA</i>	Este trabajo
LMW12	RN6 con fusión traduccional <i>arsA'-gusA</i>	Este trabajo
LMW13	RN4 con fusión traduccional <i>arsA'-gusA</i>	Este trabajo
LMW14	LSW3 con fusión traduccional <i>arsA'-gusA</i>	Este trabajo
LMW15	UW136 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW16	LSW1 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW17	RN6 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW18	RN4 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW19	LSW3 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW20	UW136::pALA7 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW21	UW136::pALA8a con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW22	UW136 con fusión traduccional <i>arpR'-gusA</i>	Este trabajo

Continuación tabla 2.

LMW23	LSW1 con fusión traduccional <i>arpR'</i> - <i>'gusA</i>	Este trabajo
LMW24	RN6 con fusión traduccional <i>arpR'</i> - <i>'gusA</i>	Este trabajo
LMW25	RN4 con fusión traduccional <i>arpR'</i> - <i>'gusA</i>	Este trabajo
LMW26	LSW3 con fusión traduccional <i>arpR'</i> - <i>'gusA</i>	Este trabajo
LMW27	UW136 con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i> , Gm ^r	Este trabajo
LMW28	LSW1 con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i> , Gm ^r	Este trabajo
LMW29	UW136 con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i> Gm ^r	Este trabajo
LMW30	LSW1 con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i> , Gm ^r	Este trabajo
UW136::pALA8a /pBpgyA- <i>arpR</i>	UW136::pALA8a con pBpgyA- <i>arpR</i> para la expresión de <i>arpR</i> a partir de un promotor independiente de RpoS	Este trabajo
UW136/ pBBR1MCS-5	UW136 con plásmido vacío pBBR1MCS-5	Este trabajo
UW136::pALA8a /pBBR1MCS-5	UW136::pALA8a con plásmido vacío pBBR1MCS-5	Este trabajo
JGW-S	UW136 con mutación <i>rpoS</i> ::Sp	(13)
LMW31	LSW1 con mutación <i>clpA</i> ::mini-Tn5	Muriel-Millán LF. Tesis de maestría
LMW32	LSW1 con mutación <i>clpA</i> ::mini-Tn5	Muriel-Millán LF. Tesis de maestría
LMW33	UW136 con mutación <i>clpA</i> ::Km	Muriel-Millán LF. Tesis de maestría
LMW34	LSW1 con mutación <i>clpA</i> ::Km	Muriel-Millán LF. Tesis de maestría
LMW35	UW136 con mutación <i>clpP</i> ::Km	Muriel-Millán LF. Tesis de maestría
LMW36	LSW1 con mutación <i>clpP</i> ::Km	Muriel-Millán LF. Tesis de maestría
LMW37	UW136::pALA8a con mutación <i>clpA</i> ::Gm	Este trabajo
LMW38	UW136::pALA8a con mutación <i>clpP</i> ::Gm	Este trabajo
LMW39	UW136 con mutación <i>clpX</i> :: Km	Este trabajo
LMW40	LSW1 con mutación <i>clpX</i> :: Km	Este trabajo
LMW41	LSW1 con mutación <i>clpS</i> :: Km	Este trabajo
LMW42	LMW33 con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW43	LMW34 con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW44	LMW33 con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i>	Este trabajo
LMW45	LMW34 con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i>	Este trabajo
LMW46	LMW33 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW47	LMW34 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo

Continuación tabla 2.

LMW48	LMW33 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW49	LMW34 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW50	LMW35 con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW51	LMW36 con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW52	LMW35 con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i>	Este trabajo
LMW53	LMW36 con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i>	Este trabajo
LMW54	LMW35 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW55	LMW36 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW56	LMW35 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW57	LMW36 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
LMW58	UW136 con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i> , Gm ^r	Este trabajo
LMW59	LSW1 con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i> , Gm ^r	Este trabajo
LMW60	LMW33 con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW61	LMW34 con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW62	LMW35 con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW63	LMW36 con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
LMW64	LMW33 con fusión traduccional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW65	LMW34 con fusión traduccional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW66	LMW35 con fusión traduccional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
LMW67	LMW36 con fusión traduccional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, relA</i>	(51)
BTH101	F ⁻ , <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^r), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Euromedex
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm</i>	Invitrogen
HB101	<i>supE44, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1</i>	(51)

Tabla 3. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pJET1.2-Blunt	Vector de clonación	Thermo Scientific
pET22b(+)	Vector de expresión	Novagen
pUC18C	Vector para sistema de dos híbridos, fusión de proteínas en su N-terminal con los aminoácidos del 225 al 399 (T18) de CyaA de <i>Bordetella pertussis</i> , ori ColE1, Amp ^r	Euromedex
pKT25	Vector para sistema de dos híbridos, Fusión de proteínas en su N-terminal con los primeros 224 aminoácidos (T25) de CyaA de <i>B. pertussis</i> , ori p15, Km ^r	Euromedex
pU18-zip	Derivado de pUC18C, fusión de zipper de leucina de GCN4 con T18	Euromedex
PKT25-zip	Derivado de pKT25, fusión de zipper de leucina de GCN4 con T25	Euromedex
pBBR1MCS-5	Vector de clonación, Gm ^r	(52)
pBSL98	Vector usado para obtener el gen de resistencia a gentamicina	(53)
pBSL97	Vector usado para obtener el gen de resistencia a kanamicina	(53)
pUMATcgusAPT	Vector con el gen <i>gusA</i> para fusiones traduccionales	(54)
pUMATcgusAT	Vector con el gen <i>gusA</i> para fusiones transcripcionales	Miguel Castañeda
pAHFUTs-R	Vector con fusión transcripcional <i>phbR-gusA</i> , Tc ^r	(15)
pAHFUTs-B	Vector con fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i> , Tc ^r	(15)
pAHFUTd-B	Vector con fusión traduccional <i>phbB-gusA</i> , Tc ^r	(15)
pJETp <i>gyrA</i>	pJET1.2 con región promotora de <i>gyrA</i>	Este trabajo
pLM2	pUMATcgusAT Gm ^r	Este trabajo
pLM3	pUMATcgusAPT Gm ^r	Este trabajo
pLM4	pLM2 con fusión transcripcional <i>arsA-gusA</i>	Este trabajo
pLM5	pLM3 con fusión traduccional <i>arsA'-gusA</i>	Este trabajo
pLM6	pLM2 con fusión transcripcional <i>arpR-gusA</i>	Este trabajo
pLM7	pLM3 con fusión traduccional <i>arpR'-gusA</i>	Este trabajo
pLM8	pBBR1MCS-5 con fusión de promotor <i>gyrA</i> y <i>arpR</i>	Este trabajo
pLM9	pAHFUTs-R Gm ^r	Este trabajo
pLM10	pAHFUTs-R Gm ^r	Este trabajo
pLM11	pET22b(+) con fusión <i>rpoS</i> -6His	Este trabajo
pLM12	pJETp <i>gyrA</i> con fusión de promotor <i>gyrA</i> y <i>clpP</i>	Este trabajo

Continuación tabla 3.

pLM13	pJET con <i>clpA</i> silvestre, Gm ^r	Este trabajo
pLM14	pJET con <i>clpA::Gm^r</i>	Este trabajo
pLM15	pJET con <i>clpP::Gm^r</i>	Este trabajo
pLM16	pJET con <i>clpX::Km^r</i>	Este trabajo
pLM17	pJET con <i>clpS::Km^r</i>	Este trabajo
pLM18	Derivado de pUC18, fusión de T18 con <i>ptsN</i> H68A	Este trabajo
pLM19	Derivado de pKT25, fusión de T25 con <i>ptsN</i> H68A	Este trabajo
pLM20	Derivado de pUC18, fusión de T218 con <i>rpoS</i>	Este trabajo
pLM21	Derivado de pKT25, fusión de T25 con <i>ptsN</i>	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo

Nombre	Secuencia	Referencia
FwarsA	CATTCTAGAGTCTGTGCTGATCCATTGAT	Este trabajo
RvarsAtrans	CATCTGCAGACATGCTTGGTTTTCCACT	Este trabajo
RvarsAtrad	CATCTGCAGAATATGACTAGCCATTTGATC	Este trabajo
FwarpR	CATTCTAGAGATAGACGAAGCATCAGCAT	Este trabajo
RvarpRtrans	CATCTGCAGGCTGTTGGTTCCACGTCT	Este trabajo
RvarpRtrad	CATCTGCAGGTTCCAGGTATCCATATGG	Este trabajo
arpRFw2	GATGGATGATCGCTTTTTG	Este trabajo
arpRRv2	AAGTTTTCTGGAACACTGC	Este trabajo
pgyrAupSacI	CGGAGCTCCCCATCGAAGAGCGTGAC	Este trabajo
pgyrAdwBamHI	CCGGATCCGTCAGCAGTGTCTCTG	Este trabajo
arsA-RT-F	CACCCTCGTCAATCTGCTC	(19)
arsA-RT-R	GATCCTGGTCTCGAAGACCTTG	(19)
arpR-RT-F	CTCCCCTGCTGGCACTC	(22)
arpR-RT-R	CGTTCCTGGAGTCTTCGAG	(22)
Fw-gyrA	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	(40)
Rv-gyrA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	(40)
clpAFw	CGAACTGACCCCTTACGAC	Muriel-Millán LF (Tesis Maestría)
clpARv	TGCGGAATGTTTACTCGTG	Muriel-Millán LF (Tesis Maestría)
clpPFw	CACGCTGGGGTTGATTG	Muriel-Millán LF (Tesis Maestría)

Continuación tabla 4.

clpPRv	CGGTAGGCTTGCAACAC	Muriel-Millán LF (Tesis Maestría)
clpXFw	GCCAACTGGTGAGTTGATCTC	Este trabajo
clpXRv	CGCGGTGGAAATGCAAAGG	Este trabajo
clpSFw	GTCTTGTAGCCATCCATCTG	Este trabajo
clpSRv	GTCTCACGCTCTTCATCGTG	Este trabajo
invclpSFw	GGTGGTAATGTTCAACGACGAC	Este trabajo
invclpSRv	CAGTGCTTGCGAACATGCTG	Este trabajo
rpoSFwExp	ATCCATATGGCTCTCAATATAAAAGCA	Este trabajo
rpoSRvexp	ATCGCGGCCGCTGGAACAGCGCATCGCTG	Este trabajo
THFwRpoSXbal	ACTTCTAGAGGCTCTCAATATAAAAGCAAAG	Este trabajo
THRvrpoSKpnl	ATCGGTACCTCACTGGAACAGCGCATC	Este trabajo
THFwptsNXbal	ACTTCTAGAGATCAGACTCGAAGACATTCTGATC	Este trabajo
THRvptsNKpnl	ATCGGTACCTTACAGGCTCTTCTGTGCG	Este trabajo

5.2 Condiciones de crecimiento.

Para el crecimiento vegetativo, las cepas de *A. vinelandii* fueron sembradas en medio mínimo de Burk (BS) (55), constituido por: 0.79 mM MgCl₂.6H₂O, 0.00083 mM NaMoO₄.2H₂O, 0.018 mM FeSO₄.7H₂O, 0.5 mM CaCl₂.2H₂O, 1.3 mM Na₂SO₄, 4.6 mM K₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄ y 2% Sacarosa; o en medio peptona (5 g/L) y extracto de levadura (3 g/L) y 2% sacarosa (PY). Los cultivos fueron incubados a 30°C.

Para la condición de enquistamiento (producción de alquilresorcinoles), inicialmente los cultivos de *A. vinelandii* fueron crecidos en medio BS por 48 horas. Las células fueron lavadas tres veces con 10 mM MgSO₄ estéril e inoculadas en medio Burk sin sacarosa adicionado con 0.2% Butanol (BBOH).

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) a 37°C. Para el ensayo de dos híbridos en *E. coli*, se adicionó IPTG 0.5 mM y X-gal 40 mg/mL.

Para las conjugaciones bacterianas se utilizó medio BS-LB (78% BS- 22% LB) adicionado con 15 mM NH₄C₂O₂H₃ (acetato de amonio) y 0.2% glucosa, libre de antibiótico. Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 24-48 horas.

5.3. Procedimientos con ácidos nucleicos.

La manipulación de DNA se realizó siguiendo los protocolos estándar descritos por Sambrook et al (51). La purificación de RNA total se realizó según lo reportado por Barry et al (56). Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se encuentran descritos en la tabla 4. Para las amplificaciones de los genes de interés por PCR, se utilizó como templado DNA cromosomal de la cepa UW136 de *A. vinelandii*.

5.4 Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de *arsA* y *arpR*.

Los plásmidos pUMATcgusAT y pUMATcgusAPT (tabla 3) fueron digeridos con las enzimas *SacI* y *KpnI* para remover el gen de resistencia a tetraciclina. Los extremos de los vectores fueron rellenados mediante el tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa para la posterior clonación del gen de resistencia a gentamicina obtenido del plásmido pBSL98 (53) mediante la digestión con *MluI*. Los nuevos plásmidos pLM2 y pLM3 fueron usados para la construcción de las fusiones transcripcionales y traduccionales, respectivamente.

Para la construcción de las fusiones transcripcionales de *arsA* y *arpR* con *gusA* se amplificaron fragmentos de ADN de 1.0 y 0.99 kb, que contenían la región promotora de *arsA* y *arpR*, respectivamente. Los fragmentos fueron purificados de gel de agarosa, digeridos con *XbaI* y *PstI* y clonados en el vector pLM2 (previamente digerido con las mismas enzimas) para obtener los plásmidos pLM4 (*arsA-gusA*) y pLM6 (*arpR-gusA*). Estos plásmidos fueron linealizados con *NdeI* y *ScaI*, respectivamente y usados para transformar las cepas de *A. vinelandii*, con el fin de obtener transformantes que portaran las fusiones transcripcionales de *arsA-gusA* o *arpR-gusA* integradas en el cromosoma en el gen *melA* por evento de doble recombinación. Los plásmidos fueron digeridos para evitar la selección de transformantes con plásmidos integrados en el cromosoma, debido a eventos de

recombinación sencilla. El gen *mela* ha sido previamente usado como región neutral del cromosoma de *A. vinelandii* para introducir fusiones génicas (54).

Para las fusiones traduccionales *arsA*'-'*gusA* y *arpR*'-'*gusA*, fragmentos de DNA de 1.3 y 1.1 kb (que contienen la región promotora, la región 5' no traducida y los primeros 5 codones de cada gen) fueron amplificados para *arsA* y *arpR*, respectivamente. Los productos de PCR fueron purificados, digeridos con *XbaI* y *PstI* y ligados al vector pLM3, resultando en los plásmidos pLM5 (*arsA*'-'*gusA*) y pLM7 (*arpR*'-'*gusA*), los cuales fueron digeridos con *NdeI* y *ScaI*, respectivamente y usados para transformar las cepas de *A. vinelandii*.

5.5 Construcción del plásmido pB*gyrA*-*arpR* para la expresión de *arpR* independiente de RpoS.

Inicialmente se construyó el plásmido pJET-*gyrA*, clonando un fragmento de DNA de 0.3 kb que contiene la región promotora del gen *gyrA* (*pgyrA*) en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific). Por PCR, se amplificó un fragmento de DNA de 1.0 kb que contiene la región codificante de *arpR* y se clonó en el vector pJET-*gyrA* (previamente digerido con *BamHI*), corriente abajo y en la misma dirección de *pgyrA*. La fusión *pgyrA*-*arpR* fue escindida mediante la digestión con *BglIII*, purificada por gel, rellenada en los extremos y clonada en el plásmido pBBR1MCS-5 digerido con *SmaI*. El plásmido construido pB*gyrA*-*arpR* fue transferido por conjugación a la cepa UW136::pALA8a.

5.6 Medición de los niveles de transcritos de *arsA* y *arpR* por PCR en tiempo real.

Se extrajo RNA total a partir de cultivos de cepas de *A. vinelandii* crecidas en medio líquido BBOH por 30 horas. 5 µg de RNA de cada muestra fueron tratados con DNAsa para eliminar el DNA cromosomal remanente.

Se obtuvo DNA complementario (cDNA) de los transcritos de los genes blanco y del gen *gyrA* (usado como control interno) preparando la siguiente reacción: 5 µg de RNA, 2 µL de oligonucleótidos reverso (tabla 3) a una concentración final de 20 picomol y 6 µL de H₂O estéril; esta mezcla fue incubada a 65°C por 5 minutos e inmediatamente después colocada en hielo por 2 minutos. Posteriormente se le adicionaron 4 µL de buffer de reacción (5X), 1 µL de inhibidor de ribonucleasa (20 u/µL), 2 µL de dNTPs (10 mM) y 1 µL de reverso transcriptasa Thermo Scientific® (200 U/µL). La mezcla se incubó por 1 hora a 42°C. Terminado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con un choque de calor a 70 °C por 10 minutos.

Mediante PCR en tiempo real, empleando el equipo Light Cycler 480 II de Roche®, se realizó la cuantificación indirecta de transcritos preparando la siguiente mezcla para cada muestra: 10 µL de SYBRGREEN (Thermo Scientific®), 1 µL de cDNA (5 ng), 1 µL de oligonucleótido iniciador (Fw) (250 nM), 1 µL de oligonucleótido reverso (250 nM) y 7 µL de H₂O estéril. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 1 ciclo a 95 °C por 15 segundos y 1 ciclo a 60 °C por 1 min; los dos últimos ciclos se repitieron 40 veces. Se emplearon controles negativos los cuales consistieron en la misma reacción anterior sin adicionar cDNA. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. El nivel de transcritos de *gyrA* fue usado como control interno para normalizar los niveles de los transcritos de los genes a evaluar. Los datos fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Schmittgen (57).

5.7 Complementación de la mutación en *clpP*.

El gen *clpP* se amplificó usando los oligonucleótidos clpPFW y clpPRV (tabla 4). Los fragmentos de DNA fueron clonados en el vector pJET-pgyrA, corriente abajo y el mismo sentido del promotor de *gyrA*. La fusión *pgyrA-clpP* fue escindida mediante la digestión con la enzima *Bgl*III, rellenada en los extremos, purificada de gel y clonada en el vector pBBR1MCs-5 en el sitio *Sma*I. El nuevo vector pLM12

(pBpgyrA-clpP) fue transferido mediante conjugación a las cepas de *A. vinelandii* clpP⁻ y ptsP-clpP⁻.

5.8 Construcción de mutantes en clpX y clpS.

Los oligonucleótidos clpXFw y clpXRv (tabla 4) fueron utilizados para amplificar un fragmento de DNA de 1439 pb, que contenía al gen *clpX*, el cual fue clonado en el vector pJET 1.2. El gen de resistencia a kanamicina obtenido del plásmido pBSL97 (53), fue insertado en un sitio único *Sall* dentro de *clpX* en el mismo sentido de la transcripción del gen. Para la mutación en *clpS*, se utilizaron los oligonucleótidos clpSFw y clpSRv (tabla 4) para amplificar un fragmento de 976 pb y fue clonado en el plásmido pJET1.2. El plásmido resultante (pJET-clpS) fue utilizado como templado para realizar un PCR inverso utilizando los oligonucleótidos invclpSFw e invclpSRv (tabla 4), con el fin de eliminar un fragmento de 109 pb de la región codificante de *clpS* e insertar el gen de resistencia a kanamicina. Los dos plásmidos construidos pLM16 y pLM17 fueron linealizados mediante digestión con *ScaI* y utilizados para transformar las cepas de *A. vinelandii* UW136 y ptsP⁻.

5.9 Expresión y purificación de RpoS de A. vinelandii.

Los oligonucleótidos rpoSFwexp y rpoSRvexp (tabla 4) fueron usados para amplificar un fragmento de DNA de 1.0 kb, que contiene la región codificante de *rpoS*. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *NdeI* y *NotI* para ser ligado en el vector pET22b (Novagen), previamente digerido con las mismas enzimas, dando como resultado el plásmido pET22b-rpoS (tabla 3).

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) fue utilizada para expresar la proteína RpoS-6His. La cepa fue crecida a 37°C toda la noche en medio líquido LB adicionado con 200 µg/mL ampicilina. Al día siguiente, 50 mL de LB fueron inoculados con 500 µL del preinóculo e incubados a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ 0.4-0.6, se adicionó IPTG a una concentración final en el medio de 0.3 mM y se incubó

nuevamente a 37°C durante 3 horas más. La proteína RpoS-6His fue purificada empleando agarosa-Ni-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Qiagen), concentrada y dializada contra buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4 estéril, usando un Amicon® de 10 kDa (Millipore).

5.10 Producción de antisuero anti-RpoS en conejo.

La proteína RpoS-6His en PBS estéril fue utilizada para producir anticuerpos en conejo. Con previa autorización por parte del comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se empleó el siguiente protocolo de inmunización:

Día	Intervalo	Procedimiento
1	-	Toma de muestra suero preinmune (1 mL).
1	-	Primera inoculación vía subcutánea de mezcla 1:1 de proteína purificada con adyuvante completo de freund a un volumen final de 1 mL. Este volumen se distribuyó en tres regiones diferentes del dorso del animal.
16	15 días	Segunda inoculación vía subcutánea de mezcla 1:1 de proteína purificada con adyuvante incompleto de freund a un volumen final de 1 mL. Este volumen se distribuyó en tres regiones diferentes del dorso del animal.
32	16 días	Tercera inoculación vía subcutánea de mezcla 1:1 de proteína purificada con adyuvante incompleto de freund a un volumen final de 1 mL Este volumen se distribuyó en tres regiones diferentes del dorso del animal.
42	8 días	Primera colección de muestra sanguínea para determinación de títulos anti-RpoS y Western-blot de RpoS de <i>A. vinelandii</i> .
48	9 días	Cuarta inoculación vía subcutánea de mezcla 1:1 de proteína purificada con adyuvante incompleto de freund a un volumen final de 1 mL. Este volumen se distribuyó en tres regiones diferentes del dorso del animal.
56	8 días	Segunda colección de muestra sanguínea para determinación de títulos anti-RpoS y evaluación de sangrado final.
		Sacrificio del conejo mediante sobredosis de anestesia para colección final de muestra.

5.11 Determinación de niveles y estabilidad de RpoS por Western-blot.

A partir de cultivos crecidos en medio líquido de PY o BBOH, 20 µg de proteína total fueron mezclados con el buffer de carga para SDS-PAGE y calentados a 95°C por 10 minutos. Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham). La proteína RpoS fue detectada usando el antisuero policlonal RpoS-6His a una dilución 1:2000 en Buffer Salino Tris (TBS) pH 7.5, adicionado con 0.1% Tween 20 (TBST), seguido por un anticuerpo anti-conejo IgG conjugado a fosfatasa alcalina (Abcam) a una dilución 1:10000 en TBST. Las membranas fueron reveladas mediante el kit BCIP/NBT (Invitrogen).

Para la determinación de la estabilidad in vivo de RpoS, las cepas fueron crecidas en medio líquido PY durante 48 horas. La síntesis de proteínas fue bloqueada mediante la adición de espectinomicina a una concentración final de 1 mg/mL, o gentamicina 0.5 mg/mL en el caso de la cepa *ptsO*⁻ (Spr). Se tomaron muestras a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos luego de la adición del antibiótico y se trataron como se describió anteriormente. Los niveles relativos de RpoS fueron calculados mediante densitometría usando el programa ImageJ (58).

5.12 Ensayo de dos híbridos en *Escherichia coli* para la determinación de interacción entre EIIA^{Ntr} y RpoS.

Se empleó el sistema de dos híbridos en *E. coli* basado en la reconstitución de la actividad de la adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella pertussis* (BACTH) (59). El dominio catalítico de CyaA está conformado por dos fragmentos complementarios T25 y T18 (fig. 14A), los cuales al estar separados no son funcionales (fig. 14B). Cuando estos fragmentos son fusionados a proteínas que interaccionan entre sí (X y Y), la heterodimerización de las proteínas híbridas permite que T25 y T18 se encuentren lo suficientemente cerca reconstituyendo su actividad de sintetizar cAMP (fig. 14C), el cual junto con la proteína CAP activan la

transcripción del gen reportero *lacZ* (fig. 14D). La cepa utilizada para este ensayo fue la *E. coli* BTH101 (Tabla 2).

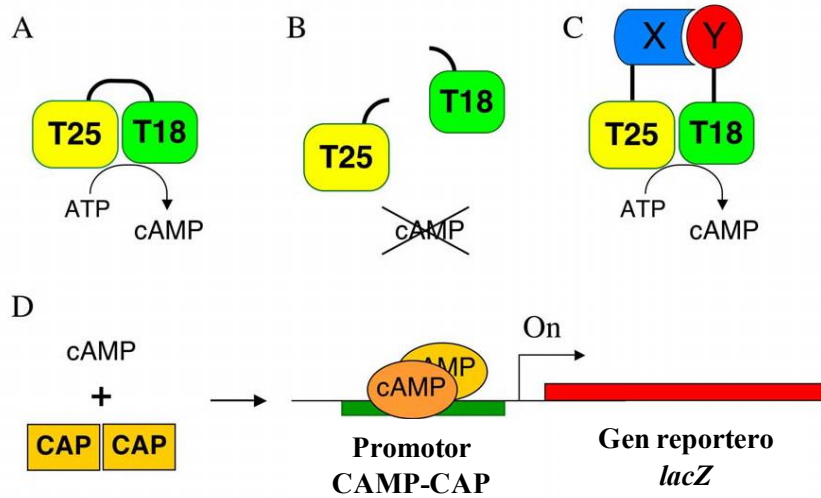


Figura 14. Principio del sistema de dos híbridos basado en la reconstitución de la actividad de adenilato ciclasa de *B. pertussis* (Euromedex).

Los oligonucleótidos THFwRpoSXbaI, THRvrpoSKpnI, THFwptsNXbaI y THRvptsNKpnI (tabla 4) fueron utilizados para amplificar fragmentos de DNA con la secuencia codificante de *rpoS*, *ptsN* y *ptsN* H68A. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *XbaI* y *KpnI* para su clonación en los vectores pUC18C y pKT25 (tabla 3). Los plásmidos resultantes fueron secuenciados para confirmar que la fusión de los fragmentos T18 y T25 con los genes de interés estuviera en fase de traducción y fueron introducidos a células de *E. coli* BTH101 quimiocompetentes. Las células transformantes fueron seleccionadas en medio LB adicionado con 40 µg/mL de X-gal y, kanamicina y ampicilina, 30 y 200 µg/mL, respectivamente.

5.13 Cuantificación de poli-β-hidroxibutirato y alquilresorcinoles.

La cuantificación de PHB se realizó mediante el método espectrofotométrico de Law y Slepecky (60), basado en la conversión de PHB a ácido crotónico en ácido sulfúrico concentrado. Las células fueron cosechadas de medio solido PY a las 72 horas de incubación y resuspendidas en 10 mM MgSO₄. 50 µL de cada suspensión fueron mezclados con 1 mL de hipoclorito al 30% e incubados a 37°C durante una

hora. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos, lavadas con 1 mL de agua y centrifugadas nuevamente. Se hicieron dos lavados posteriores con etanol absoluto y acetona. Una vez secas las pastillas de PHB, fueron resuspendidas en 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y calentadas durante 10 minutos a 95°C. La densidad óptica de las muestras fue determinada a una longitud de onda de 235 nm.

El fenotipo de síntesis de ARs fue determinado en células crecidas en filtros de 0.22 μm previamente colocados sobre la superficie del medio sólido BBOH. Las células fueron teñidas con una solución del colorante Fast Blue B (0.5% Fast Blue B y 5% de ácido acético) (61). El colorante Fast Blue B, por ser una sal de diazonio, forma un acoplamiento diazoico (N=N) con el anillo fenólico de los ARs, por lo tanto las células que producen ARs retienen el colorante (tinción roja).

Los ARs fueron cuantificados de acuerdo a lo reportado por Segura et al (19). Los ARs fueron extraídos con acetona por 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas y la acetona fue removida y se realizó una segunda extracción por 12 horas a temperatura ambiente. Los extractos fueron mezclados y usados para la determinación espectrofotométrica usando el colorante Fast Blue B. Se realizó una curva estándar de orcinol para determinar la concentración de ARs (10). Para todos los experimentos, la proteína fue cuantificada por el método de Lowry et al (62).

CAPÍTULO 6. RESULTADOS.

6.1 Caracterización del efecto de PTS^{Ntr} sobre la síntesis de ARs en *A. vinelandii*.

6.1.1 Efecto de las mutaciones en los genes *pts* sobre la síntesis de ARs.

Con el fin de caracterizar el efecto de PTS^{Ntr} sobre la síntesis de ARs, se decidió determinar su producción en cada una de las mutantes *pts*. Como se observa en la figura 15, las mutaciones en los genes *ptsP* y *ptsO* abatieron la síntesis de ARs, mientras que una mutación en *ptsN* aumentó los niveles de los lípidos fenólicos en comparación con la cepa silvestre. De acuerdo a la cascada de fosforilación propuesta para PTS^{Ntr}, las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* interrumpen la transferencia del grupo fosfato hacia EIIA^{Ntr} (40), por lo tanto la forma no fosforilada de EIIA^{Ntr} podría estar implicada en el efecto negativo observado sobre la síntesis de ARs. De acuerdo a lo anterior la inactivación del gen *ptsN* en la cepa *ptsP* (doble mutante *ptsP-ptsN*) restauró los niveles de ARs (fig. 15).

6.1.2 Efecto de las mutaciones en los genes *pts* sobre la expresión de *arsA*.

Con el objetivo de identificar si PTS^{Ntr} afecta la síntesis de ARs a través de un efecto sobre la expresión del operón *arsABCD*, se emplearon fusiones transcripcionales y traduccionales de *arsA* con el gen reportero *gusA*, las cuales fueron integradas en el cromosoma de las respectivas cepas. Como se observa en la figura 16, las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyeron de manera similar la actividad β -glucuronidasa de ambas fusiones, mientras que la mutación en *ptsN* incrementó la actividad de las fusiones transcripcional y traduccional aproximadamente en un 27 y 60%, respectivamente, en comparación con lo exhibido por la cepa silvestre. En la doble mutante *ptsP-ptsN*, la actividad β -glucuronidasa de la fusión transcripcional *arsA-gusA* se restauró parcialmente, mientras que la actividad de la fusión traduccional fue similar a la presentada por la cepa silvestre (fig. 16).

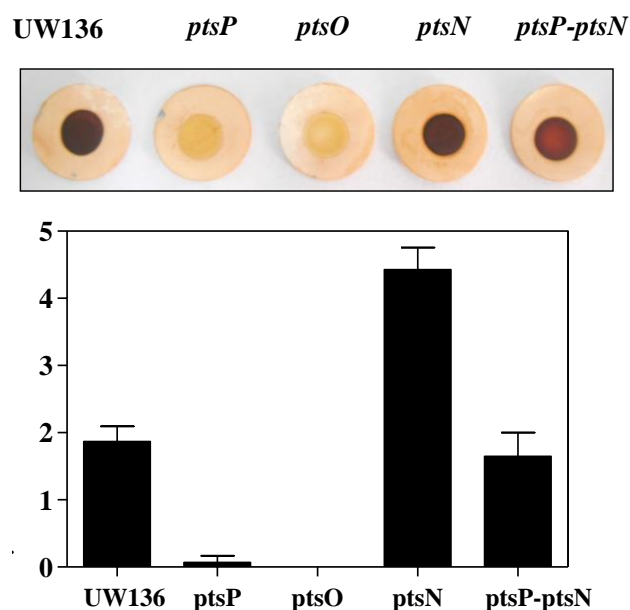


Figura 15. Fenotipo y cuantificación de síntesis de ARs en la cepa silvestre UW136 y mutantes *pts*. Las células fueron crecidas en BBOH por 120 horas a 30°. En la parte de arriba se observan células de cada cepa teñidas con el colorante Fast Blue B, en filtros de 0.22 μm previamente puestos sobre la superficie del medio sólido. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error; Desviación Estándar (DE).

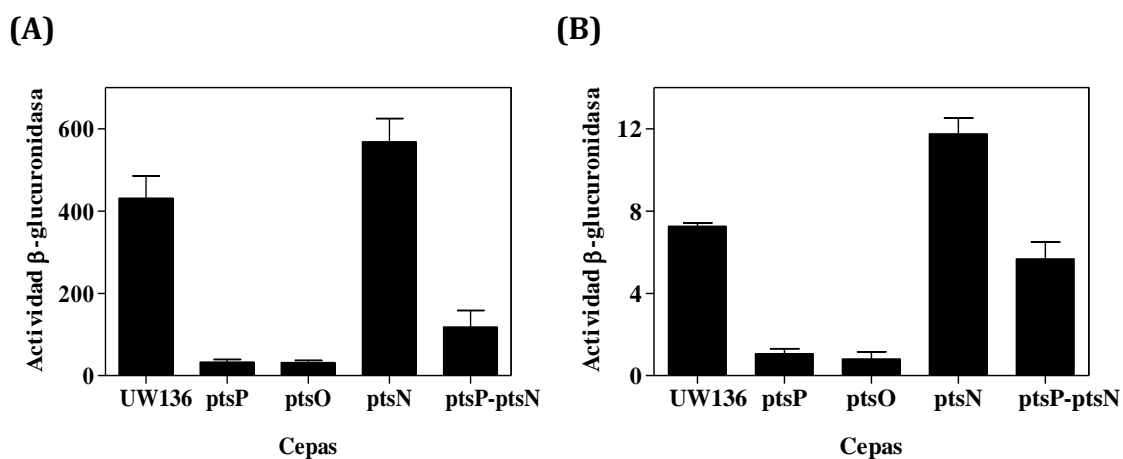


Figura 16. Actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcional (A) y traduccional (B) de *arsA-gusA* en la cepa silvestre UW136 y mutantes *pts*. Las células fueron crecidas en líquido BBOH por 72 horas. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error; (DE).

El nivel de transcritos de *arsA* en las mutantes *pts* también se evaluó mediante qPCR. En la tabla 5 se muestra que las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyeron drásticamente los niveles de mRNA de *arsA*, mientras que la mutación en *ptsN* los aumentó en las cepas UW136 y *ptsP*⁻. Estos resultados sugieren que la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada reprime la expresión de *arsA* principalmente a nivel transcripcional.

Tabla 5. Niveles relativos de transcritos de *arsA* y *arpR* en las cepas UW136 y mutantes *pts*.

Cepa	Niveles relativos de mRNA	
	<i>arsA</i>	<i>arpR</i>
UW136	1.0 ± 0.	1.0 ± 0.
<i>ptsP</i>	0.043 ± 0.007	0.021 ± 0.003
<i>ptsO</i>	0.099 ± 0.003	0.005 ± 0.003
<i>ptsN</i>	2.07 ± 0.24	2.7 ± 0.2
<i>ptsP-ptsN</i>	1.62 ± 0.10	1.3 ± 0.1

Los niveles de mRNAs de *arsA* y *arpR* en las mutantes *pts* son relativos a los mostrados por la cepa UW136, los cuales son asumidos para ser 1.0. Los valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

6.1.3 Efecto de las mutaciones en los genes *pts* sobre la expresión de *arpR*.

Recientemente en nuestro grupo se identificó que la transcripción de *arsABCD* es directamente activada por el regulador ArpR (21). Por lo tanto se quiso identificar si PTS^{Ntr} afecta la transcripción de *arsABCD* mediante la regulación de la expresión de *arpR*.

La figura 17A presenta que las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyeron alrededor del 40% la actividad β-glucuronidasa de la fusión transcripcional *arpR-gusA*, mientras que la mutación en *ptsN* no afectó la transcripción de *arpR* en las

cepas UW136 y *ptsP*. En contraste, las mutantes *ptsN* y *ptsP-ptsN* presentaron un aumento significativo en la actividad β -glucuronidasa de la fusión traduccional *arpR-gusA*, con respecto a lo presentado por la cepa silvestre y la mutante *ptsP*, respectivamente (fig. 17B). Mediante qPCR se determinó que las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyeron el nivel de transcritos de *arpR*, mientras que la inactivación de *ptsN* lo aumentó en la cepa silvestre y la mutante *ptsP* (tabla 5). Estos resultados sugieren que EIIA^{Ntr} no fosforilada regula negativamente la expresión de *arpR* a niveles transcripcional y post-transcripcional.

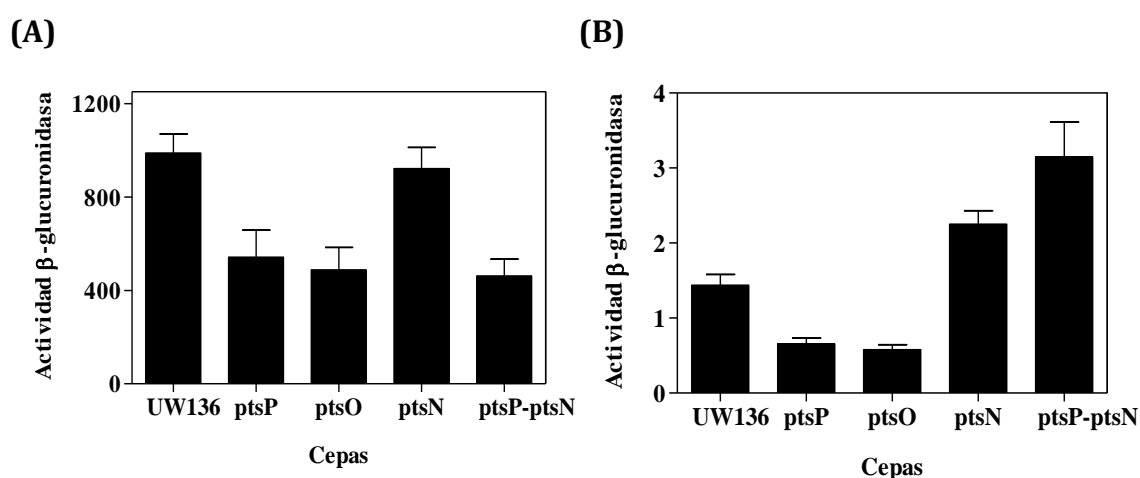


Figura 17. Actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcional (A) y traduccional (B) de *arpR-gusA* en la cepa silvestre UW136 y mutantes *pts*. Las células fueron crecidas en líquido BBOH por 72 horas. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error; (DE).

6.1.4 La mutación H68A en el sitio de fosforilación de EIIA^{Ntr} disminuye la transcripción de *arpR*.

Los resultados anteriores sugieren que EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado ejerce el efecto negativo sobre la síntesis de ARs. Para confirmar lo anterior, se determinó la capacidad de producción de ARs de la cepa UW136::pALA8a, la cual contiene integrado en el cromosoma el gen *ptsN* con la mutación puntual H68A, expresando una proteína EIIA^{Ntr} no fosforilable (40).

Como se observa en la figura 18A, la cepa UW136::pALA8a presentó un fenotipo negativo de síntesis de ARs, contrario a la cepa que contiene a EIIA^{Ntr} silvestre (UW136::pALA7)(40). Este fenotipo fue debido a que la proteína EIIA^{Ntr} H68A disminuyó drásticamente la transcripción de *arsA* y parcialmente la transcripción de *arpR* (fig. 18B).

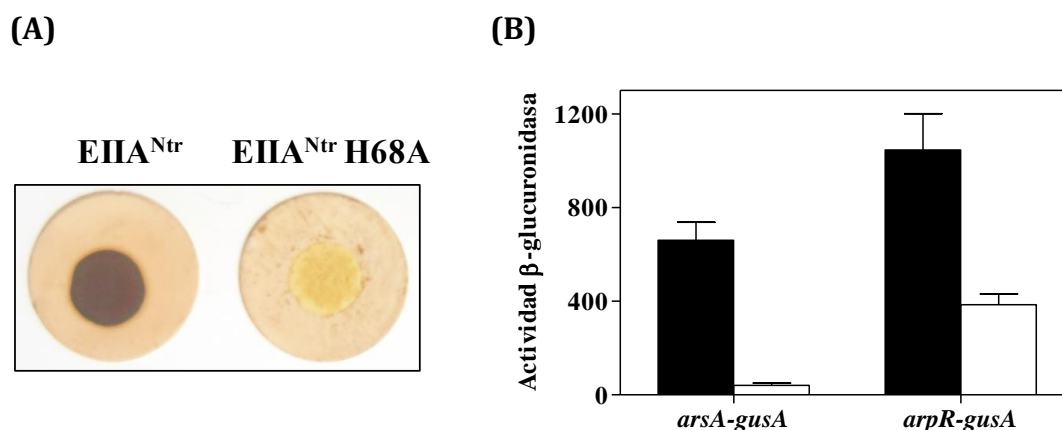


Figura 18. Fenotipo de síntesis de alquilresorcinoles (A) y actividad β-glucuronidasa de las fusiones transcripcionales *arsA-gusA* y *arpR-gusA* (B) en las cepas UW136::pALA7 (barras negras) y UW136::pALA8a (barras blancas), las cuales contienen a EIIA^{Ntr} y EIIA^{Ntr} H68A, respectivamente. Las células fueron crecidas en medio líquido BBOH por 72 horas. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error; (DE).

6.1.5 La poza de acetoacetyl-CoA en *A. vinelandii* no es afectada por EIIA^{Ntr} no fosforilada.

Como se mencionó anteriormente, acetoacetyl-CoA es coinductor de ArpR, su adición al medio de crecimiento vegetativo induce la expresión tanto de *arsABCD* como de *arpR* y por lo tanto la síntesis de ARs (21). De acuerdo a lo anterior, EIIA^{Ntr} no fosforilada podría afectar la expresión de *arpR* y la síntesis de ARs mediante un efecto sobre la poza de acetoacetyl-CoA en *A. vinelandii*. Esta hipótesis fue descartada debido a que la presencia de 5 y 50 μM de acetoacetyl-CoA en medio BBOH sólido no restauró el fenotipo de síntesis de ARs en las cepas *ptsP*, *ptsO* y UW136::pALA8a (EIIA^{Ntr} no fosforilable) (fig. 19). Al contrario, en las cepas UW136, *ptsN* y en menor medida en la *ptsP-ptsN*, se observó un aumento en el fenotipo de síntesis de ARs dependiente de la concentración de acetoacetyl-CoA (fig. 19). Estos resultados

indican que EIIA^{Ntr} no fosforilada no afecta la expresión de *arpR* mediante una disminución de la poza de acetoacetyl-CoA.

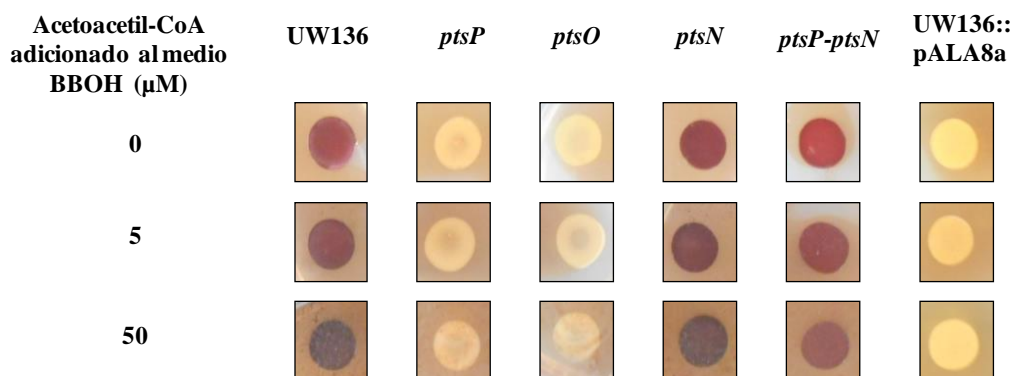


Figura 19. Efecto de la adición de acetoacetyl-CoA al medio BBOH sobre el fenotipo de síntesis de ARs en la cepa silvestre UW136 y las mutantes *pts* de *A. vinelandii*. Las células fueron teñidas con una solución del colorante Fast Blue B a las 72 horas de incubación.

6.1.6 El efecto negativo de EIIA^{Ntr} H68A sobre la transcripción de *arpR* es dependiente de RpoS.

Una mutación en *rpoS* abate la síntesis de ARs debido a que la transcripción de *arpR* disminuye drásticamente. La expresión de *arpR* a partir de un promotor independiente de RpoS es suficiente para restaurar la síntesis de ARs en una mutante *rpoS*⁻ (21). De acuerdo a lo anterior se decidió determinar si EIIA^{Ntr} no fosforilada afecta la expresión de *arpR* mediante un efecto sobre el factor sigma. Para esto se determinó la capacidad de síntesis de ARs de la cepa UW136::pALA8a portando un plásmido (pBp*gyrA-arpR*) el cual expresa el gen *arpR* a partir de un promotor independiente de RpoS (promotor de *gyrA*). Como se observa en la figura 20A, esta cepa fue capaz de producir ARs en medio BBOH sólido. Al contrario, cuando la cepa UW136::pALA8a fue transformada con el plásmido vacío pBBR1MCs-5, presentó un fenotipo negativo de síntesis de ARs. En medio líquido, se presentó un efecto similar; la expresión de *arpR* independiente de RpoS aumentó los niveles de ARs en la cepa que contiene a EIIA^{Ntr} H68A no fosforilable (fig. 20B).

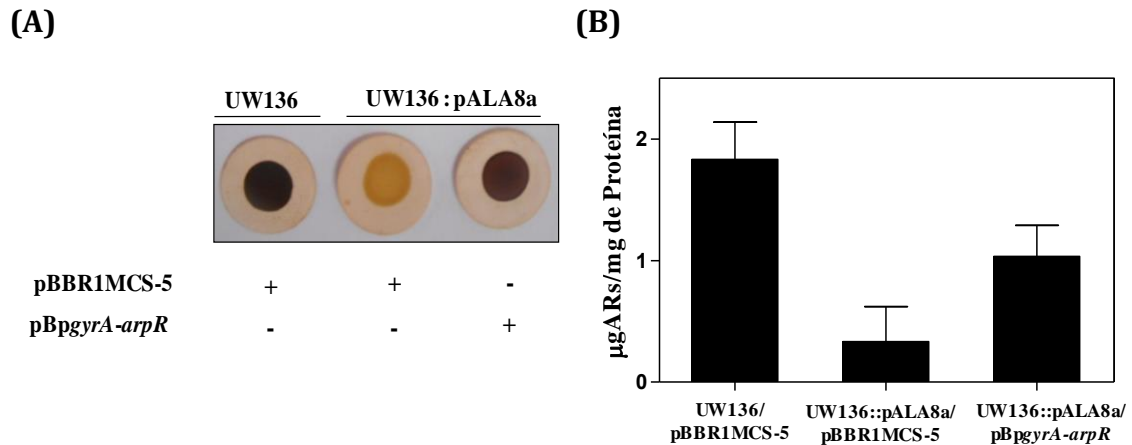


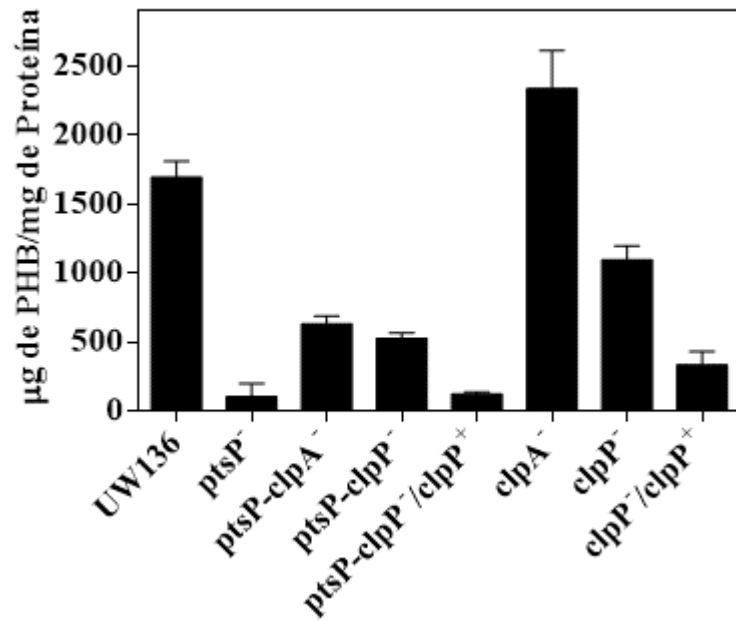
Figura 20. Efecto la expresión de *arpR* a partir de un promotor independiente de RpoS en el fenotipo de síntesis (A) y niveles (B) de ARs en la cepa que contiene la proteína EIIA^{Ntr} H68A no fosforilable. Las células fueron crecidas en medio sólido (A) o líquido (B) BBOH por 120 horas. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error; (DE).

6.2 Estudio de la relación entre EIIA^{Ntr} y ClpAP en la regulación de la síntesis de PHB y ARs.

6.2.1 Las mutaciones en *clpA* y *clpP* restauran parcialmente la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*.

Como se mencionó anteriormente, las mutaciones en los genes *clpA* y *clpP* (que codifican para el complejo ClpAP) restauran la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP* (fig. 12). Este efecto fue de manera parcial; la mutante *ptsP-clpA*⁻ acumuló alrededor del 35% de PHB y ARs con respecto a lo producido por la cepa silvestre y la cepa *ptsP-clpP*⁻ lo hizo en un 30% de PHB y 55% de ARs. (fig. 21). La mutante *clpA*⁻ presentó un aumento de PHB cerca del 37% y una disminución de ARs del 25%, mientras que la mutación en *clpP* disminuyó los niveles de PHB y ARs en la cepa UW136 (fig. 21).

(A)



(B)

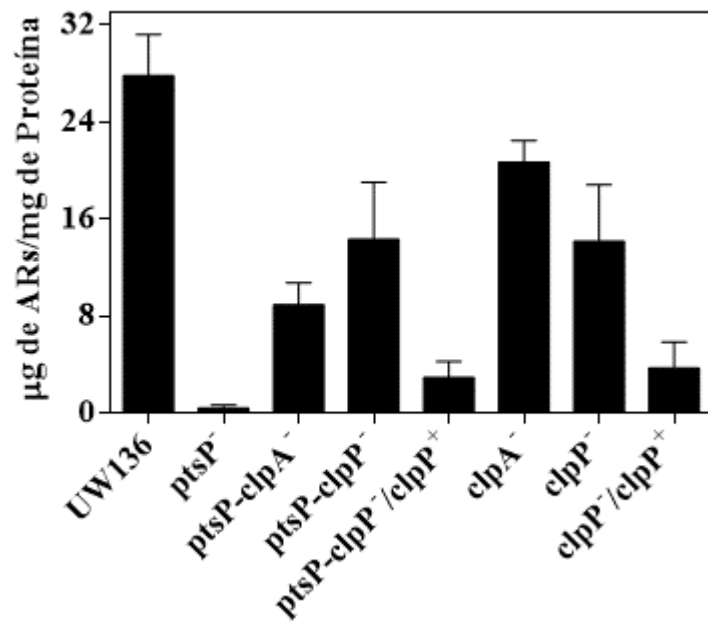


Figura 21. Efecto de las mutaciones en *clpA* y *clpP* sobre los niveles de PHB (A) y ARs (B) en *A. vinelandii*. Las células fueron crecidas en medio sólido PY por 72 horas (A) y en medio sólido BBOH por 120 horas (B). Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes, barras de error; DE.

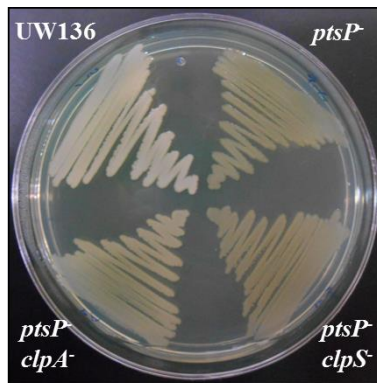
6.2.2 Complementación de la mutación en *clpP*

Para confirmar el efecto negativo que ejerce ClpP sobre la síntesis de PHB y ARs en la mutante *ptsP*⁻, se complementaron las cepas *clpP*⁻ y *ptsP-clpP*⁻ con el plásmido pLM12 (tabla 3), el cual se replica en *A. vinelandii* y contiene el gen *clpP* que se transcribe a partir de un promotor constitutivo (promotor de *gyrA*). La complementación en *trans* con *clpP*, redujo los niveles de PHB y ARs en la cepa *ptsP-clpP*⁻, similares a los mostrados por la mutante *ptsP*⁻, mientras que la complementación de la cepa *clpP*⁻, redujo aún más los niveles de ambos compuestos (fig. 21). Estos resultados confirman que el complejo ClpAP está asociado al efecto negativo que produce la mutación en *ptsP* sobre la producción de PHB y ARs en *A. vinelandii*.

6.2.3 La mutación en *clpS* no restaura la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*⁻.

El complejo ClpAP participa en la vía N-end rule, la cual relaciona la estabilidad de una proteína de acuerdo al aminoácido presente en su extremo N-terminal. ClpS es una proteína adaptadora de ClpA, la cual reconoce los substratos de degradación (que presentan aminoácidos desestabilizantes) y se los presenta a la chaperona (45). De acuerdo a lo anterior, se determinó si ClpS también está asociado al efecto negativo sobre la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*⁻. Como se observa en la figura 22, la mutación en *clpS* no restauró el fenotipo de síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*⁻. Estos resultados sugirieron que el efecto negativo que ejerce la proteasa ClpAP sobre la síntesis de PHB y ARs, en la mutante *ptsP*⁻, es independiente de la proteína ClpS.

(A)



(B)

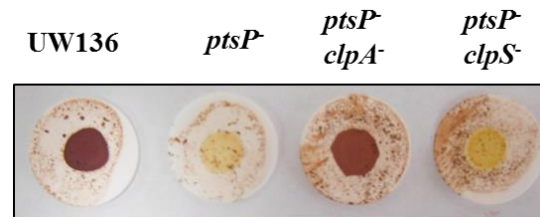


Figura 22. La mutación en *clpS* no restaura la síntesis de PHB (A) y ARs (B) en la cepa *ptsP*⁻ de *A. vinelandii*. Las células fueron crecidas en medio sólido PY (A) o BBOH (B) por 72 horas a 30°C.

6.2.4 PTS^{Ntr} afecta los niveles de proteína de RpoS en *A. vinelandii*.

Debido a que la mutación en el gen *ptsP* disminuye la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs (figs. 16 y 17) (39), un mecanismo por el cual la proteasa ClpAP podría afectar la producción de ambos compuestos es la degradación de un activador transcripcional de los genes de PHB y ARs. Previamente en nuestro grupo se identificó que la transcripción de *phbR*, *phbB* y *arpR* es dependiente del factor sigma RpoS (13, 14, 21). Adicionalmente, en *E. coli* RpoS es reconocido y degradado por ClpP, principalmente durante la fase exponencial mediante previo reconocimiento por la chaperona ClpX (pero no por ClpA) (49). Por lo tanto se decidió investigar si la mutación en *ptsP* afecta los niveles de proteína de RpoS.

Mediante ensayos de Western-blot se determinó que en la mutante *ptsP*, el nivel de RpoS está reducido aproximadamente en un 50%, comparado con el nivel observado en la cepa silvestre UW136, en condiciones de síntesis de PHB y ARs (fig. 23). Como se esperaba, la mutación en *clpP* aumentó los niveles del factor sigma en las cepas UW136 y *ptsP*, sugiriendo que al igual como sucede en otras bacterias, en *A. vinelandii* RpoS es un sustrato de la proteasa ClpP. Inesperadamente, la mutación

en *clpA* también restauró los niveles de RpoS en la mutante *ptsP*, mientras que en la cepa UW136 no tuvo algún efecto (fig. 23).

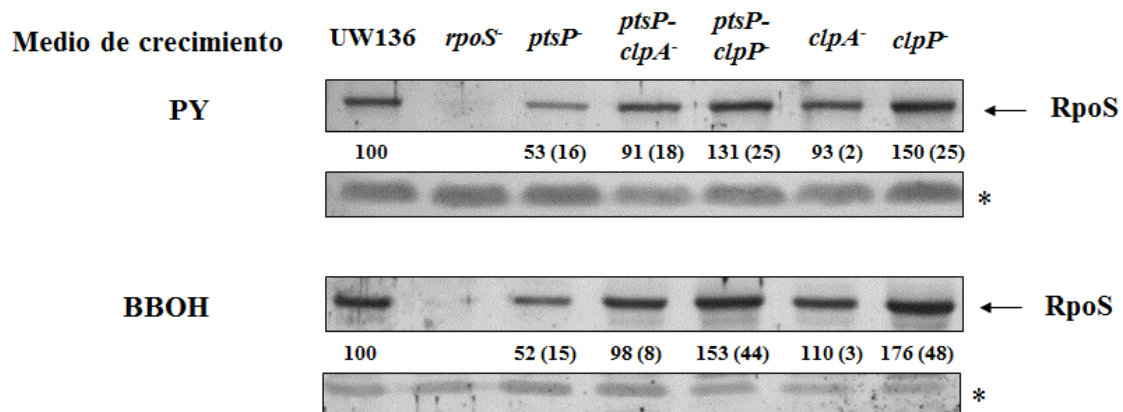
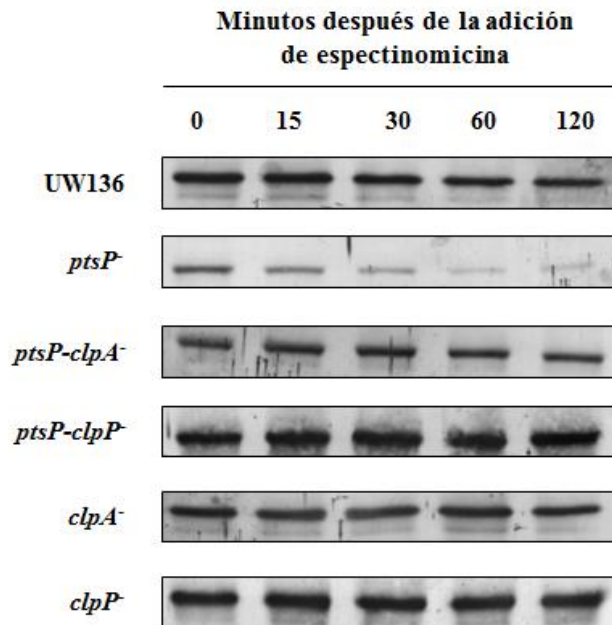


Figura 23. Detección de RpoS en cepas de *A. vinelandii* crecidas en medio líquido PY o BBOH por 48 horas. Los números indican el porcentaje relativo de RpoS con respecto a la cepa silvestre los cuales son asumidos como 100%. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes con su desviación estándar (números en paréntesis). * Control de carga (interacción inespecífica del suero anti-RpoS).

Adicionalmente se determinó la estabilidad in vivo de RpoS en fase estacionaria. Después de la inhibición de la síntesis de proteínas (adición de espectinomicina), en la cepa UW136, RpoS presentó una vida media mayor a 120 minutos, mientras que en la mutante *ptsP*, está disminuyó considerablemente a <30 mins (fig. 24). En la cepa silvestre no se logró determinar si las mutaciones en *clpP* y *clpA* aumentan la estabilidad de RpoS, sin embargo en la mutante *ptsP*, la inactivación de *clpA* o *clpP* restauró la vida media del factor sigma a valores silvestres (fig. 24).

(A)



(B)

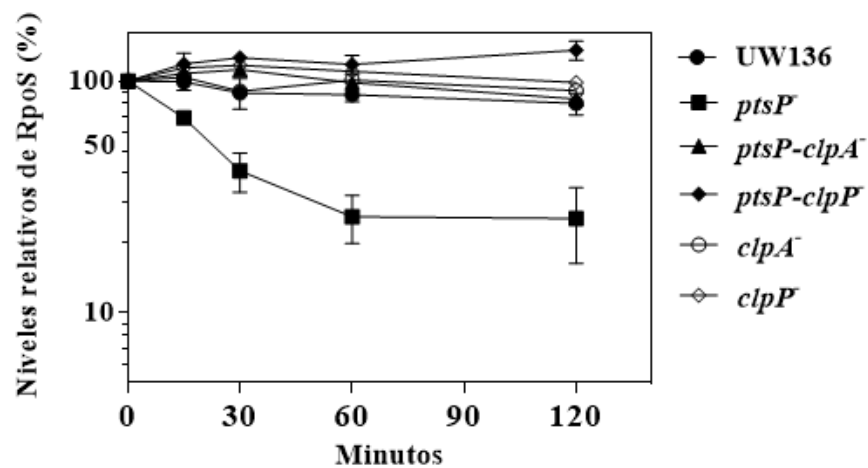
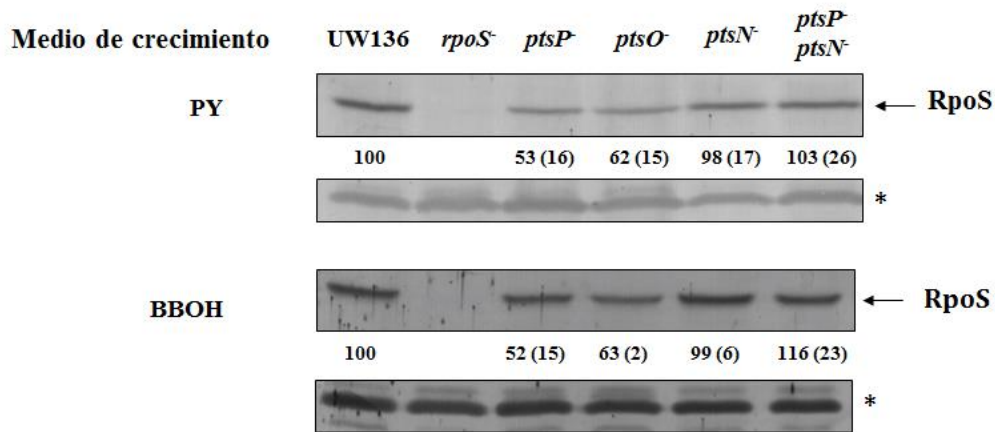


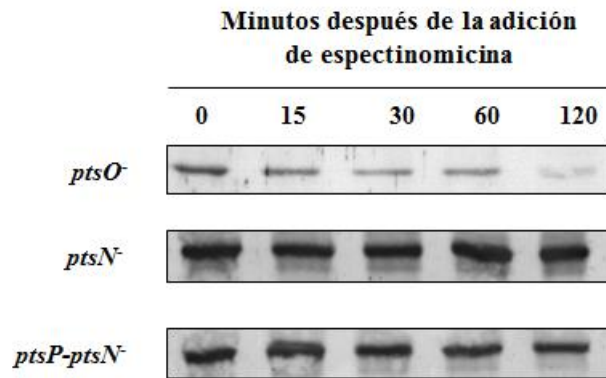
Figura 24. La mutación en *ptsP* disminuye la estabilidad de RpoS en *A. vinelandii*. (A) Las células fueron crecidas en medio PY líquido por 48 horas. La síntesis de proteínas fue bloqueada con la adición de espectinomicina (1mg/mL), RpoS fue detectado por Western-blot. (B) Análisis por densitometría del experimento del panel A. La densidad del tiempo cero fue asumida para ser 100%. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes.

Adicionalmente, se investigó si los otros componentes de PTS^{Ntr} también afectan los niveles de RpoS. Similar a la mutación en *ptsP*, la inactivación de *ptsO* redujo los niveles de proteína y su estabilidad (fig. 25). Este resultado correlaciona con el fenotipo negativo de síntesis de PHB y ARs exhibido por la cepa *ptsO* (ref. 41, fig. 15). La mutación en *ptsN* (EIIA^{Ntr}) restauró los niveles y vida media de RpoS en la mutante *ptsP*⁻, mientras que en la cepa UW136 no afectó la cantidad de proteína (figs. 25). Debido a que las mutaciones en *ptsP* o *ptsO* interrumpen la transferencia del grupo fosfato a EIIA^{Ntr}, estos resultados sugieren que EIIA^{Ntr} en su forma no fosforilada induce la degradación de RpoS por la proteasa ClpAP.

(A)



(B)



(C)

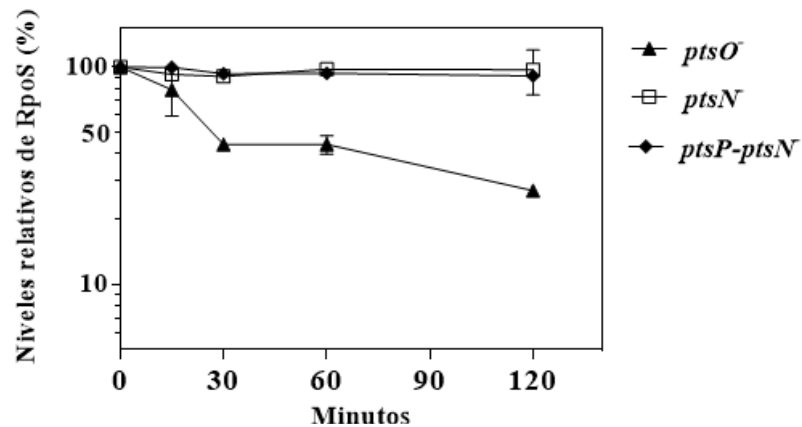
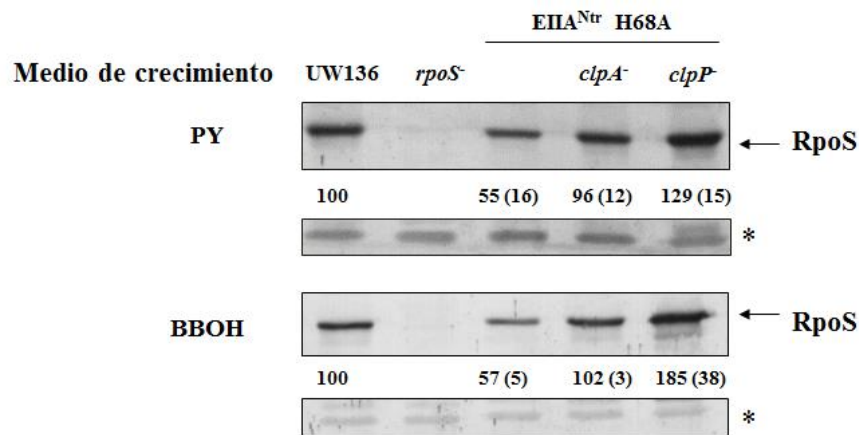


Figura 25. Detección de RpoS en las cepas *ptsO*⁻, *ptsN*⁻ y *ptsP-ptsN*⁻ crecidas en medio líquido PY o BBOH por 48 horas. Los números indican el porcentaje relativo de RpoS con respecto a la cepa silvestre los cuales son asumidos como 100%. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes con su desviación estándar (números en paréntesis). * Control de carga (interacción inespecífica del suero anti-RpoS). Para la cepa *ptsO*⁻ (*Spr*) la síntesis de proteínas fue bloqueada con gentamicina (0.5 mg/mL).

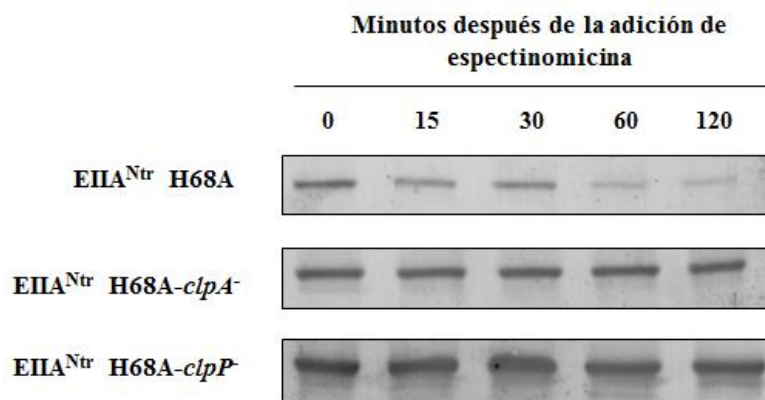
6.2.5 La proteína no fosforilable EIIA^{Ntr} H68A reduce los niveles y estabilidad de RpoS.

Para confirmar el efecto de la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada sobre la degradación de RpoS por el complejo ClpAP, se determinaron los niveles de RpoS en la cepa UW136:pALA8a, la cual contiene el gen *ptsN* con la mutación puntual H68A, produciendo una EIIA^{Ntr} no fosforilable (40). Como se muestra en la figura 26A, esta cepa presentó menores niveles de RpoS que la cepa UW136, tanto en condiciones de síntesis de PHB como de ARs. Similar a la mutante *ptsP*, la estabilidad de RpoS disminuyó (<60 mins) en la cepa que expresa a EIIA^{Ntr} H68A (fig. 26B). La inactivación de los genes *clpA* o *clpP* en esta cepa, restauró los niveles y estabilidad del factor sigma y a su vez los fenotipos de síntesis de PHB y ARs (fig. 26). Por lo tanto, estos resultados confirman que la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada reduce los niveles de RpoS mediante la proteólisis mediada por ClpAP.

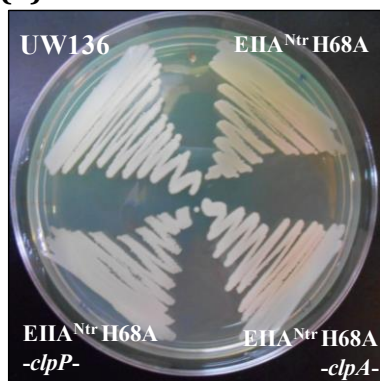
(A)



(B)



(C)



(D)

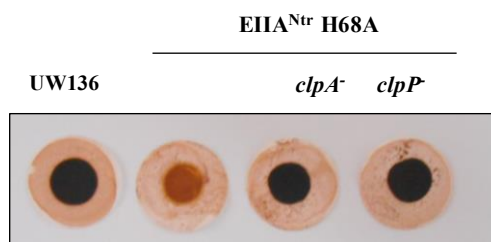


Figura 26. Efecto de las mutaciones en *clpA* y *clpP* sobre los niveles (A) y estabilidad (B) de RpoS y fenotipos de síntesis de PHB (C) y ARs (D) en la cepa UW136::pALA8a que expresa a EIIA^{Ntr} H68A (no fosforilable). En (A) los números indican el porcentaje relativo de RpoS con respecto a la cepa silvestre los cuales son asumidos como 100%. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes con su desviación estándar (números en paréntesis). * Control de carga (interacción inespecífica del suero anti-RpoS).

6.2.6 El complejo ClpXP degrada a RpoS en condiciones silvestres.

En *E. coli*, ClpX es la chaperona responsable del reconocimiento y translocación de RpoS a la proteasa ClpP (49). Como se mostró anteriormente, la mutación en *clpA* aumentó los niveles de RpoS en la mutante *ptsP*⁻ pero no en la cepa silvestre UW136 (en fase estacionaria). Por lo tanto se decidió investigar si la chaperona ClpX también está involucrada en la degradación de RpoS por ClpP en *A. vinelandii*.

En fase exponencial (8 horas) RpoS fue apenas detectable en las cepas UW136, *ptsN*⁻, *ptsP*⁻, *clpA*⁻ y *ptsP-clpA*⁻. La inactivación de *clpX* o *clpP* aumentó considerablemente los niveles de RpoS en la cepa silvestre UW136 y *ptsP*⁻, lo cual sugiere que al igual que sucede en otras bacterias, en *A. vinelandii*, el complejo ClpXP degrada a RpoS durante la fase exponencial (fig. 27). En fase estacionaria (24 horas) RpoS fue detectable en la todas las cepas (excepto en la mutante *rpoS*⁻). En menor medida a lo observado en fase exponencial, las mutaciones en *clpX* y *clpP* incrementaron los niveles de RpoS tanto en la cepa silvestre como en la cepa *ptsP*⁻ en fase estacionaria (fig. 27). Estos resultados indican que en condiciones silvestres, el complejo ClpXP lleva a cabo la degradación de RpoS, mientras que en presencia de EIIA^{Ntr} no fosforilada y en fase estacionaria, RpoS es reconocido y degradado por ClpAP y ClpXP.

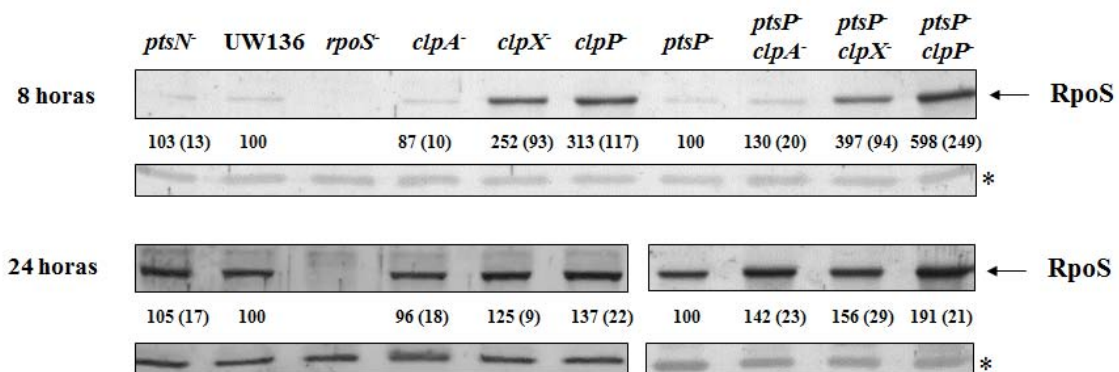


Figura 27. Detección de RpoS en fase exponencial (8 horas) y estacionaria (24 horas). Las cepas *ptsN*, *clpA*, *clpX* y *clpP* fueron comparadas contra la cepa silvestre y las cepas *ptsP-clpA*, *ptsP-clpX* y *ptsP-clpP* contra la cepa *ptsP*. Los números indican el porcentaje relativo de RpoS con respecto a la cepa silvestre o *ptsP*, los cuales son asumidos como 100%. Los valores son el promedio de 2 experimentos independientes con su desviación estándar (números en paréntesis). * Control de carga (interacción inespecífica del suero anti-RpoS).

6.2.7 RpoS y EIIA^{Ntr} de *A. vinelandii* no interactúan in vivo mediante el sistema de dos híbridos en *E. coli*.

Un mecanismo por el cual EIIA^{Ntr} no fosforilada podría inducir la degradación de RpoS por ClpAP, es mediante una interacción proteína-proteína como sucede entre RssB y RpoS en *E. coli*. Debido a que en el genoma de *A. vinelandii* no hay un homólogo a RssB (63), se decidió determinar si RpoS y EIIA^{Ntr} interactúan mediante el sistema de dos híbridos en *E. coli* basado en la reconstitución de la actividad de la adenilato ciclasa (BACTH) (59). Como se observa en la figura 28, cuando la cepa BTH101 de *E. coli* fue cotransformada con los plásmidos vacíos (pUC18 + pKT25) o el plásmido pUC18 con el pKT25-*rpoS*, presentó un fenotipo blanco en medio LB IPTG-X-Gal, indicando que la actividad de adenilato ciclasa no fue reconstituida (controles negativos). Al contrario, el control positivo (zipper de leucina) presentó un fenotipo azul entre las 24 y 48 horas de incubación, al igual que la combinación de T18-EIIA^{Ntr} H68A y T25-EIIA^{Ntr} H68A (fig. 28), indicando que la proteína EIIA^{Ntr} de *A. vinelandii* forma dímeros como ha sido reportado previamente para EIIA^{Ntr} de *Burkholderia pseudomallei* en estudios de cristalización (64). Las combinaciones de los híbridos T18-RpoS + T25-EIIA^{Ntr} y T18-RpoS + T25-EIIA^{Ntr} H68A presentaron un fenotipo negativo de interacción (fig. 28), lo cual sugiere que probablemente EIIA^{Ntr} y RpoS de *A. vinelandii* no interactúan.

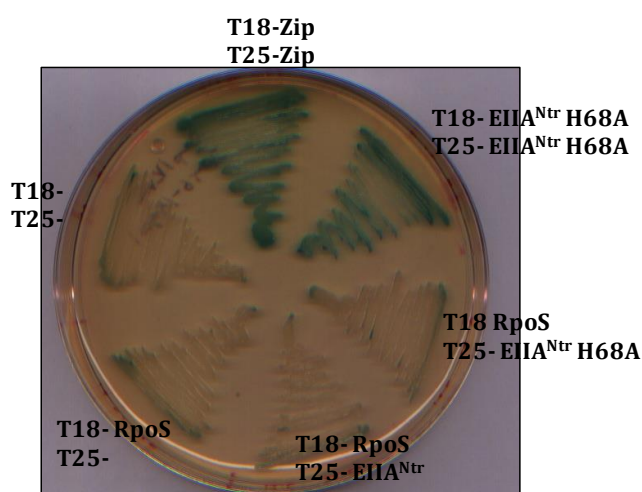


Figura 28. Análisis de sistema de dos híbridos para determinación de interacción entre EIIA^{Ntr} y RpoS. Cotransformantes de *E. coli* BTH101 que expresan fusiones de T18 o T25 con RpoS, EIIA^{Ntr} o EIIA^{Ntr} H68A crecidas en medio LB adicionado con IPTG-X-gal. La coloración azul indica interacción entre las proteínas fusionadas a T18 y T25.

6.2.8 Las mutaciones en *clpP* y *clpA* restauran la transcripción de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*.

La inestabilidad de RpoS causada por EIIA^{Ntr} no fosforilada correlaciona con el efecto negativo que produce la mutación en *ptsP* sobre la expresión de los genes regulatorios y biosintéticos de PHB y ARs. Por lo tanto, es de esperarse que las mutaciones en *clpA* y *clpP* afecten la transcripción de dichos genes. Para confirmar dicho efecto, se emplearon fusiones transcripcionales de *phbB-gusA*, *phbR-gusA*, *arsA-gusA* y *arpR-gusA*. Como se esperaba, la mutación en *ptsP* disminuyó la actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales de *phbR*, *phbB*, *arpR* y *arsA* y la inactivación de *clpA* o *clpP* restauró de manera completa la actividad de todas las fusiones (fig. 29). En la cepa UW136, las mutaciones en *clpP* y *clpA* no afectaron la actividad de las fusiones de *phbR*, *phbB* y *arpR*, mientras que la de *arsA* aumentó aproximadamente en un 45% (fig. 29). Estos resultados confirman que EIIA^{Ntr} no fosforilada disminuye la transcripción de los genes asociados a PHB y ARs a través de inducir la degradación de RpoS por la proteasa ClpAP.

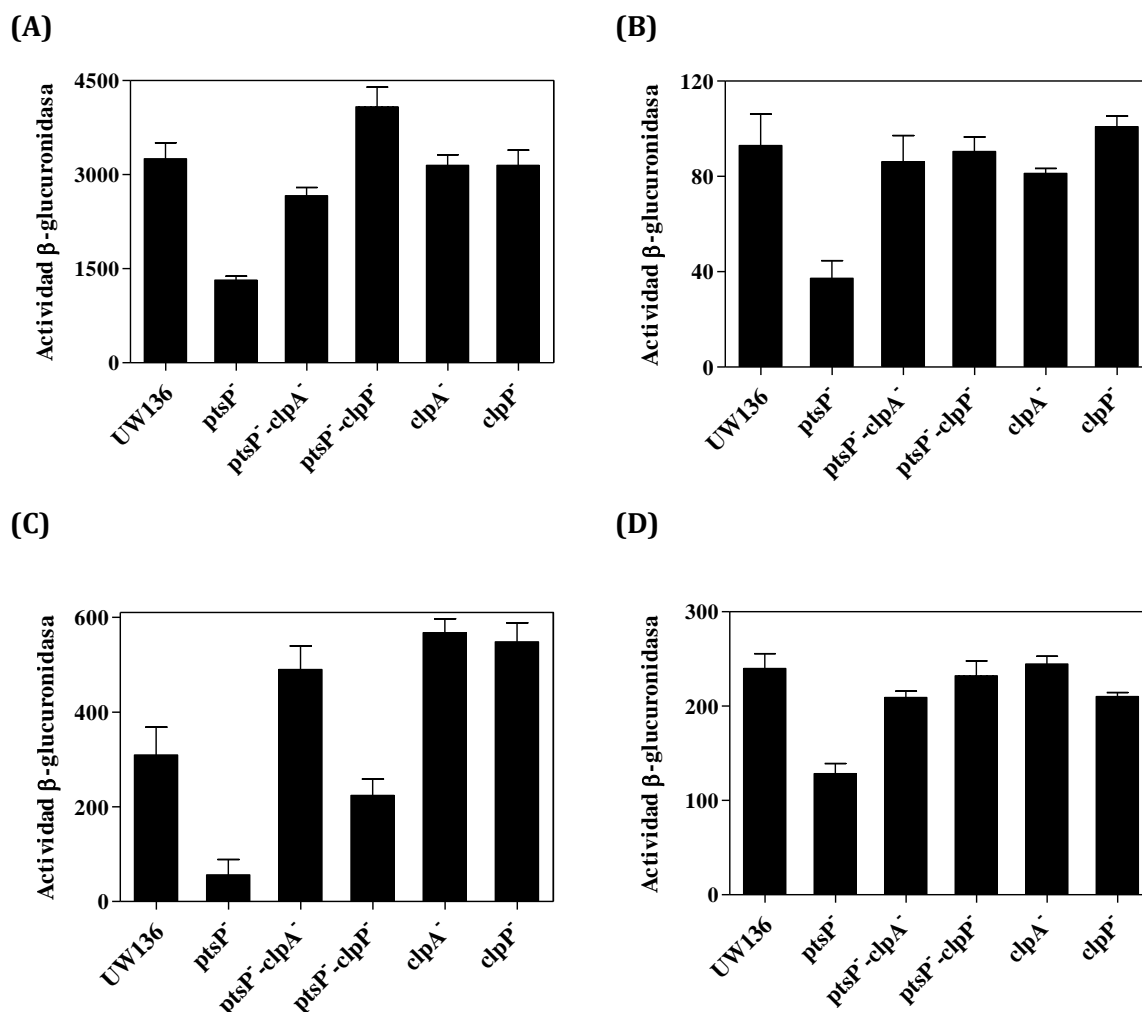


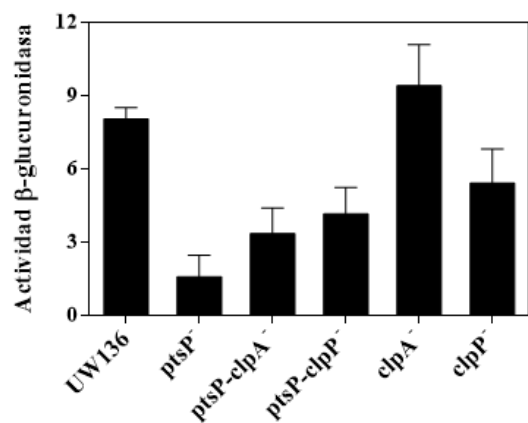
Figura 29. Actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales de *phbB-gusA* (A), *phbR-gusA* (B), *arsA-gusA* (C) y *arpR-gusA* (D) en las cepas UW136, *ptsP*⁻, *ptsP*⁻*clpA*⁻, *ptsP*⁻*clpP*⁻, *clpA*⁻ y *clpP*⁻. Para A y B las células fueron crecidas en medio PY sólido por 48 horas y para C y D en medio sólido BBOH por 72 horas.

6.2.9 Represión postranscripcional de *phbB* y *arsA* por EIIA^{Ntr} no fosforilada.

La inactivación de *clpA* o *clpP* en la cepa *ptsP*⁻ restauró la transcripción de los genes *phbB* y *arsA* a valores silvestres (figs. 29A y 29C), sin embargo la síntesis de PHB y ARs no fue restaurada a niveles similares a los producidos por la cepa UW136 (fig. 21), lo cual sugiere un efecto negativo adicional de EIIA^{Ntr} sobre la síntesis de ambos compuestos a nivel postranscripcional. Utilizando fusiones traduccionales de *phbB*⁻-*gusA* y *arsA*⁻-*gusA* se identificó que las mutaciones en *clpA* y *clpP* restauraron parcialmente su actividad β -glucuronidasa en la cepa *ptsP*⁻ (fig. 30), lo cual correlaciona con la restauración parcial de los niveles de PHB y ARs y confirma que

EIIA^{Ntr} no fosforilada regula la expresión de *phbB* y *arsA* a nivel transcripcional y postranscripcional.

(A)



(B)

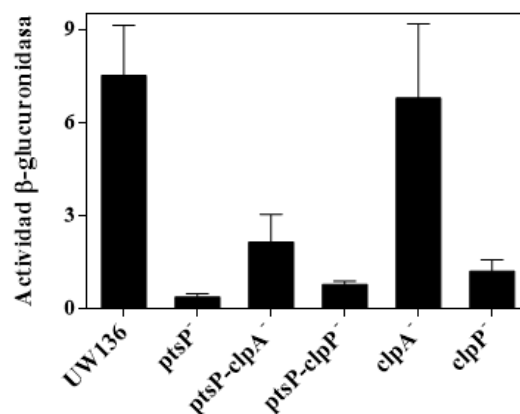


Figura 30. Actividad β -glucuronidasa de la fusiones traduccionales de *phbB*⁻-*gusA* (A) y *arsA*⁻-*gusA* (B) en las cepas UW136, *ptsP*⁻, *ptsP-clpA*⁻, *ptsP-clpP*⁻, *clpA*⁻ y *clpP*⁻. Las células fueron crecidas en medio PY sólido por 48 horas (A) o medio líquido BBOH por 72 horas (B). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, barras de error; DE.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se demostró que la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado reprime la síntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii*. Esto se confirmó mediante dos enfoques: 1) la inactivación del gen *ptsN* (EIIA^{Ntr}) fue suficiente para restaurar la síntesis de ARs en la cepa *ptsP*⁻ (EIIA^{Ntr} no fosforilada presente) y 2) la cepa que expresa a EIIA^{Ntr} H68A no fosforilable presentó un fenotipo negativo de síntesis de ARs.

De manera inesperada, en la doble mutante *ptsP-ptsN* los niveles de ARs fueron más bajos que en la mutante *ptsN*⁻ (fig. 15). Adicionalmente, la mutación en *ptsP* produjo una mayor disminución en los niveles de los lípidos fenólicos que la mutación puntual H68A en el gen *ptsN* (Comparar figuras 15 y 20) lo cual sugiere la posibilidad de un segundo efecto regulatorio de las proteínas EI^{Ntr} y/o NPr sobre la síntesis de ARs, independiente de su función de transferencia del grupo fosfato a EIIA^{Ntr}. Para confirmar lo anterior es necesario realizar experimentos adicionales como determinar si las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyen aún más los niveles de ARs en la cepa UW136::pALA8a (EIIA^{Ntr} H68A). Otra hipótesis que podría explicar la diferencia de los niveles de ARs entre las cepas *ptsN*⁻ y *ptsP-ptsN*⁻ sería la presencia de un parálogo de EIIA^{Ntr} que complemente de manera parcial la mutación en *ptsN*. Sin embargo solo se ha encontrado un gen *ptsN* en el genoma de *A. vinelandii*.

EIIA^{Ntr} no fosforilada disminuyó la transcripción del operón biosintético de ARs, debido a que la expresión del gen que codifica para su activador transcripcional ArpR, también fue reducida. EIIA^{Ntr} controla la expresión de varios genes de manera indirecta. Por ejemplo en *E. coli*, su interacción con las cinasas sensoras KdpD y PhoR, aumentan la fosforilación de los reguladores respuesta KdpE y PhoB, resultando en un aumento en la expresión de *kdpKABC* y el regulón *pho*, respectivamente (29, 30). Adicionalmente, EIIA^{Ntr} afecta la actividad de RpoS y RpoD indirectamente debido a un efecto sobre los niveles de potasio en *E. coli*; en ausencia de EIIA^{Ntr} (en una mutante *ptsN*) los niveles de potasio aumentan (por una desrepresión de la actividad del transportador de K⁺ Trk), resultando en una unión

preferencial de la RNA polimerasa a RpoS sobre RpoD, y por lo tanto afectando la transcripción de los regulones de ambos factores sigma (32). En este trabajo se demostró que en *A. vinelandii* EIIA^{Ntr} no fosforilada afecta la transcripción de *arpR* a través de RpoS, debido a que la expresión de *arpR* a partir de un promotor independiente de RpoS fue suficiente para restaurar la síntesis de ARs en presencia de EIIA^{Ntr} no fosforilada (fig. 20) al igual a lo observado en una mutante *rpoS*, previamente reportado (21).

Adicionalmente EIIA^{Ntr} ejerce una represión de la expresión de *arpR* a nivel postranscripcional, debido a que la mutación en *ptsN* aumentó la actividad de la fusión traduccional *arpR-gusA* tanto en la cepa silvestre como en la mutante *ptsP*. Además las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* disminuyeron alrededor del 50% la actividad de la fusión transcripcional *arpR-gusA*, mientras que los niveles de mRNA de *arpR*, medidos por qPCR fueron aún más bajos en las mutantes *ptsP* y *ptsO* (tabla 5). Un efecto similar sucede con la expresión de *ilvBN* en *E. coli*, donde la mutación en *ptsN* redujo aproximadamente en un 50% la actividad de la fusión transcripcional *ilvB-lacZ*, mientras que los niveles de mRNA *ilvB* (detectados por RT-PCR) disminuyeron de manera más drástica (65). El mecanismo por el cual EIIA^{Ntr} no fosforilada afecta la expresión de *arpR* a nivel postranscripcional aún se desconoce, sin embargo, debido a que la fusión traduccional de *arpR* contiene la región 5' no traducida de su mRNA (incluyendo la secuencia de Shine-Dalgarno), este mecanismo podría estar relacionado con la reducción de la estabilidad del mRNA y/o al bloqueo de su traducción.

En la segunda parte de este trabajo se logró identificar que PTS^{Ntr} afecta la transcripción de los genes asociados a la síntesis de PHB y ARs mediante la regulación de los niveles de proteína de RpoS. La inactivación mutacional de cada componente de PTS^{Ntr} afecta los niveles del factor sigma; mutaciones en *ptsP* o *ptsO*, disminuyen los niveles y vida media de RpoS, mientras que la mutación en *ptsN* aumenta los niveles y estabilidad de la proteína únicamente en el fondo de la mutante *ptsP*- (no en la cepa silvestre) (figs. 23, 24 y 25). Estos resultados, junto con la evidencia que la cepa que porta a EIIA^{Ntr} H68A no fosforilable presenta niveles reducidos de RpoS (fig. 26A), notablemente indican que EIIA^{Ntr} no fosforilada es la

señal regulatoria de PTS^{Ntr} que reduce los niveles del factor sigma. De manera interesante, este efecto involucra a la proteasa ClpAP, debido a que mutaciones en sus genes codificantes restauran los niveles y estabilidad de RpoS en la cepas *ptsP*⁻ y UW136::pALA8a (EIIA^{Ntr} H68A) y por lo tanto la síntesis de PHB y ARs (figs. 21, 23, 24 y 26). Debido a que la mutación en el gen *clpS* (el cual codifica para la proteína adaptadora de ClpA) no restauró la síntesis de PHB y ARs en la cepa *ptsP*⁻ (fig. 22), probablemente el reconocimiento de RpoS por ClpAP es independiente de la actividad de ClpS.

En condiciones silvestres en *A. vinelandii*, el complejo ClpXP degrada a RpoS principalmente en fase exponencial (fig. 27), similar a lo reportado en otras bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* (49, 66). De manera interesante, únicamente en presencia de EIIA^{Ntr} no fosforilada (en las cepas *ptsP*⁻ y UW136::pALA8a), el complejo ClpAP también degrada a RpoS en fase estacionaria. Debido a que en la cepa silvestre la mutación en *clpA* no afectó los niveles de RpoS (figs. 23 y 26), estos resultados sugieren que EIIA^{Ntr} no fosforilada induce de manera específica el reconocimiento y degradación de RpoS por ClpAP.

En *E. coli*, la proteína RssB en su forma fosforilada se une a RpoS permitiendo su reconocimiento y degradación por ClpXP (67). En el genoma de *A. vinelandii* no se ha encontrado un homólogo a *rssB*, sugiriendo que otros factores pueden estar involucrados en la regulación de la proteólisis de RpoS (63). Mediante el sistema de dos híbridos BACTH, no se identificó interacción entre EIIA^{Ntr} no fosforilada y RpoS (fig. 28), lo cual sugiere que probablemente el reconocimiento de RpoS por ClpAP y ClpXP involucra a otras moléculas desconocidas hasta el momento.

Otra posibilidad es que la degradación de RpoS sea una consecuencia de un rol regulatorio adicional de EIIA^{Ntr} en *A. vinelandii*. De acuerdo a evidencia experimental reportada en otras bacterias, podrían darse dos situaciones en las cuales EIIA^{Ntr} induciría la degradación de RpoS: 1) En *Ralstonia eutropha* H16 (una β -proteobacteria productora de PHB) EIIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con SpoT1, una enzima hidrolasa/sintasa de ppGpp de la respuesta restrictiva (*stringent*

response) (68). Por otro lado, en *E. coli*, se ha reportado que la alarmona ppGpp estabiliza a RpoS durante la escasez de fosfato mediante la activación de la expresión de IraP, un anti-adaptador de RssB (69). Por lo tanto es posible que la degradación de RpoS mediada por ClpAP en *A. vinelandii* sea una consecuencia de la reducción de los niveles de ppGpp por la interacción entre SpoT y EIIA^{Ntr}. 2) En *E. coli*, EIIA^{Ntr} no fosforilada reduce los niveles de K⁺ por inhibición del transportador Trk, lo cual afecta la unión de RpoS al core de la RNA polimerasa (31, 32). La variación en la homeostasis de potasio altera la osmolaridad y el pH citoplasmático y se conoce que ambas condiciones afectan la estabilidad de RpoS en *E. coli* (70). Por consiguiente, en *A. vinelandii*, la degradación de RpoS podría ser un efecto de los niveles alterados de K⁺ debido a una interacción entre EIIA^{Ntr} y TrkA. De acuerdo a lo anterior es necesario identificar si SpoT y TrkA están relacionados con EIIA^{Ntr} en la degradación de RpoS en *A. vinelandii*.

Aunque la inactivación de los genes *clpA* o *clpP* restauró de manera completa la transcripción de *phbB* y *arsA* en la cepa *ptsP* (figs. 29A y 29C), no fue suficiente para restaurar la síntesis de PHB y ARs a niveles silvestres (fig. 21). Esto se debe a que EIIA^{Ntr} ejerce una represión adicional de la expresión de *phbB* y *arsA* a nivel postranscripcional e independiente de ClpAP (fig. 30). El mecanismo de este nivel de regulación por EIIA^{Ntr} es desconocido hasta el momento, sin embargo podría estar relacionado con la proteína RsmA, de la cual se sabe que reprime a nivel postranscripcional la expresión tanto de *phbB* como de *arsA* (ref. 13, Romero Y. tesis de doctorado).

Desde el punto de vista fisiológico, la regulación de los niveles de RpoS por EIIA^{Ntr} podría estar asociada al metabolismo de carbono, específicamente a la síntesis de acetil-CoA, el cual es precursor de la síntesis de PHB y ARs. En *P. putida*, EIIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con la subunidad E1 del complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH) y reduce su actividad (producción de acetil-CoA) (71). Algo similar ocurre en *E. coli*; una mutación en *ptsN* (EIIA^{Ntr}) aumenta el flujo de piruvato a acetil-CoA (actividad de PDH) (72). Por otro lado, recientemente se reportó en *E. coli*, que una mutación en *aceE* (subunidad EI de PDH), aumenta la estabilidad de RpoS mediante la activación de los antiadaptadores de RssB, IraP e IraD (73). Por lo

tanto, es posible que en *A. vinelandii*, en una condición donde $EIIA^{Ntr}$ se encuentre principalmente en su forma no fosforilada, los niveles de acetil-CoA disminuyen debido a una reducción de la actividad de PDH, lo cual sería una señal de inducción de degradación de RpoS por ClpAP.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo permiten proponer un nuevo modelo de regulación el cual explica como PTS^{Ntr} regula la síntesis de PHB y ARs (fig. 31). Mediante un mecanismo desconocido, la proteína $EIIA^{Ntr}$ induce el reconocimiento y degradación de RpoS por ClpAP, lo cual afecta la transcripción de los genes dependientes del factor sigma relacionados con la síntesis de PHB y ARs. Adicionalmente $EIIA^{Ntr}$ también reprime la expresión de *phbB* y *arsA* a nivel postranscripcional mediante una vía desconocida e independiente de ClpAP.

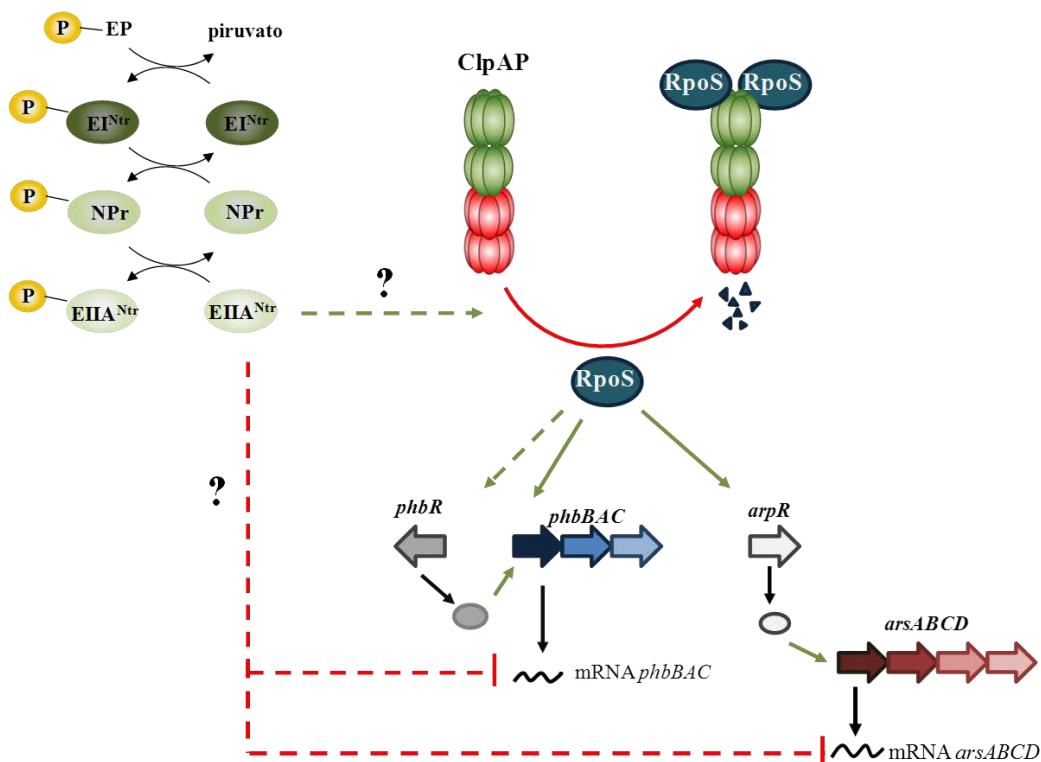


Figura 31. Modelo propuesto para la regulación de la síntesis de PHB y ARs por PTS^{Ntr} en *A. vinelandii*.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que:

- La proteína EIIA^{Ntr} en su forma no fosforilada reprime la síntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii*.
- Un mecanismo por el cual PTS^{Ntr} regula de manera global la expresión génica en *A. vinelandii*, es mediante la proteína EIIA^{Ntr} en su forma no fosforilada, la cual induce la degradación del factor sigma RpoS por la proteasa ClpAP.
- La regulación de la expresión de los operones *phbBAC* y *arsABCD* por PTS^{Ntr} es compleja, debido a que sucede a nivel transcripcional y postranscripcional e involucra a diferentes intermediarios.

CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS

- Caracterizar el mecanismo por el cual EIIA^{Ntr} no fosforilada induce el reconocimiento y degradación de RpoS por la proteasa ClpAP.
- Caracterizar la vía de represión postranscripcional de la expresión de *phbBAC* y *arsABCD* ejercida por EIIA^{Ntr}.

CAPÍTULO 10. REFERENCIAS

1. Setubal JC, *et al.* (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* 191(14):4534-4545.
2. Nagpal P, Jafri S, Reddy MA, & Das HK (1989) Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 171(6):3133-3138.
3. Rehm BHA (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Micro* 8(8):578-592.
4. Navarro da Silva A & García-Cruz CH (2010) Biopolymers by *Azotobacter vinelandii*. in *Biopolymers*, ed Elnashar M (InTech), pp 413-438.
5. Sadoff HL (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 39(4):516-539.
6. Segura D, Núñez C, & Espín G (2014) *Azotobacter* Cysts. *eLS*, (John Wiley & Sons, Ltd).
7. Moreno J, González-Lopez J, & Vela GR (1986) Survival of *Azotobacter* spp. in Dry Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(1):123-125.
8. Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, & Espín G (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 6(1):7.
9. Anderson AJ & Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 54(4):450-472.
10. Segura D, Cruz T, & Espín G (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* 179:437 - 443.
11. Senior P & Dawes E (1973) The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 134:225 - 238.
12. Muriel-Millán L, Castellanos M, Hernández-Eligio J, Moreno S, & Espín G (2014) Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(5):2173-2182.

13. Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín-González L, & Espín G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* 184:5672 - 5677.
14. Hernández-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, & Espín G (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiol* 157(11):10.
15. Hernández-Eligio A, *et al.* (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol* 158:11.
16. Manzo J, *et al.* (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):147-159.
17. Reusch RN & Sadoff HL (1983) Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature* 302(5905):268-270.
18. Reusch RN & Sadoff HL (1979) 5-n-Alkylresorcinols from encysting *Azotobacter vinelandii*: isolation and characterization. *Journal of Bacteriology* 139(2):448-453.
19. Segura D, *et al.* (2009) Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J. Bacteriol.* 191(9):3142-3148.
20. Funa N, Ozawa H, Hirata A, & Horinouchi S (2006) Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *PNAS* 103(16):6356-6361.
21. Romero Y, Moreno S, Guzmán J, Espín G, & Segura D (2013) Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 195(8):1834-1844.
22. Deutscher J, *et al.* (2014) The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78(2):231-256.

23. Barabote RD & Saier MH (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(4):608-634.
24. Pflüger-Grau K & Görke B (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in Microbiology* 18(5):205-214.
25. Görke B & Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Micro* 6(8):613-624.
26. Lee C-R, *et al.* (2013) Reciprocal regulation of the autophosphorylation of enzyme I^{Ntr} by glutamine and α -ketoglutarate in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 88(3):473-485.
27. Comas I, González-Candelas F, & Zuniga M (2008) Unraveling the evolutionary history of the phosphoryl-transfer chain of the phosphoenolpyruvate:phosphotransferase system through phylogenetic analyses and genome context. *BMC Evol. Biol.* 8(1):147.
28. Kim H-J, Lee C-R, Kim M, Peterkofsky A, & Seok Y-J (2011) Dephosphorylated NPr of the nitrogen PTS regulates lipid A biosynthesis by direct interaction with LpxD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409(3):556-561.
29. Lüttmann D, Göpel Y, & Görke B (2012) The phosphotransferase protein EIIA^{Ntr} modulates the phosphate starvation response through interaction with histidine kinase PhoR in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 86(1):96-110.
30. Lüttmann D, *et al.* (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 72(4):978-994.
31. Lee C-R, Cho S-H, Yoon M-J, Peterkofsky A, & Seok Y-J (2007) *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. *PNAS* 104(10):4124-4129.
32. Lee C-R, *et al.* (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr}-dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol* 78(6):1468-1483.
33. Choi J, *et al.* (2010) *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIA^{Ntr}-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *PNAS* 107(47):20506-20511.

34. Lee J, Park Y-H, Kim Y-R, Seok Y-J, & Lee C-R (2015) Dephosphorylated NPr is involved in an envelope stress response of *Escherichia coli*. *Microbiol* 161(5):1113-1123.
35. Xu H, *et al.* (2005) Influence of *ptsP* gene on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 253(1):103-109.
36. Michiels J, *et al.* (1998) The *Rhizobium etli rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. *Journal of Bacteriology* 180(7):1729-1740.
37. Higa F & Edelstein PH (2001) Potential virulence role of the *Legionella pneumophila ptsP* ortholog. *Infect. Immun.* 69(8):4782-4789.
38. Merrick MJ & Coppard JR (1989) Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding σ_{54}) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from σ_{54} -dependent promoters. *Mol Microbiol* 3(12):1765-1775.
39. Segura D & Espín G (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180(18):4790-4798.
40. Noguez R, *et al.* (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(4):244-254.
41. Gur E, Biran D, & Ron EZ (2011) Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria - how and when? *Nat Rev Micro* 9(12):839-848.
42. Kress W, Maglica Z, & Weber-Ban E (2009) Clp chaperone-proteases: structure and function. *Research in Microbiology* 160(9):618-628.
43. Kirstein J, Moliere N, Dougan DA, & Turgay K (2009) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Micro* 7(8):589-599.
44. Karzai AW, Roche ED, & Sauer RT (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7(6):449-455.
45. Dougan DA, Truscott KN, & Zeth K (2010) The bacterial N-end rule pathway: expect the unexpected. *Mol Microbiol* 76(3):545-558.

46. Ninnis RL, Spall SK, Talbo GH, Truscott KN, & Dougan DA (2009) *Modification of PATase by L/F-transferase generates a ClpS-dependent N-end rule substrate in Escherichia coli* pp 1732-1744.
47. Schmidt R, Zahn R, Bukau B, & Mogk A (2009) ClpS is the recognition component for *Escherichia coli* substrates of the N-end rule degradation pathway. *Molecular Microbiology* 72(2):506-517.
48. Bougdour A, Cuning C, Baptiste PJ, Elliott T, & Gottesman S (2008) Multiple pathways for regulation of σ^S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol* 68(2):298-313.
49. Schweder T, Lee K, Lomovskaya O, & Martin A (1996) Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* 178(2):470-476.
50. Barnes Jr EM (1972) Respiration-coupled glucose transport in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152(2):795-799.
51. Sambrook J, Fritsch E, & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) 2nd Ed.
52. Kovach ME, *et al.* (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166(1):175-176.
53. Alexeyev MF, Shokolenko IN, & Croughan TP (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160(1):63-67.
54. Cocotl-Yañez M, *et al.* (2014) A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol* 160(Pt 3):479-487.
55. Kennedy C, *et al.* (1986) The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Molec. Gen. Genet.* 205(2):318-325.
56. Barry T, *et al.* (1992) Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucl. Acids Res.* 20(18):4940-.

57. Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2-($\Delta\Delta C(T)$) method. *Methods* 25(4):402-408.
58. Schneider CA, Rasband WS, & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Meth.* 9(7):671-675.
59. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, & Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *PNAS* 95(10):5752-5756.
60. Law JH & Slepecky RA (1961) Assay of poly- β -Hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82(1):33-36.
61. Tluscik F, Kazubek A, & Mejbaum-Katzenellenbogen W (1981) Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. *Acta Soc. Bot. Pol.* 50(4):7.
62. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
63. Sandercock JR & Page WJ (2008) RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. *J. Bacteriol.* 190(3):946-953.
64. Kim M-S, *et al.* (2013) New molecular interaction of IIA^{Ntr} and HPr from *Burkholderia pseudomallei* identified by X-ray crystallography and docking studies. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 81(9):1499-1508.
65. Lee C-R, *et al.* (2005) Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol Microbiol* 58(1):334-344.
66. Bertani I, Ševo M, Kojic M, & Venturi V (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Archives of Microbiology* 180(4):264-271.
67. Becker G, Klauck E, & Hengge-Aronis R (1999) Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *PNAS* 96(11):6439-6444.

68. Karstens K, Zschiedrich CP, Bowien B, Stülke J, & Görke B (2014) Phosphotransferase protein EIIA^{Ntr} interacts with SpoT, a key enzyme of the stringent response, in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiol* 160(Pt 4):711-722.
69. Bougdour A & Gottesman S (2007) ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *PNAS* 104(31):12896-12901.
70. Hengge-Aronis R (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the s^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):373-395.
71. Pflüger-Grau K, Chavarría M, & de Lorenzo V (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 (BBA) - General Subjects* 1810(10):995-1005.
72. Jahn S, Haverkorn van Rijsewijk BR, Sauer U, & Bettenbrock K (2013) A role for EIIA^{Ntr} in controlling fluxes in the central metabolism of *E. coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(12):2879-2889.
73. Battesti A, Majdalani N, & Gottesman S (2015) Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. *PNAS* 112(16):5159-5164.

ANEXO. ARTÍCULO

Muriel-Millán LF, Moreno S, Romero Y, Bedoya-Pérez LP, Castañeda M, Segura D, Espín G. (2015) The Unphosphorylated EIIA^{Ntr} Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. PLoS ONE 10(2): e0117184. doi: 10.1371/journal.pone.0117184

RESEARCH ARTICLE

The Unphosphorylated EIIA^{Ntr} Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*

Luis Felipe Muriel-Millán¹, Soledad Moreno¹, Yanet Romero^{1a}, Leidy Patricia Bedoya-Pérez¹, Miguel Castañeda², Daniel Segura¹, Guadalupe Espín^{1*}

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **2** Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

^a Current address: Unidad académica de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

* espin@ibt.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Muriel-Millán LF, Moreno S, Romero Y, Bedoya-Pérez LP, Castañeda M, Segura D, et al. (2015) The Unphosphorylated EIIA^{Ntr} Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. PLoS ONE 10(2): e0117184. doi:10.1371/journal.pone.0117184

Received: October 14, 2014

Accepted: December 20, 2014

Published: February 2, 2015

Copyright: © 2015 Muriel-Millán et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by grant DGAPA-PAPIIT 209814. LFMM received financial support by CONACyT during his PhD studies. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Upon encystment induction, *Azotobacter vinelandii* produces the phenolic lipids alkylresorcinols (ARs) that are structural components of the cysts. The enzymes responsible for the ARs synthesis are encoded in the *arsABCD* operon, whose expression is activated by ArpR. The transcription of *arpR* is initiated from an RpoS dependent promoter. The nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) is a global regulatory system present in Gram negative bacteria. It comprises the EI^{Ntr}, NPr and EIIA^{Ntr} proteins encoded by *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* genes respectively. These proteins participate in a phosphoryl-group transfer from phosphoenolpyruvate to protein EIIA^{Ntr} via the phosphotransferases EI^{Ntr} and NPr. In *A. vinelandii*, the non-phosphorylated form of EIIA^{Ntr} was previously shown to repress the synthesis of poly-β-hydroxybutyrate. In this work, we show that PTS^{Ntr} also regulates the synthesis of ARs. In a strain that carries unphosphorylated EIIA^{Ntr}, the expression of *arpR* was reduced, while synthesis of ARs and transcription of *arsA* were almost abrogated. The expression of *arpR* from an RpoS-independent promoter in this strain restored the ARs synthesis. Taken together these results indicate that unphosphorylated EIIA^{Ntr} negatively affects activation of *arpR* transcription by RpoS.

Introduction

Azotobacter vinelandii is a soil bacterium that undergoes a differentiation process resulting in the formation of a desiccation resistant cyst. A mature cyst consists of a contracted cell, known as the central body, which is surrounded by a capsule made up of a laminated outer layer called the exine and an inner layer called the intine [1]. The polysaccharide alginate is a major component of the capsule layers. Other components of the cysts are the reserve polyester poly-β-hydroxybutyrate (PHB), that is present in the central body forming large granules, and the phenolic lipids alkylresorcinols (ARs), which replace the membrane phospholipids in the cyst and

are also components of the exine [2]. Encystment can be induced by transferring log-phase vegetative cells to Burk's minimal medium with either *n*-butanol or β -hydroxybutyrate as the sole carbon source [3].

ARs play a structural role in the cyst, and strains carrying mutations in ARs biosynthetic genes produce cysts with a defective exine [4]. The *arsABCD* gene cluster encodes the enzymes that synthesize these lipids [5]. These genes are specifically expressed in encystment induction medium [4]. The transcriptional activator ArpR positively regulates transcription of the *arsABCD* operon, by direct binding to the *arsA* promoter region [6]. The mutational inactivation of *rpoS* impairs ARs synthesis [7] because this sigma factor is needed for the transcription of *arpR* [6].

The *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* genes encode EI^{Ntr}, NPr and EIIA^{Ntr} proteins, respectively, that are components of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}), which is homologous to the carbohydrate transport PTS. The PTS^{Ntr} proteins participate in a phosphoryl transfer chain from phosphoenolpyruvate, where EIIA^{Ntr} appears to be the terminal phosphoryl acceptor [8]. The PTS^{Ntr} regulates a wide variety of processes in bacteria; in *Legionella pneumophila*, a *ptsP* mutation, negatively affected its virulence in guinea pigs [9]; in *Rhizobium* species, the PTS^{Ntr} is associated to melanin synthesis, nitrogen fixation and regulation of ABC transport activation [10,11]. In *Escherichia coli*, the EIIA^{Ntr} protein controls the potassium transport by interacting with the Trk transporter subunit TrkA and the sensor kinase KdpD (that controls the expression of high affinity potassium transporter system KdpFABC) [12,13]. The response of *E. coli* to phosphate starvation is also activated by EIIA^{Ntr} due to an interaction with the sensor kinase PhoR [14].

In the *A. vinelandii* UW136, the non-phosphorylated form of EIIA^{Ntr} was shown to impair PHB production, by exerting a negative effect on expression of *phbR*, the gene encoding the transcriptional activator of the PHB biosynthetic operon *phbBAC* [15].

In this work we report the effect of mutations in the genes coding for the proteins of the PTS^{Ntr} on alkylresorcinol synthesis and show that the non-phosphorylated EIIA^{Ntr} protein has a negative effect on the transcriptional activation of *arpR* by RpoS.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used are listed in [S1 Table](#). *A. vinelandii* was cultured at 30°C in Burk's nitrogen-free salts medium [16] supplemented with 2% sucrose (BS) for vegetative growth or 0.2% *n*-butanol (BBOH) for encystment induction. For determination of β -glucuronidase activity of transcriptional *phbR-gusA* and *phbB-gusA* fusions, the cells were grown in peptone yeast medium supplemented with 2% sucrose (PY). Liquid cultures were carried out in 250-mL or 125-mL flasks containing 50 or 25 ml of medium, respectively, in a rotatory shaker at 200 rpm and 30°C. Inocula for all experiments were grown on BS, washed three times with sterile 10mM MgSO₄, and transferred to BBOH medium.

E. coli strain DH5 α was grown in Luria-Bertani medium (LB) at 37°C. Transformation of *A. vinelandii* were carried out as previously described [16].

Nucleic acid procedures

DNA purification and cloning procedures were carried out as previously described [17]. Total RNA extraction was performed as reported by Barry et al. [18]. DNA sequencing was done with a Perkin Elmer/Applied Biosystems DNA Sequencer. The sequences of oligonucleotides used in this work are described in the [S2 Table](#).

Constructions of transcriptional and translational fusions of *arpR* and *arsA* with *gusA* reporter

The pUMATc plasmid [19] was digested with *EcoRI* and *HindIII* to clone the *gusA* reporter gene obtained from pAHFUTs-Tc [20], resulting in the plasmid pUMATcgusAT.

The plasmids pUMATcgusAT and pUMATcgusAPT [19], unable to replicate in *A. vinelandii* and used for transcriptional and translational fusions, respectively, were digested with *SacI* and *KpnI* restriction enzymes to remove the tetracycline cassette. The ends of the plasmids were made blunt by treatment with Klenow fragment and used for cloning a blunted *MluI* gentamicin cassette obtained from pBSL98 [21]. The new plasmids pLM2 and pLM3 (S1 Table) were used to construct the transcriptional and translational fusions, respectively.

For the construction of transcriptional *arsA-gusA* and *arpR-gusA* fusions, DNA fragments of 1.0 and 0.99 Kb, containing the promoter region of *arsA* and *arpR*, respectively, were amplified using the primers FwarsA and RvarsAtrans and FwarpR and RvarpRtrans (S2 Table). The fragments were gel-purified, digested with *XbaI* and *PstI* and ligated to *XbaI-PstI* pLM2 vector to construct the plasmids pLM4 (*arsA-gusA*) and pLM6 (*arpR-gusA*). These plasmids were digested with *NdeI* and *ScaI*, respectively, and used to transform *A. vinelandii* strains for the selection of transformants carrying transcriptional *arsA-gusA* or *arpR-gusA* fusions integrated into the *mela* gene by a double recombination event. Digestion of the plasmids was carried out in order to avoid the selection of strains with plasmids integrated into the chromosome generated by single recombination events. The *mela* gene has been previously used as a neutral site to introduce gene fusions [19]. These strains are described in S1 Table.

For the construction of translational *arsA'-gusA* and *arpR'-gusA* fusions, DNA fragments of 1.3 and 1.1 Kb (containing the promoter region, the 5' untranslated region and the first five codons of each gene) were amplified with FwarsA and RvarsAtrad and FwarpR and RvarpRtrad primers for *arsA* and *arpR*, respectively. The PCR products were purified, digested with *XbaI* and *PstI* enzymes and ligated to *XbaI-PstI* pLM3 resulting in the plasmids pLM5 (*arsA'-gusA*) and pLM7 (*arpR'-gusA*). The plasmids pLM5 and pLM7 were digested with *NdeI* and *ScaI*, respectively, and used to transform *A. vinelandii* strains for the selection of the transformants carrying translational *arsA'-gusA* or *arpR'-gusA* fusions described in S1 Table. The presence of all fusions in the strains was confirmed by PCR analysis (data not shown).

Construction of plasmid pBpgyrA-*arpR* to express *arpR* from RpoS-independent promoter

First, we constructed the plasmid pJET-pgyrA cloning a 0.3 Kb DNA fragment containing the promoter region of *gyrA* gene (*pgyrA*) into vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific). A DNA fragment of 1.0 Kb containing the encoding region of *arpR* was amplified using the oligonucleotides arpRFw2 and arpRRv2 (S2 Table) and cloned into pJET-pgyrA downstream and the same direction of *pgyrA*. The fusion *pgyrA-arpR* was excised by digestion with *BglII* enzyme, gel purified, made blunt and cloned into *SmaI*-digested plasmid pBBR1MCs-5 [22], resulting in the plasmid pBpgyrA-*arpR*, which was transferred by conjugation into strain UW136::pALA8a.

Quantitative Real Time PCR (q-RT-PCR)

Expression levels of *arsA* and *arpR* was measured by qRT-PCR as previously reported [15]. The primers used for the assays (S2 Table) were as follows: *arsA*-RT-F and *arsA*-RT-R for *arsA*, *arpR*-RT-F and *arpR*-RT-R for *arpR*, and *fw-gyrA* and *rev-gyrA* for *gyrA*. The level of *gyrA* was used as internal control to normalize the results. All assays were performed in triplicate. The data was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method reported by Livak and Schmittgen [23].

Determination of alkylresorcinol production

The production of ARs was measured as previously described [24]. Briefly, the lipids were extracted with acetone for 1h at room temperature. The acetone extract was removed, and a second extraction was done for 12 h at room temperature. The resulting extracts were mixed and used for spectrophotometric determination of alkylresorcinols by the use of Fast Blue B as previously described [24]. Orcinol was used as a standard. The protein content of the cells used for AR determination was measured by the method of Lowry et al [25].

Quantification of β -glucuronidase activity

The β -glucuronidase activity was measured as described previously [26] from encystment-induced cells in BBOH medium harvested to 72 hours of incubation. 1 U corresponds to 1 nmol of p-nitrophenyl- β -D-glucuronide hydrolyzed per minute per mg of protein.

Results

Effect of *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* mutations on ARs synthesis

Strain UW136 is unable to produce alginate due to an insertion within the *algU* gene [27] therefore this strain is unable to produce genuine mature cysts, but under encystment induction medium produces ARs [4].

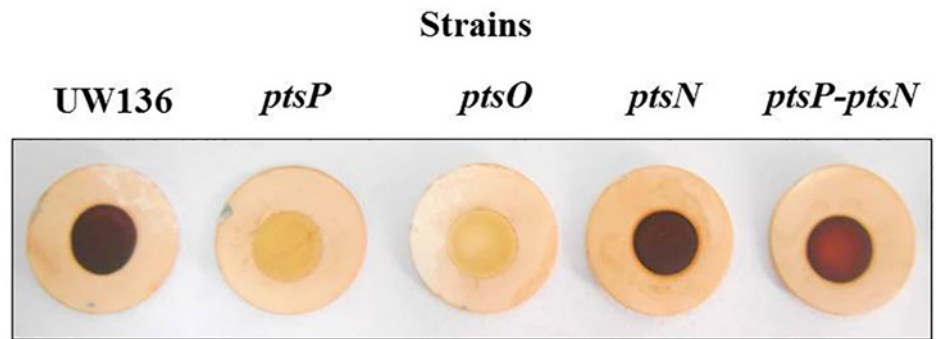
To determine if PTS^{Ntr} is involved in the regulation of the ARs synthesis, we analyzed ARs production in encystment-induced cells of *pts* mutants, by staining these lipids with dye Fast Blue B [4]. The *ptsN* mutant and the UW136 wild type strain developed a red color indicative of ARs synthesis, while the *ptsP* and *ptsO* mutants remained white (Fig. 1A). The quantification of ARs production in these strains confirmed the observed phenotype in plates; no ARs were detected in the *ptsP* and *ptsO* mutants, while the *ptsN* mutant presented a significant increase in ARs production relative to the UW136 strain (Fig. 1B). According to the phosphorylation cascade proposed for the PTS^{Ntr} [15] the *ptsP* and *ptsO* inactivations are expected to impair the phosphorylation of EIIA^{Ntr}, therefore, the unphosphorylated form of EIIA^{Ntr} could be involved in the negative effect observed on ARs synthesis. In agreement with this hypothesis, inactivation of *ptsN*, in the *ptsP* mutant background (*ptsP-ptsN* double mutant) restored the ARs synthesis (Fig. 1B).

Effects of PTS^{Ntr} mutations on *arsA* expression

In order to determine if PTS^{Ntr} affected ARs synthesis through an effect on *arsABCD* expression, transcriptional *arsA-gusA* and translational *arsA'-gusA* gene fusions were used. The transcription and translation levels of *arsA* were determined by measuring β -glucuronidase activity in derivatives of the wild type UW136 strain and the *ptsP*, *ptsO*, *ptsN* and *ptsP-ptsN* mutants carrying the gene fusions (S1 Table). We observed that *ptsP* and *ptsO* inactivations caused a similar decrease in the β -glucuronidase activity of both fusions (Fig. 2A and 2B), while in the *ptsN* mutant the activity increased in the transcriptional and translational fusions by 27% and 60% respectively. In the double mutant *ptsP-ptsN*, the β -glucuronidase activity of transcriptional fusion was partially restored, while the translational fusion showed a similar level to that observed in the wild type strain (Fig. 2A and 2B).

The level of *arsA* transcripts in the *pts* mutants was also evaluated by qRT-PCR. Table 1 shows that the *arsA* mRNA levels in *ptsP* and *ptsO* mutants were very low when compared to those observed in the wild type strain. In contrast, the *arsA* mRNA level was higher in the *ptsN* mutant and the double mutant *ptsP-ptsN* than in the UW136 strain. These results support the hypothesis that the non-phosphorylated form EIIA^{Ntr} negatively affects *arsA* expression at the transcriptional level.

A



B

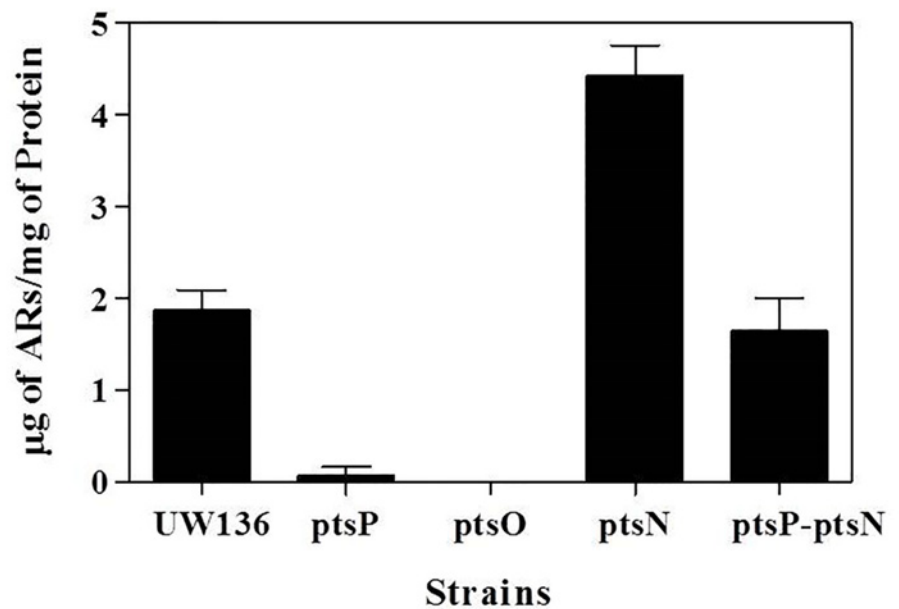


Fig 1. PTS^{Ntr} controls the ARs synthesis. Staining (**A**) and quantification (**B**) of alkylresorcinols produced by strains of *A. vinelandii* in BBOH medium to 120 hours of incubation. These data are mean of three independent experiments, error bars, SD.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.g001

Effects of PTS^{Ntr} mutations on *arpR* expression

The results shown above suggest that PTS^{Ntr} controls the ARs synthesis through the regulation of expression of *arsABCD*. We recently reported that ArpR, a LysR-type regulator, directly activates the transcription of *arsABCD* [6]. Therefore, the question of whether the PTS^{Ntr} affected the transcription of *arsA* through an effect on the *arpR* expression was raised.

To study the effects of *pts* mutations on *arpR* expression, we used the UW136, *ptsP*, *ptsO*, *ptsN* and *ptsP-ptsN* strains carrying transcriptional and translational fusions of *arpR* (S1 Table). Fig. 3A shows that transcription of *arpR*, measured as β -glucuronidase activity, decreased about 40% in the *ptsP* and *ptsO* mutants relative to the wild type strain, while the *ptsN* inactivation had no effect on *arpR* transcription in the UW136, nor in the *ptsP* strains (Fig. 3A). The β -glucuronidase

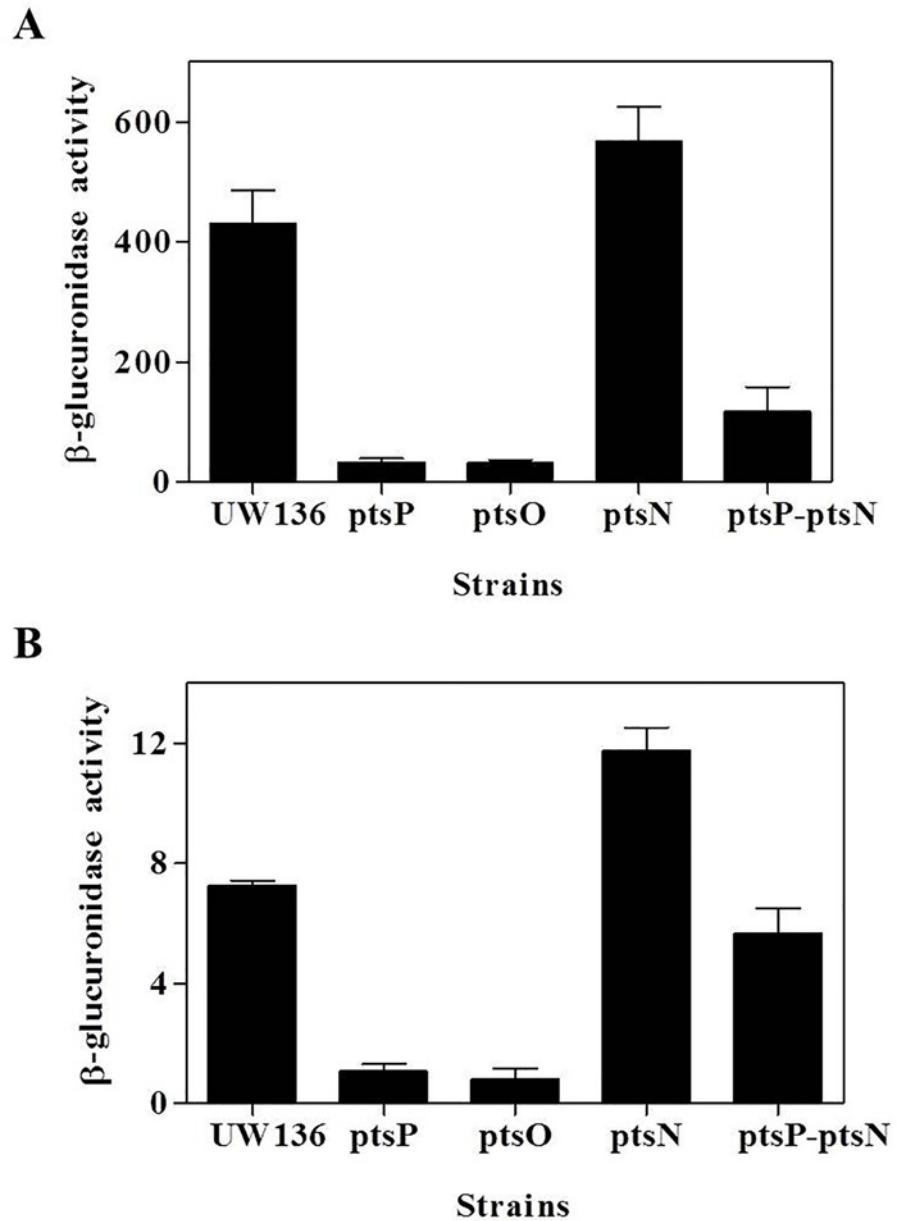


Fig 2. Effect of PTS^{Ntr} on *arsA* expression. β-glucuronidase activity in UW136 wild type strain and *pts* mutants carrying transcriptional *arsA-gusA* (A), or translational *arsA'-gusA* (B) gene fusions. The cells were grown for 72 h in BBOH medium at 30°C. The data represent the mean of three independent experiments. Error bars, SD.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.g002

activity in the wild type and *pts* mutants carrying the translational *arpR'-gusA* fusion (Fig. 3B), showed that the *ptsP* and *ptsO* mutations reduced about 50% the translation of *arpR*, as compared to the UW136 strain. In contrast, in the *ptsN* and *ptsP-ptsN* mutants a significant increase in the β-glucuronidase activity, relative to UW136 and *ptsP* strains respectively, was observed (Fig. 3B).

Using qRT-PCR, we found that the *ptsP* and *ptsO* mutations diminished the *arpR* mRNA level, while the *ptsN* inactivation increased it, in both the wild type UW136 and *ptsP* strains (Table 1). These results suggest that the non-phosphorylated EIIA^{Ntr} of the PTS^{Ntr} negatively controls *arpR* expression at the transcriptional and posttranscriptional levels.

Table 1. Relative mRNA levels of *arsA* and *arpR* in UW136 and *pts* mutants strains.

Strain	Relative mRNA levels*	
	<i>arsA</i>	<i>arpR</i>
UW136	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
PtsP	0.043 ± 0.007	0.021 ± 0.003
PtsO	0.099 ± 0.003	0.005 ± 0.003
PtsN	2.07 ± 0.24	2.7 ± 0.16
ptsP-ptsN	1.62 ± 0.10	1.3 ± 0.11

*The mRNA levels of *arsA* and *arpR* in *pts* mutants are relative to showed by UW136 strain, which are assumed to be 1.0. The values are the mean of two independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.t001

H68A mutation in the phosphorylation site of EIIA^{Ntr} impairs the transcription of *arpR*

The results presented above imply that the unphosphorylated form of EIIA^{Ntr} negatively controls the expression of *arpR*, affecting the transcription of *arsA* and, in turn, the synthesis of ARs. Thus, we tested the effect of a point mutation in *ptsN* (H68A), which produces a non-phosphorylatable EIIA^{Ntr}, on ARs production and on transcription of *arpR* and *arsA*. For this experiment we used the strain UW136::pALA8a, which carries the *ptsN*-H68A mutation [15]. As shown in Fig. 4A, this strain showed a negative ARs production, similar to that observed in the *ptsP* and *ptsO* mutants (compare Figs. 1A and 4A). In contrast, the strain UW136::pALA7, which carries a wild type *ptsN* gene [15] presented a phenotype of ARs production, similar to UW136 wild type strain. As shown in Fig. 4B, the *ptsN*-H68A mutation almost abrogated the β-glucuronidase activity in the strain carrying the transcriptional *arsA-gusA* fusion, and reduced by 60% the activity of the *arpR-gusA* fusion relative to the strain UW136::pALA7. These results indicate that the unphosphorylated EIIA^{Ntr} protein represses the transcription of *arpR*.

The negative effect of unphosphorylated EIIA^{Ntr} H68A on *arpR* transcription is through RpoS

The data presented above indicate that transcription of *arpR* is negatively regulated by the unphosphorylated EIIA^{Ntr} protein. Since *arpR* transcription is dependent on RpoS [6], we wanted to determine if the unphosphorylated EIIA^{Ntr} affects *arpR* expression through this sigma factor. For this, we determined the capacity of AR synthesis in the strain UW136::pALA8a (expressing the unphosphorylatable EIIA^{Ntr}) carrying the plasmid pBpgyrA-*arpR*, which expresses the *arpR* gene from an RpoS-independent promoter (*gyrA* promoter). As shown in the Fig. 5A, this strain was able to synthesize ARs in BBOH plates. In contrast, a negative phenotype of ARs production was shown by the strain UW136::pALA8a when was transformed with the empty plasmid pBBR1MCS-5. A similar effect was observed in BBOH liquid medium; the RpoS-independent expression of *arpR* increased the AR levels in the strain UW136::pALA8a (Fig. 5B). These results suggest that negative effect of unphosphorylated EIIA^{Ntr} on *arpR* expression is due to a negative effect on its transcriptional activation by RpoS.

Discussion

The alkylresorcinols are exclusively synthesized during the encystment in *A. vinelandii*, since the expression of *arsABCD* operon is specifically activated in this condition [4]. Here, we

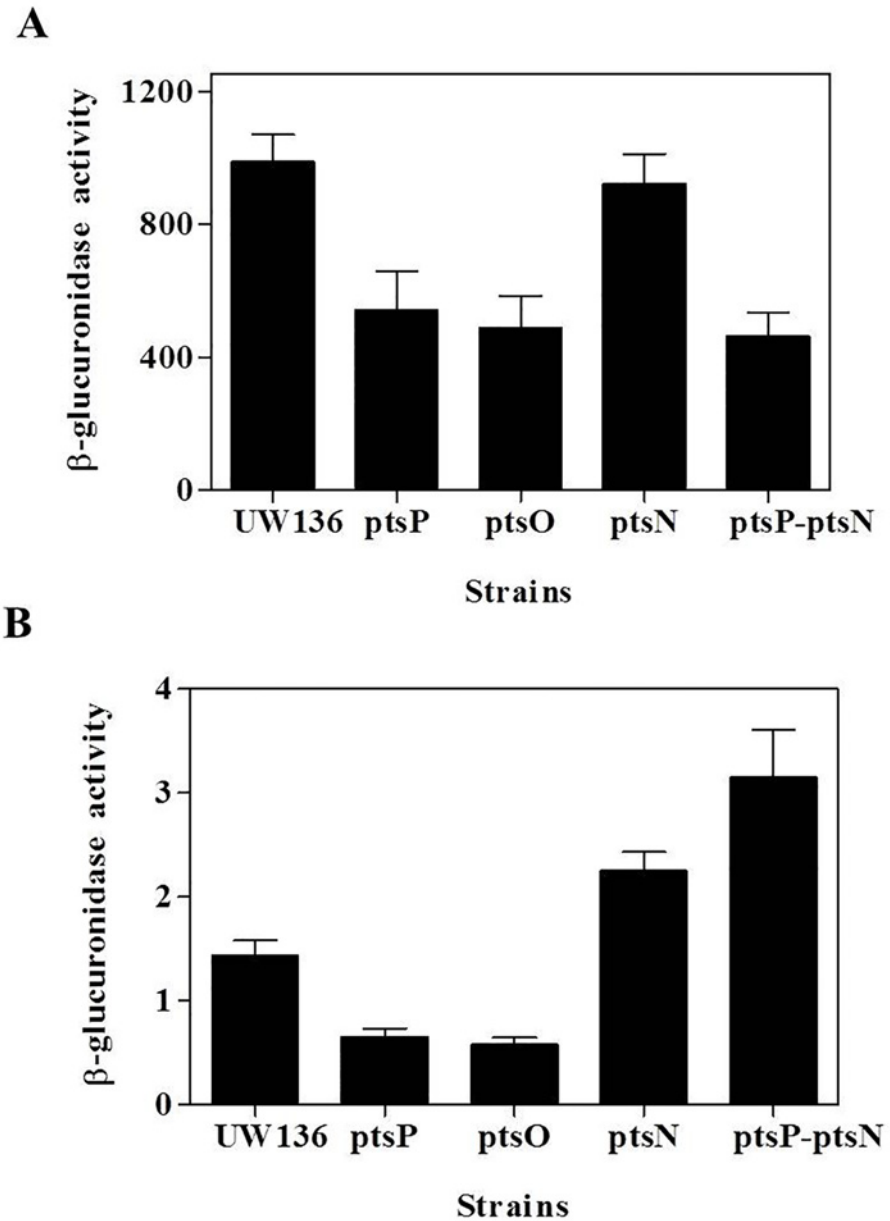


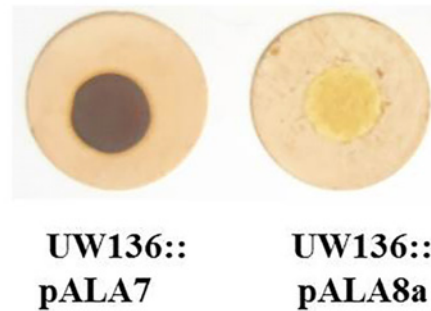
Fig 3. Effect of PTS^{Ntr} on *arpR* expression. β -glucuronidase activity in UW136 wild type strain and *pts* mutants carrying transcriptional *arpR-gusA* (A) or translational *arpR-gusA* (B) gene fusions. The cells were grown for 72 h in BBOH medium at 30°C. The data represent the mean of three independent experiments. Error bars, SD.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.g003

identified that PTS^{Ntr} regulates the expression of ARs biosynthetic operon, through regulation of its transcriptional activator ArpR.

The PTS^{Ntr} is present in many bacterial genus and controls diverse physiological processes through the phosphorylation state of EIIA^{Ntr} [8]. Since mutations on *ptsP* or *ptsO* impair the phosphoryl-group transfer to EIIA^{Ntr}, we hypothesized that absence of ARs synthesis in *ptsP* and *ptsO* mutants was mainly due to the presence of the unphosphorylated EIIA^{Ntr}. This was confirmed by two approaches. First, the inactivation of *ptsN* was sufficient to restore the ARs

A



B

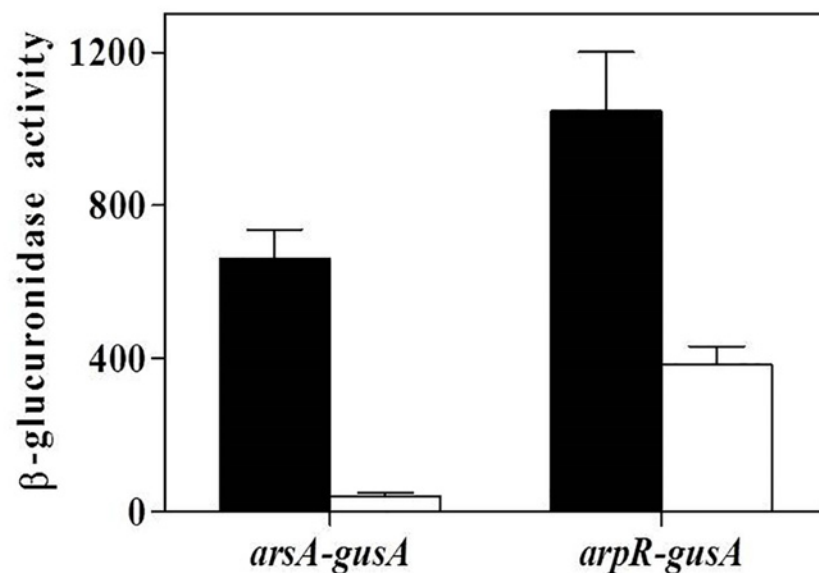


Fig 4. The unphosphorylated EIIA^{Ntr} negatively affects the ARs synthesis. Effect of H68A mutation on EIIA^{Ntr} on ARs production (A), and activity of transcriptional *arsA-gusA* and *arpR-gusA* fusions (B). The strains UW136::pALA7 (black bars) and UW136::pALA8a (white bars) carry an EIIA^{Ntr} and H68A EIIA^{Ntr}, respectively. The cells were grown for 120 h for (A) and 72 h for (B) in BBOH medium at 30°C. The data represent the mean of three independent experiments. Error bars, SD.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.g004

levels in the *ptsP* mutant (Fig. 1B), and second, the strain that harbors an unphosphorylatable EIIA^{Ntr} H68A (which presents a replacement on the phosphorylation site histidine by an alanine) showed a negative ARs production phenotype (Fig. 4A).

Unexpectedly, in the *ptsP-ptsN* double mutant the ARs levels were lower than in the *ptsN* mutant (Fig. 1B). Additionally, the *ptsP* mutation produced a stronger negative effect on ARs production than the mutation producing an unphosphorylatable EIIA^{Ntr} H68A protein (compare Figs. 1B and 5B), suggesting a secondary regulatory role of EI^{Ntr} and/or NPr proteins on ARs synthesis independent of its role in the phosphorylation of EIIA^{Ntr}. Additional experiments are necessary to validate this hypothesis.

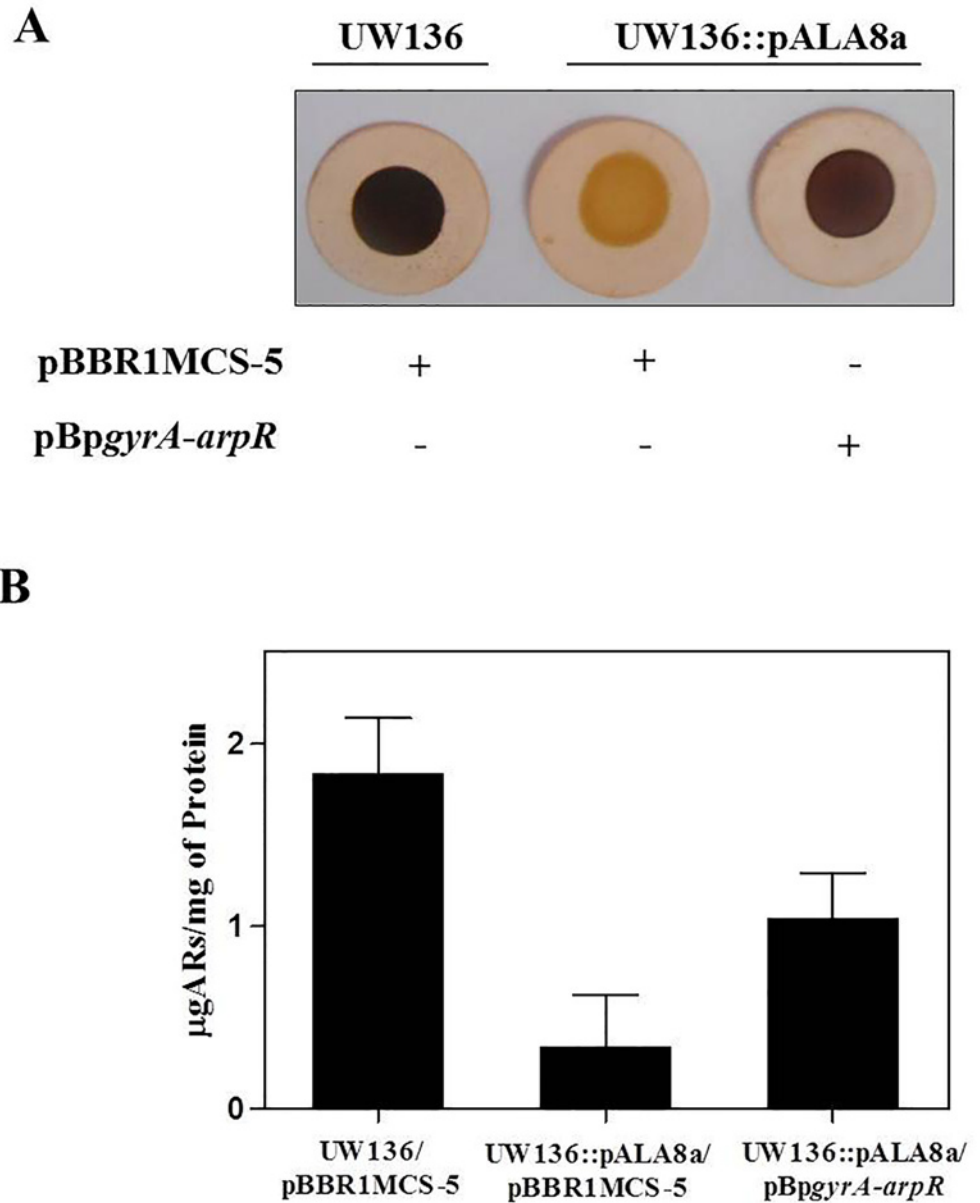


Fig 5. Effect of *arpR* expression from RpoS-independent promoter in the strain that carries the nonphosphorylatable EIIA^{Ntr} H68A protein. (A) Staining of ARs produced by UW136 and U136::pALA8a strains, transformed with plasmid PBpgyrA-arpR, carrying a constitutively expressed *arpR* gene or the empty plasmid pBBR1MCS-5 as negative control. **(B)** Quantification of ARs levels produced by the strains of the panel A. The data represent the mean of three independent experiments. Error bars, SD.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.g005

The difference in ARs production between the *ptsN* and the *ptsP-ptsN* mutants could also be explained by the presence of an EIIA^{Ntr} paralog that partially complements the *ptsN* mutation. However a single *ptsN* gene was found in the *A. vinelandii* genome.

The transcription of *arsA* was reduced when EIIA^{Ntr} was present in its unphosphorylated form (Fig. 4B). Recently, we reported that both *arsABCD* and *arpR* transcription are directly activated by ArpR and acetoacetyl Coenzyme A (acetoacetyl-CoA) as coinducer [6]. Because

the unphosphorylated EIIA^{Ntr} also reduced the *arpR* transcription (Fig. 4B), we concluded that the negative effect on *arsABCD* expression was due to a reduction of *arpR* expression. The negative effect of the EIIA^{Ntr} on expression of *arpR* could be explained by a reduction of the acetoacetyl-CoA pool. However this does not seem to be the case, since the presence of 5 and 50 μ M of acetoacetyl-CoA did not restore the AR synthesis in *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* H68A mutants (S1 Fig.). In contrast, an increase of ARs production phenotype dependent of acetoacetyl-CoA concentration was observed in the strains UW136, *ptsN* and *ptsP-ptsN* (S1 Fig.).

EIIA^{Ntr} has been shown to indirectly regulate the expression of several genes. For example, in *E. coli*, the interactions between EIIA^{Ntr} and kinase sensors KdpD and PhoR, increase the phosphorylation of response regulators KdpE and PhoB, resulting in increased expression of *kdpFABC* and the *pho* regulon, respectively [13,14]. Another interesting example is present in *Salmonella*, where EIIA^{Ntr} interacts with the SsrB response regulator, reducing the expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) [28]. Additionally, a relationship between EIIA^{Ntr} and the activity of sigma factors RpoS and RpoD has been previously described in *E. coli* [29]. In the absence of EIIA^{Ntr} (in a *ptsN* mutant), the potassium levels increase (by derepression of activity of K⁺ Trk transporter) resulting in preferential binding of the core RNA polymerase to RpoS instead of RpoD, and therefore, affecting the transcription of sigma regulons [29]. Here, we found that in *A. vinelandii* the negative effect of the unphosphorylated EIIA^{Ntr} on *arpR* transcription is through RpoS, since the expression of *arpR* from an RpoS-independent promoter was sufficient to restore ARs synthesis in the presence of unphosphorylated EIIA^{Ntr} (Figs. 5A and 5B). Further evidence supporting the participation of RpoS in the regulation exerted by EIIA^{Ntr} includes previous results showing that transcription of *phbR*, the gene encoding the transcriptional activator of PHB, and transcription of promoter pB₂ of *phbBAC* are also RpoS dependent [30,31] and repressed by unphosphorylated EIIA^{Ntr} [15]. We carried out additional experiments to confirm the negative effect of unphosphorylated EIIA^{Ntr} protein on the *phbB* and *phbR* RpoS-dependent promoters (S2A and S2B Fig.). Indeed, the β -glucuronidase activity of transcriptional *phbR-gusA* and *phbB-gusA* fusions is reduced in the *ptsP* mutant (S2A and S2B Fig.). The mechanism by which the nonphosphorylated EIIA^{Ntr} affects the RpoS activity in *A. vinelandii* remains to be elucidated.

Nonphosphorylated EIIA^{Ntr} also seems to control the expression of *arpR* at a posttranscriptional level since the *ptsN* mutation increased the activity of the translational *arpR-gusA* fusion in the wild type and *ptsP* strains (Fig. 3B). Additionally, mutations of *ptsP* and *ptsO* diminished about twofold the activity of the transcriptional *arpR-gusA* fusion (Fig. 3A), while the *arpR* mRNA levels, measured by qRT-PCR, were even lower in the *ptsP* and *ptsO* mutants (Table 1). A similar effect was shown on the expression of *ilvBN* in *E. coli*, where a *ptsN* mutation reduced about 50% the activity of a transcriptional *ilvB-lacZ* fusion, while the *ilvB* mRNA levels (detected by RT-PCR) were more drastically reduced [32]. The mechanism by which nonphosphorylated EIIA^{Ntr} negatively affects the *arpR* expression at posttranscriptional level remains to be determined. However, as the translational *arpR* fusion contains the 5' untranslated region of *arpR* mRNA (including the Shine-Dalgarno sequence), this mechanism could be related to a reduction of mRNA stability and/or to a blockage of translation.

In summary, a regulatory model for the control of ARs synthesis by PTS^{Ntr} is proposed (Fig. 6). The EIIA^{Ntr} protein in its nonphosphorylated state inhibits the activation of the transcription of *arpR* by RpoS. The repression of *arpR* expression impairs the transcriptional activation of biosynthetic *arsABCD* operon. Additionally, EIIA^{Ntr} negatively affects the *arpR* mRNA levels by an unknown mechanism. The elucidation of the molecular mechanisms that link PTS^{Ntr} with RpoS and posttranscriptional regulation of *arpR* will allow us understand the role of PTS^{Ntr} in *A. vinelandii*.

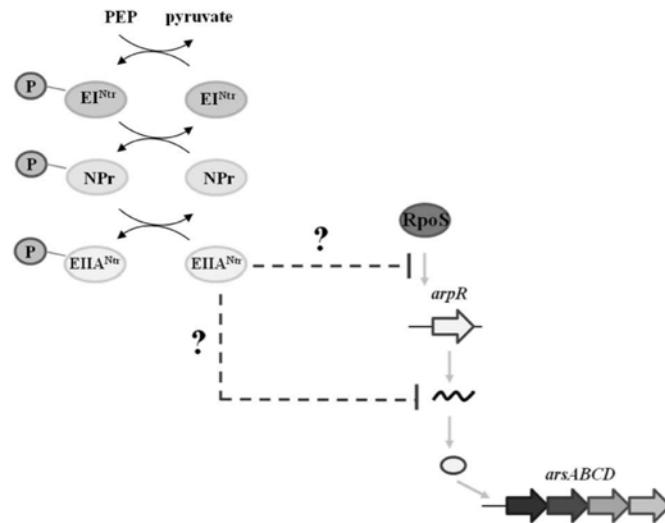


Fig 6. Model for the control of ARs synthesis by PTS^{Ntr} in *A. vinelandii*. The EIIA^{Ntr} protein in its unphosphorylated form represses the *arpR* expression both transcriptional (RpoS activity) and posttranscriptional levels. The dashed lines and gray arrows indicate negative effect and activation, respectively. PEP: Phosphoenolpyruvate, P: Phosphoryl group.

doi:10.1371/journal.pone.0117184.g006

Supporting Information

S1 Fig. Effect of acetoacetyl-CoA on ARs synthesis in *pts* mutant strains of *A. vinelandii*.

The strains were grown in BBOH medium in absence or presence of 5 and 50 μM acetoacetyl-CoA (coinducer) for 72 h at 30°C.

(TIF)

S2 Fig. Effect of the *ptsP* mutation on transcription of RpoS-dependent *phbR* and *phbB* genes. β-glucuronidase activity of transcriptional *phbR-gusA* (A) and *phbB-gusA* (B) fusions in UW136 and *ptsP* strains. The cells were grown in PY solid medium for 48 h at 30°C. The data represent the mean of two independent experiments. Error bars, SD.

(TIF)

S1 Table. Strains and plasmids used in this work.

(DOCX)

S2 Table. Oligonucleotides used in this work.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Paul Gaytán, Jorge Yanez, Eugenio López and Santiago Becerra for DNA synthesis and sequencing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GE LFMM. Performed the experiments: LFMM SM LBP YR. Analyzed the data: GE LFMM DS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MC. Wrote the paper: GE LFMM DS.

References

1. Sadoff HL (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 39: 516–539.
2. Reusch RN, Sadoff HL (1983) D(-)-poly-beta-hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J Bacteriol* 156: 778–788. PMID: [6415039](#)
3. Lin LP, Sadoff HL (1968) Encystment and Polymer Production by *Azotobacter vinelandii* in the Presence of B-Hydroxybutyrate. *J Bacteriol* 95: 2336–2343. PMID: [5669905](#)
4. Segura D, Vite O, Romero Y, Moreno S, Castaneda M, et al. (2009) Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J Bacteriol* 191: 3142–3148. doi: [10.1128/JB.01575-08](#) PMID: [19270099](#)
5. Funa N, Ozawa H, Hirata A, Horinouchi S (2006) Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6356–6361. PMID: [16597676](#)
6. Romero Y, Moreno S, Guzmán J, Espín G, Segura D (2013) Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 195: 1834–1844. doi: [10.1128/JB.01946-12](#) PMID: [23378510](#)
7. Cocotl-Yañez M, Sampieri A, Moreno S, Núñez C, Castañeda M, et al. (2011) Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 157: 1685–1693. doi: [10.1099/mic.0.046268-0](#) PMID: [21454367](#)
8. Pflüger-Grau K, Görke B (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol* 18: 205–214. doi: [10.1016/j.tim.2010.02.003](#) PMID: [20202847](#)
9. Higa F, Edelstein PH (2001) Potential virulence role of the *Legionella pneumophila ptsP* ortholog. *Infect Immun* 69: 4782–4789. PMID: [11447151](#)
10. Untiet V, Karunakaran R, Krämer M, Poole P, Priefer U, et al. (2013) ABC transport is inactivated by the PTS^{Ntr} under potassium limitation in *Rhizobium leguminosarum* 3841. *PLOS ONE* 8: e64682. doi: [10.1371/journal.pone.0064682](#) PMID: [23724079](#)
11. Michiels J, Van Soom T, D’hooghe I, Dombrecht B, Benhassine T, et al. (1998) The *Rhizobium etli rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. *J Bacteriol* 180: 1729–1740. PMID: [9537369](#)
12. Chang-Ro Lee S-HC, Mi-Jeong Yoon, Peterkofsky Alan, Yeong-Jae Seok (2007) *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4124–4129. PMID: [17289841](#)
13. Lüttmann D, Heermann R, Zimmer B, Hillmann A, Rampp IS, et al. (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 72: 978–994. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06704.x](#) PMID: [19400808](#)
14. Lüttmann D, Göpel Y, Görke B (2012) The phosphotransferase protein EIIA^{Ntr} modulates the phosphate starvation response through interaction with histidine kinase PhoR in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 86: 96–110. doi: [10.1111/j.1365-2958.2012.08176.x](#) PMID: [22812494](#)
15. Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernandez A, Juarez K, et al. (2008) Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly-β-Hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15: 244–254. PMID: [17878711](#)
16. Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C (1992) Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 58: 1711–1718. PMID: [1622243](#)
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Barry T, Geary S, Hannify S, MacGearailt C, Shaloo M, et al. (1992) Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucl Acids Res* 20: 4940. PMID: [1383933](#)
19. Cocotl-Yañez M, Moreno S, Encarnación S, López-Pliego L, Castañeda M, et al. (2014) A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 160: 479–487. doi: [10.1099/mic.0.073353-0](#) PMID: [24385478](#)
20. Hernandez-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, et al. (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 158: 11.
21. Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63–67. PMID: [7628718](#)
22. Kovach ME, Elzer PH, Steven Hill D, Robertson GT, Farris MA, et al. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175–176. PMID: [8529885](#)

23. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25: 402–408. PMID: [11846609](#)
24. Segura D, Cruz T, Espin G (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* 179: 437–443. PMID: [12732928](#)
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem* 193: 265–275. PMID: [14907713](#)
26. Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL, et al. (1995) β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 141: 1691–1705. PMID: [7551037](#)
27. Martínez-Salazar JM, Moreno S, Najera R, Boucher JC, Espín G, et al. (1996) Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J Bacteriol* 178: 1800–1808. PMID: [8606151](#)
28. Choi J, Shin D, Yoon H, Kim J, Lee C-R, et al. (2010) Salmonella pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIA^{Ntr}-SsrB interaction is required for Salmonella virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20506–20511. doi: [10.1073/pnas.1000759107](#) PMID: [21059960](#)
29. Lee C-R, Cho S-H, Kim H-J, Kim M, Peterkofsky A, et al. (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr}-dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol* 78: 1468–1483. doi: [10.1111/j.1365-2958.2010.07419.x](#) PMID: [21143318](#)
30. Peralta-Gil M, Segura D, Guzman J, Servin-Gonzalez L, Espin G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* 184: 5672–5677. PMID: [12270825](#)
31. Hernandez-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espin G (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology* 157:3014–3023. doi: [10.1099/mic.0.051649-0](#) PMID: [21778206](#)
32. Lee C-R, Koo B-M, Cho S-H, Kim Y-J, Yoon M-J, et al. (2005) Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol Microbiol* 58: 334–344. PMID: [16164569](#)