



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología

TESIS

**Regulación postranscripcional de la expresión de *rsmA/csrA* por
la RNA pirofosfohidrolasa RppH en *Azotobacter vinelandii* y en
*Escherichia coli***

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Doctora en Ciencias**

PRESENTA

M. en C. LEIDY PATRICIA BEDOYA PEREZ

TUTORA PRINCIPAL

Dra. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO
Instituto de Biotecnología

COMITÉ TUTORAL

Dr. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA
Centro de Ciencias Genómicas
Dr. JUAN MIRANDA RÍOS
Instituto de Fisiología Celular

Cuernavaca, Morelos. Junio 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mis papás, por enseñarme a vivir y ser feliz
a mis hermanos, por acompañarme en el camino,
a Nany, por estar siempre para mí,
a Luis Fe, por su amor incondicional
a Itzel y Alice por llenarme de luz.*

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Espín, por recibirme en su grupo y ser una guía en la ciencia.

A los Dres. David Romero y Juan Miranda de mi comité tutorial, por su disposición y sus valiosos aportes en el desarrollo de este proyecto.

A mi jurado, conformado por los Dres. José Luis Puente, Alfredo Martínez y Adrián Ochoa y las Dras Isabel López y Claudia Martínez, por la revisión y discusión crítica de este trabajo.

A CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A Mary, Sol, Jose y Cinthia, porque además de apoyarme en este trabajo siempre tuvieron un consejo y una palabra de aliento para mí.

A Daniel por aportarme mucho de su experiencia.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Espín-Merino, los que ya no están y los que continúan, por hacer más divertido el trabajo día a día.

A mis amigas de Colombia y México por estar siempre presentes.

A mis cuates por ayudarme a conservar mi salud mental.

A mis amigas mamás, por apoyarme en este doble reto.

A toda mi familia de nacimiento y a mi familia Muriel Millán, por siempre confiar en mí y darme su apoyo y cariño.

Ubuntu, yo soy porque nosotros somos

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	7
Biosíntesis y regulación de la producción de poli-β-hidroxi- <i>butirato</i> (PHB) en <i>A. vinelandii</i>	8
Biosíntesis y regulación de la producción de alquilresolcinolos (AR) en <i>A. vinelandii</i>	11
<i>Escherichia coli</i> y su mecanismo de motilidad	13
Sistema BarA/UvrY/Csr y GacS/GacA/Rsm	14
Sistema de fosfotransferasas asociado a Nitrógeno, PTS ^{Ntr}	15
Recambio de RNA y RNasaE	17
Nudix hidrolasa, RppH	20
ANTECEDENTES	22
RsmA regula negativamente la biosíntesis de PHB y AR en <i>A. vinelandii</i>	23
CsrA regula positivamente la expresión de <i>flhDC</i>	24
Contexto genómico de <i>rppH</i> y <i>ptsP</i>	25
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
General	28
Específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Alineamiento de secuencias y modelaje de la estructura de RppH	29
Procedimientos microbiológicos	29
Construcción de una cepa mutante <i>rppH</i> de <i>A. vinelandii</i>	33
Complementación de la mutante <i>rppH</i>	35
Construcción de la doble mutante <i>csrA-rppH</i> en <i>E. coli</i>	36
Análisis de operón	37
Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales <i>rsmA-gusA</i>	37
Análisis cuantitativo de PCR de transcripción inversa (qRT-PCR)	38

Estabilidad de los transcritos de <i>rsmA</i> y <i>csrA</i>	39
Complementación heteróloga de la mutante de <i>E. coli rppH</i>	39
Ensayos de motilidad	40
Métodos analíticos.....	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	41
Las proteínas RppH de <i>E. coli</i> (EcRppH) y RppH de <i>A. vinelandii</i> (AvRppH) son homólogas.....	41
Los genes <i>rppH</i> , <i>ptsP</i> y <i>Avin48220</i> son transcritos como un operón.....	43
La mutación en <i>rppH</i> disminuye la producción de PHB y ARs	45
RppH es necesaria para la expresión de <i>phbR</i> a nivel postranscripcional	48
La inactivación del gen <i>rsmA</i> restaura la síntesis de PHB y AR en la mutante <i>rppH</i>	50
Una mutación en <i>rppH</i> afecta la expresión de <i>rsmA</i>	51
La mutación en <i>rppH</i> aumenta la expresión de <i>csrA</i> en <i>E. coli</i>	53
La mutante <i>EcrppH</i> tiene un fenotipo de hipermotilidad que es suprimido por la mutación en <i>csrA</i>	55
Complementación de <i>EcrppH</i> con <i>AvrppH</i>	56
Otros blancos de RppH involucrados en la biosíntesis de PHB y AR en <i>A. vinelandii</i>	58
DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS.....	67

RESUMEN

La enzima RppH pertenece a la familia NUDIX hidrolasa y se encuentra ampliamente distribuida tanto en eucariotas como en procariotas. En la mayoría de las gammaproteobacterias, el gen que codifica para RppH se organiza formando un operón junto con el gen *ptsP*, que codifica para la proteína EI^{Ntr} del Sistema de Fosfotransferasa asociado a Nitrógeno, PTS^{Ntr}. En *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bdellovibrio bacteriovorus* y *Helicobacter pylori* se ha descrito que la RNA-pirofosfohidrolasa RppH está involucrada en la degradación dependiente del 5'-terminal de RNAs mensajeros. Nuestro modelo de estudio es *Azotobacter vinelandii* una bacteria del suelo, capaz de sintetizar diferentes compuestos de interés industrial, como alquilresolcionles (AR), alginato y poli-β-hidroxibutirato (PHB). El operón *phbBAC* codifica para las enzimas involucradas en la síntesis de PHB y su transcripción es activada por el regulador PhbR. Previamente se identificó que una mutación en el gen *ptsP* reduce la expresión de *phbR* y de *phbBAC*, y por lo tanto la síntesis de PHB. De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se determinó si el gen *rppH* está asociado a la acumulación de PHB en *A. vinelandii*. La inactivación del gen *rppH* redujo la producción de PHB debido a un aumento en la expresión de RsmA, un represor de la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional. Interesantemente, al igual que en *A. vinelandii*, una mutación en *rppH* en *E. coli* también afectó la expresión de *csrA* (homólogo de *rsmA*), aumentando la motilidad en esta bacteria. La inactivación del gen *rsmA/csrA* en las mutantes *rppH* restauró los fenotipos de PHB y motilidad a niveles silvestres en *A. vinelandii* y *E. coli*, respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a concluir que

la pirofosfohidrolasa RppH controla la expresión de *rsmA/csrA* a nivel postranscripcional.

ABSTRACT

In bacteria, the 5'-end-dependent RNA degradation is triggered by the RNA pyrophosphohydrolase RppH converting tri/diphosphate to monophosphate transcripts. This study shows that in the soil bacterium *Azotobacter vinelandii*, inactivation of *rppH* gene negatively affected the production of bioplastic poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by reducing the expression at the translational level of PhbR, the specific transcriptional activator of the *phbBAC* biosynthetic operon. The effect of RppH on the translation of *phbR* seemed to be exerted through the translational repressor RsmA, as the inactivation of *rsmA* in the *rppH* mutant restored the *phbR* expression. Interestingly, in *Escherichia coli* inactivation of *rppH* also affected the expression of CsrA, the RsmA homolog. The level of the *csrA* transcript was higher and more stable in the *E. coli rppH* mutant than in the wild type strain. Additionally, and in contrast to the *csrA* mutants that are known to have a defective swimming phenotype, the *E. coli rppH* mutant showed a hyper-swimming phenotype that was suppressed by a *csrA* mutation, and the AvRppH restored to wild type level the swimming phenotype to the *E. coli rppH* mutant. We propose that in both *A. vinelandii* and *E. coli*, RppH activity plays a role in the expression of the translational repressor protein RsmA/CsrA.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una γ -proteobacteria que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, vive en el suelo y es capaz de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno. Sus células son pleomórficas y pueden presentarse aisladas o en agregados irregulares. Es una bacteria poliploide, que contiene hasta 80 copias del cromosoma, lo cual se asocia con su gran tamaño 2 x 5 μm . Puede tener un volumen hasta de 16 veces más que *Escherichia coli* (Noar and Bruno-Bárcena, 2018).

En la fase vegetativa de crecimiento, *A. vinelandii*, en condiciones de exceso de una fuente de carbono y limitación de oxígeno, sintetiza poli- β -hidroxibutirato (PHB), un polímero de interés industrial para la producción de plástico biodegradable. Por otro lado, en condiciones adversas *A. vinelandii* sufre un proceso de diferenciación celular a quiste. En este proceso sintetiza alquilresorcinoles (AR), lípidos fenólicos que reemplazan los fosfolípidos de la membrana citoplasmática y constituyen el componente principal de la exina de los quistes (Figura 1). *A. vinelandii* también produce un exopolímero de interés industrial y farmacológico, el alginato, el cual está compuesto por ácido malurónico y glucurónico (Segura et al., 2003b).

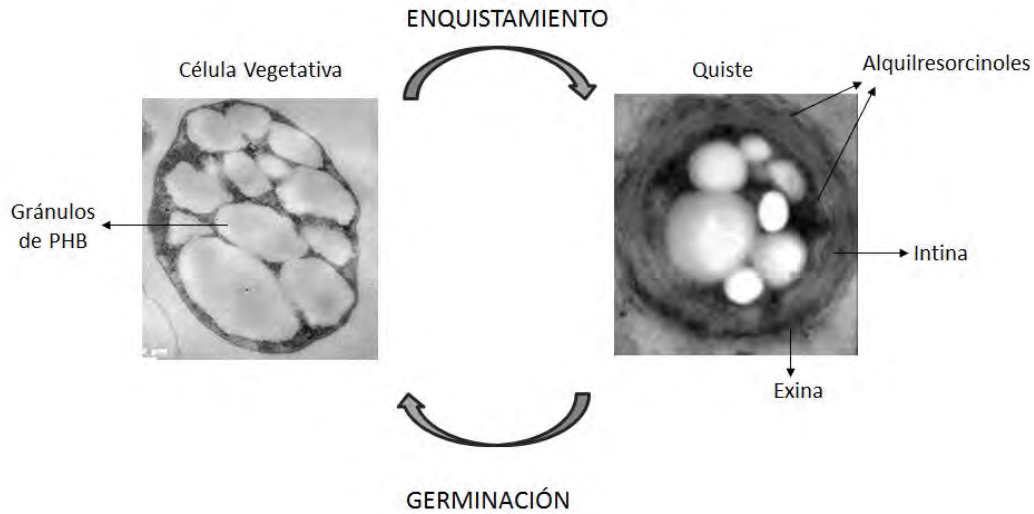


Figura 1. Célula vegetativa y quiste de *Azotobacter vinelandii*. En fase vegetativa, las células producen PHB. Pueden sufrir un proceso de diferenciación a quiste, que está compuesto por un cuerpo basal y capas de intina y exina, rodeado por alquilresorcinolos. En condiciones de crecimiento favorables los quistes pueden germinar y dar inicio a un nuevo ciclo de vida.

Biosíntesis y regulación de la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en

A. vinelandii.

El poli- β -hidroxibutirato o PHB tiene ciertas ventajas sobre los polímeros derivados del petróleo. Es una forma renovable de bioplásticos, biodegradables y puede usarse para elaborar dispositivos médicos biocompatibles o como soporte para cultivos celulares. Sin embargo, a la fecha su producción no tiene un costo competitivo con los termoplásticos derivados del petróleo. Es por esto que es necesaria mayor investigación para obtener un producto viable (Noar and Bruno-Bárcena, 2018).

El PHB es producido por aproximadamente 40 géneros bacterianos y se almacena en forma de gránulos intracelulares. En las células bacterianas puede representar hasta el 90% de su peso seco (Noar and Bruno-Bárcena, 2018).

En *A. vinelandii*, este polímero es producido principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento y al iniciar el proceso de enquistamiento, aunque posteriormente, en los quistes maduros disminuye su concentración (Segura et al., 2003a).

La síntesis de PHB inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, proveniente del piruvato, por la β -cetotiolasa para producir acetoacetil-CoA, posteriormente este compuesto es reducido a β -hidroxibutiril-CoA por la acetoacetil-CoA reductasa, para que finalmente la PHB sintasa polimerice varias unidades formando el PHB (Figura 2) (Hernandez-Eligio et al., 2011). Existen otras dos rutas por las cuales se pueden producir intermediarios para la síntesis de PHB, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, por sus siglas en inglés) y la β -oxidación de ácidos grasos.

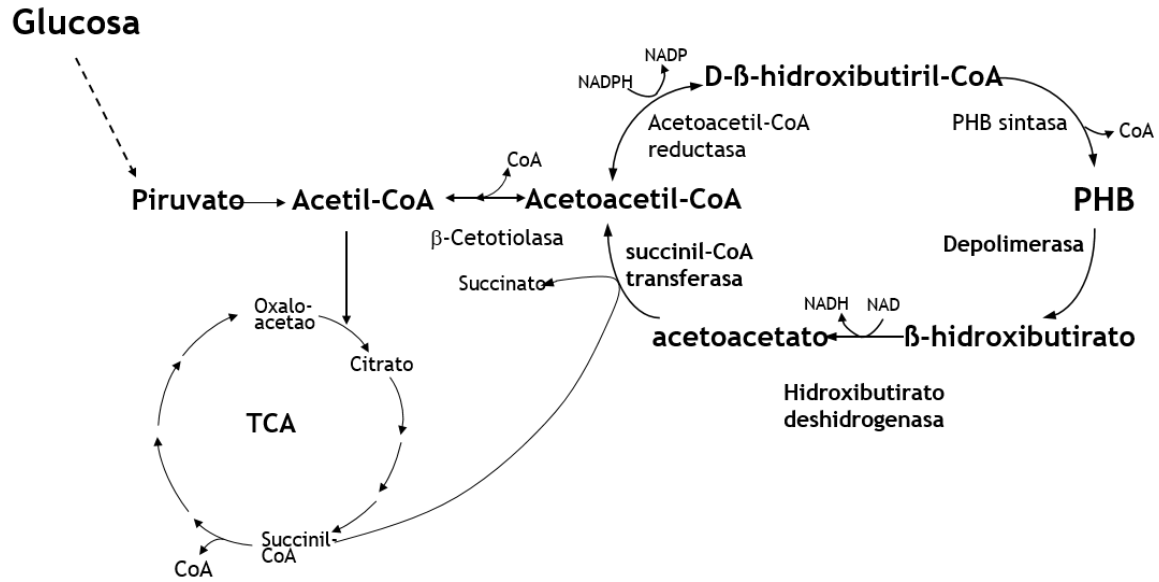


Figura 2. Síntesis de PHB. La síntesis de PHB inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la β -cetotiolasa para producir acetoacetyl-CoA, el cual es reducido a β -hidroxibutiril-CoA por la acetoacetyl-CoA reductasa y posteriormente es polimerizado a PHB gracias a la PHB sintasa. Este polímero puede ser degradado tanto por las bacterias productoras como por organismos no productores que contienen las enzimas depolimerasas e hidroxibutirato deshidrogenasas.

En *A. vinelandii*, los genes que codifican para las enzimas β -cetotiolasa (*phbA*), acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y PHB sintasa (*phbC*) se encuentran organizados en el operón *phbBAC* (Segura et al., 2003a).

Corriente arriba y de manera divergente al operón *phbBAC* está el gen *phbR*, el cual codifica para una proteína de igual nombre que es un regulador positivo de la transcripción del operón a partir de uno de sus dos promotores pB1 (Peralta-Gil et al., 2002). El otro promotor pB2 es reconocido por el factor sigma de fase estacionaria RpoS (Hernandez-Eligio et al., 2011).

Los sistemas globales Gac/Rsm y PTS^{Ntr} están involucrados en la regulación de la síntesis de PHB (Segura and Espín, 1998; Hernandez-Eligio et al., 2012).

Biosíntesis y regulación de la producción de alquilresolcinoles (AR) en *A. vinelandii*

Durante el enquistamiento, una considerable porción de los fosfolípidos de membrana son reemplazadas por lípidos fenólicos, alquilresolcinoles y alquilpironas, los cuales se constituyen de un anillo aromático polar y una cadena hidrofóbica de alquilo (Miyanaaga et al., 2007).

El operon *arsABCD* contiene los genes que codifican para las policetido sintásas tipo III (III PKSs), *arsA* y *arsD* y para las ácido graso sintásas tipo I (FASs), *arsB* y *arsC*. Su expresión es muy baja en la fase de crecimiento exponencial de la célula vegetativa y aumenta aproximadamente 14 veces durante la fase estacionaria. Sin embargo, durante el proceso de diferenciación a quiste, la expresión de este operón aumenta 200 veces y es en esta fase cuando se produce el pico más alto de síntesis de ARs (Romero *et al.*, 2013).

La expresión de este operón depende del regulador transcripcional tipo LysR, ArpR, que se expresa exclusivamente durante la fase de enquistamiento y del factor sigma de fase estacionaria RpoS, necesario para la transcripción de *arpR*. La activación

del operón también depende de la presencia de acetoacetyl coenzima A, que actúa como coinductor junto con ArpR (Romero *et al.*, 2013).

Los sistemas globales Gac/Rsm y PTSNtr están involucrados en la regulación de la síntesis de ARs (Muriel-Millán *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2016).

Para la síntesis de estos compuestos, los productos de ácidos grasos están covalentemente unidos a ArsA y posteriormente son liberados por ArsB o ArsC en presencia de malonil-CoA. Entonces, los ácidos grasos son transferidos directamente desde ArsA a una PKS tipo III como su sustrato inicial, lo que resulta en la síntesis de lípidos fenólicos por parte de ArsB y ArsC, para sintetizar alquilresorcinoles y alquilpironas respectivamente en *A. vinelandii*, en ausencia de intermediarios de Acil-CoA (Figura 3) (Miyanaga *et al.*, 2007, Segura *et al.*, 2003b).

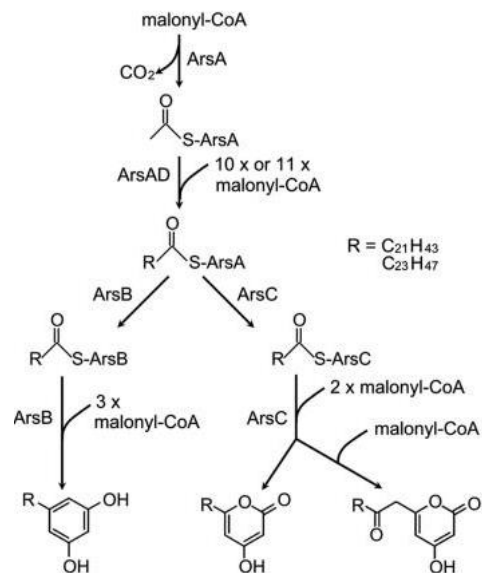


Figura 3. Síntesis de lípidos fenólicos (ARs y APs) en *A. vinelandii*. los ácidos grasos son transferidos directamente desde ArsA a una PKS tipo III como su sustrato inicial, en presencia de malonil-CoA, lo que resulta en la síntesis de lípidos fenólicos por parte de ArsB y ArsC, para sintetizar alquilresorcinoles y alquilpironas respectivamente (Miyanaga *et al.*, 2007).

***Escherichia coli* y su mecanismo de motilidad**

Las bacterias *E. coli* son un amplio grupo de bacilos gram-negativos de la familia de las enterobacterias que se encuentra en el medio ambiente, alimentos y es la bacteria anaerobia facultativa más abundante de la microbiota intestinal de humanos y animales. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, algunas causan infecciones gastrointestinales y otras infecciones del tracto urinario y enfermedades respiratorias en humanos.

Una característica fundamental en este tipo de bacterias, es su capacidad de moverse. La motilidad permite a las células alejarse de microentornos estresantes y dirigirse hacia nutrientes, oxígeno, luz u otros estímulos. La motilidad también es requerida para la formación de biopelículas, bajo ciertas condiciones de crecimiento (Wei *et al.*, 2001).

El flagelo es usado para desplazarse y es una de las estructuras más complejas en las bacterias. Se requiere aproximadamente el 2% de la energía celular total para su biosíntesis y rotación (Fitzgerald *et al.*, 2015).

La síntesis y motilidad flagelar es un proceso estrictamente regulado en todos los niveles. Este complejo sistema regulador permite la producción secuencial de componentes flagelares en el orden en que se requieren para el ensamblaje. FlhDC, un factor transcripcional atípico, es el regulador flagelar maestro en *E. coli* y en otras enterobacterias y es responsable de la activación directa o indirecta de la

transcripción de los componentes regulatorios y estructurales de la maquinaria flagelar. Además, sirve como un integrador de señales ambientales, nutricionales y de fase de crecimiento para la motilidad.

Al contrario de lo que ocurre en *A. vinelandii*, en donde RsmA regula negativamente la síntesis de PHB y AR, en *E. coli*, su homólogo, CsrA regula positivamente la motilidad (Yakhnin et al., 2011).

Sistema BarA/UvrY/Csr y GacS/GacA/Rsm

CsrA (*Carbon storage regulator*) y su homólogo RsmA (*regulator of secondary metabolism*) con el cual conserva un 74% de identidad de secuencia. Son proteínas pequeñas que reconocen sitios GGA en la región 5' no traducida o en los primeros codones de la región codificante de sus RNA mensajeros (RNAm) blanco. Generalmente, la unión de estas proteínas (CsrA/RsmA) a los RNAm afecta positiva o negativamente la traducción y la estabilidad de los mismos, ejerciendo un control postranscripcional (Suzuki *et al.*, 2002).

Un gran número de procesos fisiológicos complejos son regulados por CsrA/RsmA, dentro de estos se incluyen motilidad, metabolismo de carbono y virulencia. Además, activa procesos que apoyan el crecimiento exponencial. Mientras que reprime algunos de la fase estacionaria y las respuestas al estrés, como la formación de biopelículas y respuesta estricta, dada por ppGpp en escases de

aminoácidos. La regulación de la actividad de CsrA/RsmA es controlada por RNAs pequeños denominados *csrB* y *csrC*, en *E. coli* y RsmZ, RsmY y RsmX en bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* (a la cual pertenece *A. vinelandii*). Estos RNAs se unen a las proteínas CsrA/RsmA secuestrándola y evitando así su unión a los RNA mensajeros blanco (Potts *et al.*, 2017).

Los sistemas de dos componentes BarA/UvrY de *E. coli* y GacS/GacA en las *Pseudomonadaceae* participan en la regulación postranscripcional ejercida por la proteína CsrA/RsmA, ya que en su forma fosforilada la proteína UvrY/GacA activa la transcripción de los RNAs pequeños CsrBC/RsmZYX (Suzuki *et al.*, 2002; Babitzke and Romeo, 2007). En *A. vinelandii* el sistema Gac-Rsm controla la síntesis de PHB y AR ya que la proteína RsmA inhibe la traducción de los RNAm *phbR* y *arpR* (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). En *E. coli* CsrA contribuye en la expresión del regulador flagelar FlhDC (Yakhnin *et al.*, 2013).

Sistema de fosfotransferasas asociado a Nitrógeno, PTS^{Ntr}

El sistema de fosfotransferasas asociado a nitrógeno PTS^{Ntr} (por sus siglas en inglés), es homólogo al sistema PTS de carbohidratos presente en otras bacterias, en el cual se transfiere un grupo fosfato a partir del fosfoenolpiruvato mediante varias proteínas, formando una cadena de fosforilación donde el último aceptor es un azúcar para que pueda ser internalizado a la célula (Segura and Espín, 1998).

El sistema PTS^{Ntr} comprende las proteínas EI^{Ntr}, Npr y EIIA^{Ntr} que son codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* respectivamente y forman una cascada de fosforilación. Sin embargo, no se ha identificado un sustrato como aceptor final del grupo fosfato, por lo tanto este sistema se ha asociado estrictamente a procesos de regulación (Segura and Espín, 1998; Noguez et al., 2008).

Este sistema regula la síntesis de PHB y AR en *A. vinelandii* por disminución de la expresión de los genes biosintéticos. Las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* afectan negativamente la transcripción del operón biosintético *phbBAC* y del gen que codifica para el activador transcripcional del mismo, *phbR*. Así como sobre el operón biosintético *arsABCD* y su regulador *arpR*. Mientras que una mutación en *ptsN* aumenta la expresión de los genes asociados a la síntesis de PHB y AR (Noguez et al., 2008; Muriel-Millán et al., 2017).

Esta regulación se da a través del factor sigma de fase estacionaria, RpoS, el cual es llevado a degradación por la proteasa ClpAP cuando la enzima EIIA^{Ntr} se encuentra no fosforilada (Figura 4) (Segura et al., 2003b; Muriel-Millán et al., 2015), (Muriel-Millán et al., 2017).

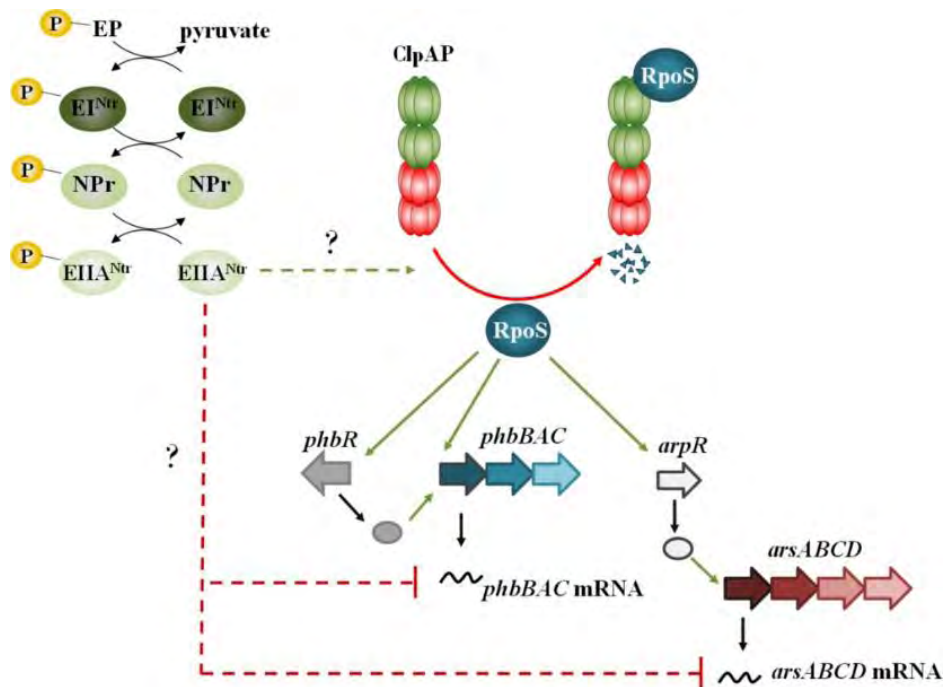


Figura 4. Modelo propuesto para el control de la síntesis de PHB y ARs por el sistema PTSNtr. las proteínas EI^{Ntr}, Npr y EIIA^{Ntr} forman una cascada de fosforilación, que inicia desde el fosfoenolpiruvato (PEP). En condiciones donde la EIIA^{Ntr} no está fosforilada induce la degradación de RpoS a través del complejo ClpAP, con lo que se reduce la transcripción de los operones biosintéticos y los reguladores de los mismos para la síntesis de PHB y ARs. Adicionalmente, EIIA^{Ntr} no fosforilada, también reprime a nivel postranscripcional la expresión de *phbBAC* y *arsABCD* por una vía que aún no se conoce (Muriel-Millán *et al.*, 2017).

Recambio de RNA y RNasaE

En la célula hay una serie de factores que afectan la vida media del RNA mensajero (RNAm). Entre ellos se destacan la tasa de crecimiento celular y la estructura y el estado de fosforilación del transcrito. Estos últimos determinan la tasa de degradación del RNAm, que limita la traducción a proteína y por lo tanto, regula su expresión (Bernstein *et al.*, 2002; Celesnik *et al.*, 2007).

La RNasa E es la endorribonucleasa más importante en *E. coli*. Su región N-terminal posee un dominio catalítico, mientras que la C-terminal permite el ensamblaje del

complejo multienzimático que en conjunto se conoce como degradosoma. Este complejo está compuesto por las proteínas RNasa E, RhlB, enolasa y PNPasa (Figura 5) (Aït-Bara *et al.*, 2015).

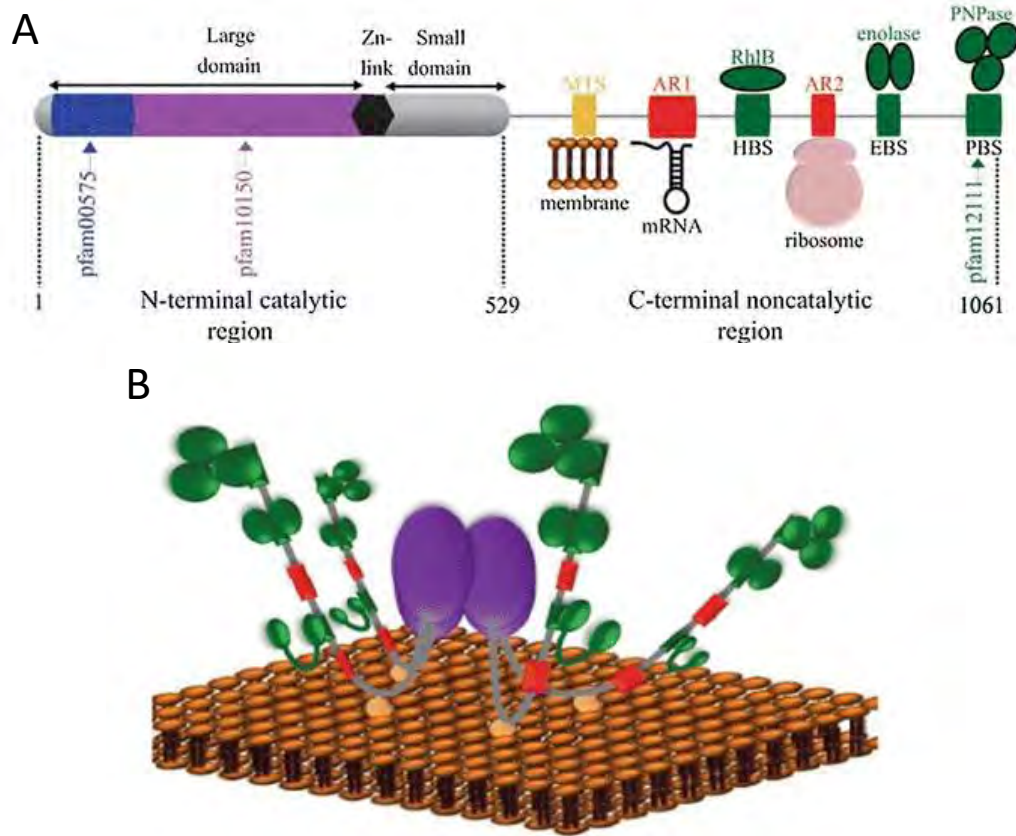


Figura 5. Estructura primaria de la RNasa E e interacciones canónicas. **A.** en la región N-terminal está el sitio catalítico (residuos 1-529) y en la C-terminal la región no catalítica (residuos 530-1061). La región catalítica está compuesta por un dominio grande, que contiene un motivo de unión de RNA S1 (Pfam00575 azul) y un sitio catalítico de unión a metal (Pfam10150 morado), un enlace de Zinc que tienen un papel estructural en la formación del dímero y un dominio pequeño con un papel estructural en las interacciones dímero y dímero-dímero. La región no catalítica contiene microdominios responsables de la interacción entre la RNasa E y la membrana plasmática interna (MTS), RNA (AR1 y AR2) y proteínas para formar el degradosoma de RNA canónico (HBS, sitio de unión a helicasa, EBS, sitio de unión a enolasa, PBS (Pfam12111), sitio de unión a PNPasa). **B.** Animación de la holoenzima RNasa E tetrámerica unida a la membrana citoplásmica interna y la organización del degradosoma de RNA. Núcleo catalítico (morado), región ID (gris) MTS (amarillo) sitios de unión de RNA (rojo); sitios de unión a proteínas verdes y proteínas asociadas (Aït-Bara *et al.*, 2015).

Por mucho tiempo no se había identificado el mecanismo por el cual se eliminaba el pirofosfato del 5'-terminal de los RNAm, lo que permitía su degradación por la RNasa E. Fue hasta el 2007 cuando el Dr. Belasco y colaboradores purificaron y probaron 12 enzimas Nudix hidrolasas de *E. coli*, identificando a NudH como una pirofosfohidrolasa de RNA. Esta enzima fue renombrada como RppH por sus siglas en inglés ***RNA pyrophosphohydrolase***, la cual elimina el pirofosfato del extremo 5'-terminal permitiendo el acceso de la RNasa E para que actúe como endoribonucleasa (Celesnik *et al.*, 2007; Deana *et al.*, 2008). En reportes recientes, se ha descrito que el sustrato mayoritario de la enzima RppH son los transcritos difosfatados (sobre los trifosfatados) en el 5'-terminal y que existe otra enzima, aún no caracterizada, que elimina el primer fosfato del transcrito (Figura 6) (Luciano *et al.*, 2017).

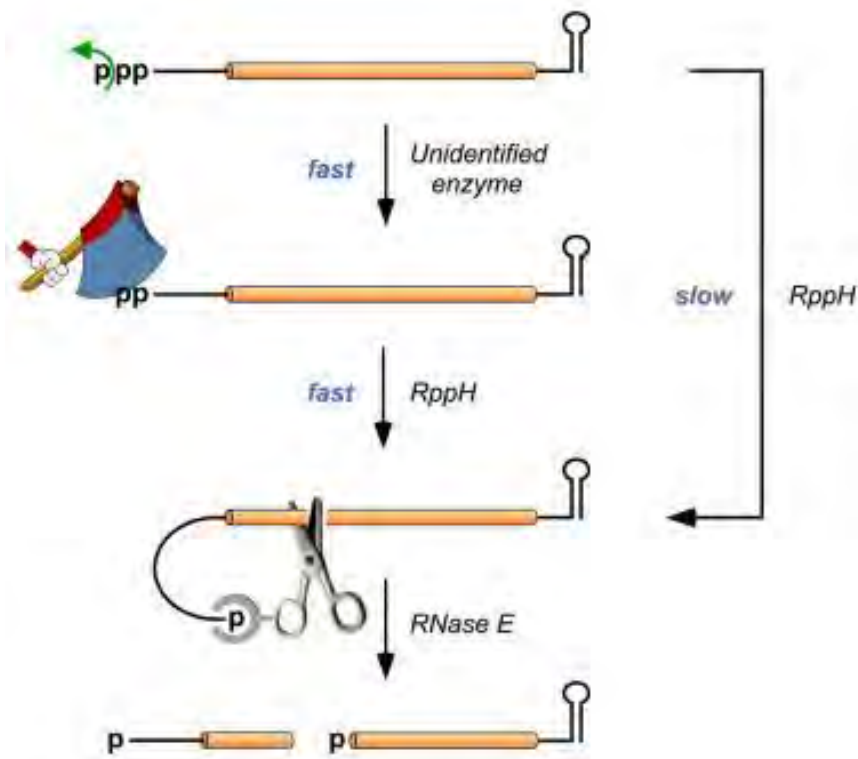


Figura 6. Mecanismo de degradación del RNA trifosfatado dependiente del extremo 5' en *E. coli*. Los fosfatos gamma y beta de los transcritos primarios trifosfatados, son removidos secuencialmente por una enzima no identificada y por RppH respectivamente. El transcrito monofosfatado es vulnerable a un rápido corte endonucleolítico por la RNasaE. Lo que lleva a fragmentos de RNA que son rápidamente degradados. EcRppH tiene preferencia sobre transcritos difosfatados, sin embargo, también puede actuar sobre los trifosfatos con menos afinidad (Luciano *et al.*, 2017).

Nudix hidrolasa, RppH

La súper familia de Nudix hidrolasa está presente tanto en eucariotas como en procariotas. Son comúnmente pirofosfohidrolasas activas en sustratos con la estructura NDP-X, **nu**cléosido **di**fosfato unido a un motivo **X**, (de donde deriva su nombre NUDIX) y contienen el motivo GX₅EX₇REUXEEXGU, donde X es cualquier

aminoácido y U es aminoácido alifático. Tras la reacción enzimática de pirofosfohidrolasa, RppH deja como producto nucleósido monofosfato (NMP) y un producto X. Además tienen actividad de fosfohidrolasa de nucleótido comprobada en diferentes géneros bacterianos (Tabla 1) y actividad con sustratos no nucleótidos, como inositol pirofosfato, tiamina pirofosfato y dihidroneopterina trifosfato (McLennan, 2013).

Inicialmente las pirofosfohidrolasas fueron descritas por Bessman en 1996 como enzimas “*housecleaning*” cuya función principal es eliminar el exceso de nucleótidos tóxicos y sus metabolitos, por ejemplo dNTPs mutagénicos oxidados. Sin embargo, no es claro si su función directa se extiende a aspectos de regulación metabólica (Richards *et al.*, 2012).

En un estudio reciente acerca de la especificidad y conservación evolutiva de la RppH en *E. coli*, Foley y colaboradores realizaron un tamizaje de ortólogos por comparación filogenética. Se encontró que las enzimas RppH están ampliamente distribuidas en alrededor de 1367 secuencias de especies representadas en todas las clases de proteobacterias, excepto en deltaproteobacterias, en este estudio, también describen todos los residuos del sitio activo (Foley *et al.*, 2015).

Tabla 1. RppH en diferentes géneros bacterianos

ESPECIE	ENZIMA	SUSTRATO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>	NudH (YgdP, RppH)	(d)NTPs, 5'-ppp-mRNA	(Deana <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus subtilis</i>	YtkD (RppH)	(d)NTPs, 5'-ppp-mRNA	(Hsieh <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Bd0174 (RppH)	(d)NTPs, 5'-ppp-mRNA	(Lee <i>et al.</i> , 2014)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	RppH	sRNAs	(Wachter and Hill, 2015)
<i>Helicobacter pylori</i>	HP1228/HpRppH	(d)NTPs, 5'-ppp-mRNA	(Bischler <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pseudomonas syringae/aeruginosa</i>	PA0336/Psyr_4843	(d)NTPs, 5'-ppp-mRNA	(Hockett <i>et al.</i> , 2014; Kujawa <i>et al.</i> , 2017)

ANTECEDENTES

RsmA regula negativamente la biosíntesis de PHB y AR en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii*, el regulador de respuesta GacA del sistema de dos componentes GacS/GacA, es requerido para activar la transcripción de los genes que codifican para siete RNAs pequeños RsmZ1-7 y un RsmY, los cuales se unen a RsmA, contrarrestando su actividad reguladora sobre sus blancos (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012).

Una mutante en el gen *gacA*, que codifica para la proteína del mismo nombre en *A. vinelandii*, disminuye la síntesis de PHB y ARs, debido a que se disminuye la transcripción de los RNAs pequeños que titulan a RsmA (Manzo *et al.*, 2011).

Por estudios previos, se sabe que la proteína RsmA reconoce los sitios GGA presentes en el transcrito del operón biosintético *phbBAC* y su regulador transcripcional *phbR*, así como el transcrito del regulador *arpR*, lo que afecta de manera negativa la síntesis de PHB y ARs, respectivamente (Figura 7). Así mismo, se demostró, que una mutante en el gen *rsmA*, presenta un aumento en la síntesis de ambos compuestos (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2016). Además de que el transcrito de *phbR* es más estable en la mutante *rsmA*, lo que confirma que RsmA está involucrada de manera directa en su degradación (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012).

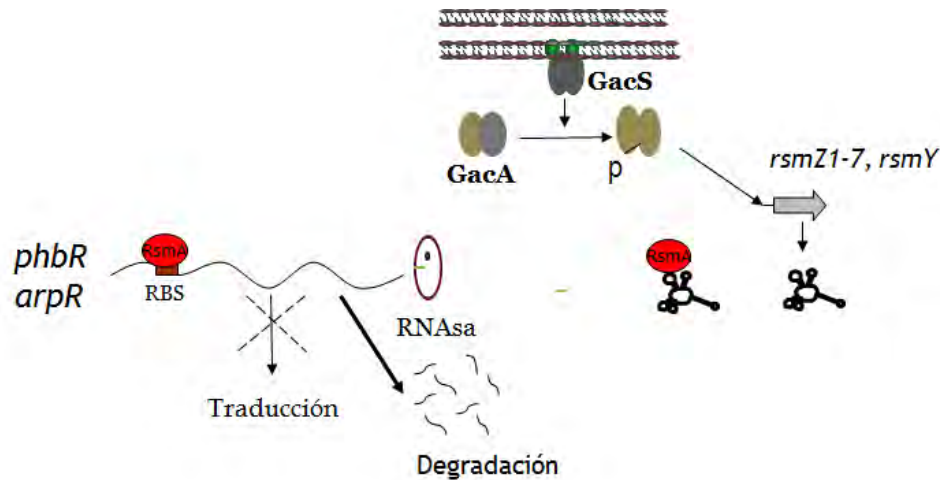


Figura 7. Modelo de regulación postranscripcional de la síntesis de PHB y ARs por el sistema Gac/Rsm. GacS fosforila a GacA y ésta proteína se une y activa la transcripción de los RNAs pequeños *rsmY/Z*, los cuales tienen sitios GGA para el reconocimiento e interaccionan con la proteína RsmA (derecha). Lo que evita la unión de RsmA a sus blancos, *phbR*, y *arpR* (entre otros) y en consecuencia permite su traducción. Cuando RsmA está presente, se une al sitio de unión a ribosomas (RBS) de sus blancos y se lleva a cabo la degradación de los transcritos de *phbR* y *arpR* (izquierda).

CsrA regula positivamente la expresión de *flhDC*

CsrA actúa principalmente como represor de la traducción en varios cientos de genes en *E. coli*, ya que se une a sus RNAm blancos y bloquea el acceso de la subunidad 30S del ribosoma a los transcritos. Sin embargo, se ha visto que actúa como regulador positivo de la biosíntesis del flagelo y la motilidad, a través de la regulación de la expresión del operón *flhDC*, su principal regulador (Wei *et al.*, 2001).

CsrA reconoce las secuencias GGA y se une a dos sitios separados por 31 nucleótidos en el extremo 5' del transcrito de *flhDC* lo que permite proteger,

estabilizar y prevenir la degradación de este RNAm por la RNAsa E, llevando a cabo la activación de la síntesis del flagelo y motilidad celular (Yakhnin *et al.*, 2013).

Una mutante de *csrA* en *E. coli* crecida en agar semisólido, muestra una nula motilidad, debido a la pérdida de flagelo. Además, se ha comprobado experimentalmente que, en esta mutante, la expresión y estabilidad del transcrito de *flhDC* está disminuida, lo que correlaciona con su fenotipo (Wei *et al.*, 2001).

Contexto genómico de *rppH* y *ptsP*

En *A. vinelandii*, al igual que en otras proteobacterias, el gen *rppH* se encuentra corriente arriba y en el mismo sentido del gen *ptsP*, que codifica para la proteína EI^{Ntr} del Sistema PTS^{Ntr} y controla la síntesis de PHB y ARs. Además, corriente abajo de *ptsP*, está el gen *Avin48220*, que codifica para una proteína de traducción de señales de c-di-GMP. Por estudios previos, se comprobó que el gen *Avin48220* no está relacionado, al menos, con la síntesis de PHB (Figura 8) (Segura and Espín, 1998).

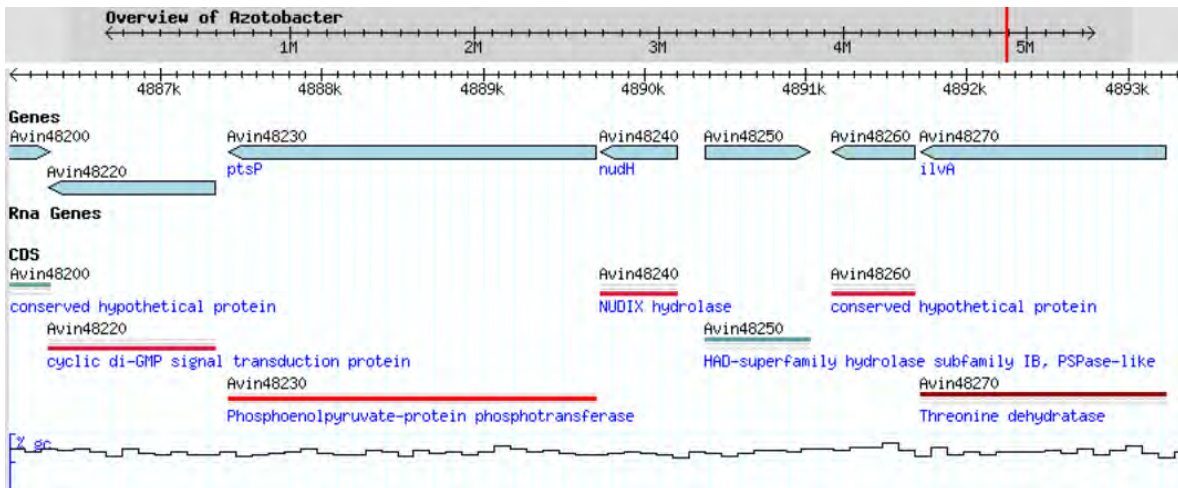


Figura 8. Contexto genómico de *rppH(nudH)-ptsP-Avin48220* en *A. vinelandii*. Se muestra la ubicación y orientación del posible operón *rppH(nudH)-ptsP-Avin48220* y los genes que se encuentran corriente arriba y abajo, con sus respectivos nombres.

En *A. vinelandii* se predijo que los genes *rppH*, *ptsP* y *Avin48220* constituyen un operón (<http://operons.ibt.unam.mx/gctNG/>). Este arreglo de tres genes en una sola unidad transcripcional también se conserva en *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas resinovorans*. En *E. coli* y otras especies de las proteobacterias, sólo los genes *rppH* y *ptsP* forman un operón (Figura 9).

Los genes que se organizan en operones, generalmente se encuentran participando en las mismas funciones celulares y vías metabólicas. Teniendo en cuenta el papel de la proteína EI^{Ntr}, (codificada por *ptsP*) en la regulación de la síntesis de PHB y ARs, es importante estudiar el gen *rppH* con el objetivo de investigar su papel en la síntesis de PHB y ARs.

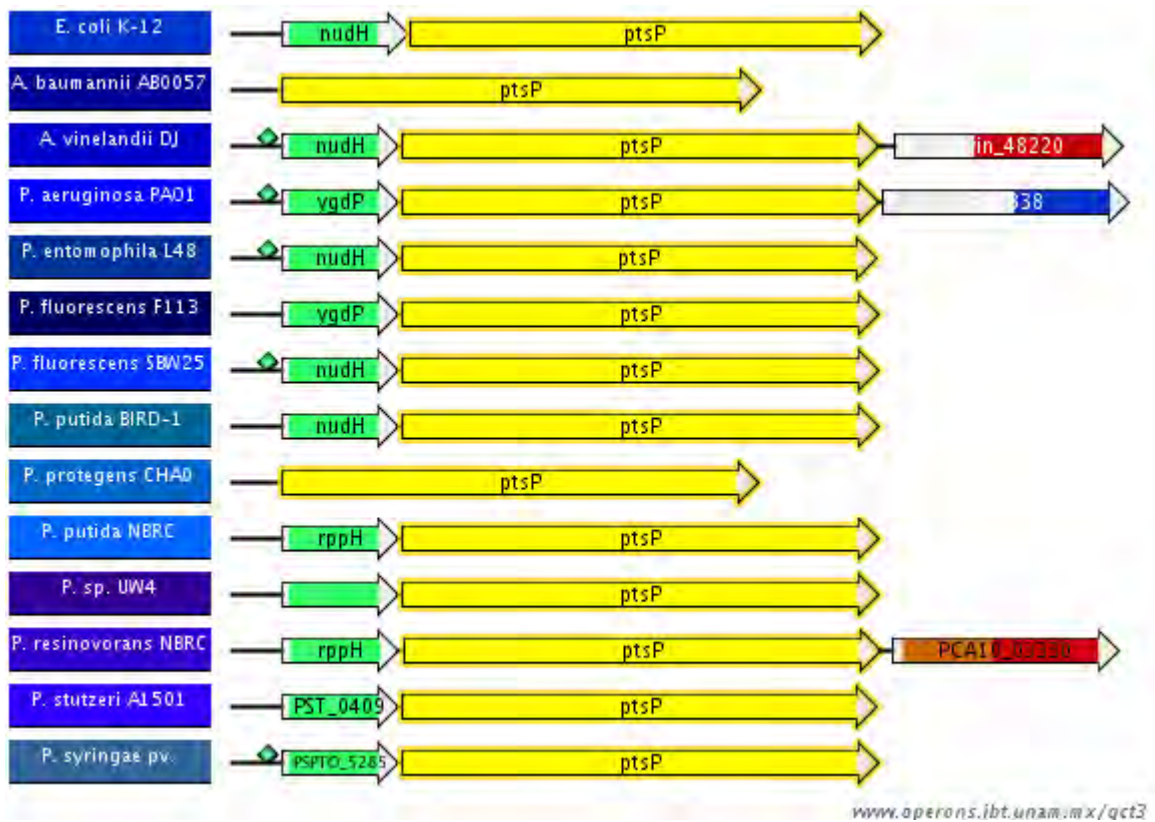


Figura 9. Predicción del operón de rppH en la familia Pseudomonadaceae y E. coli. Usando el software Gene Context Tool se predijo que los genes rppH-ptsP-Av48220 forman un operón en *A. vinelandii*. Este mismo arreglo de tres genes en operón se conserva en *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas resinovorans*. Para *E. coli* y otras especies de la familia Pseudomonadaceae se observan sólo dos genes, rppH(nudH)-ptsP, formando un operón.

HIPÓTESIS

El gen *rppH* constituye un operón con *ptsP* y *Avin48220* y codifica para una enzima que afecta la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

OBJETIVOS

General

Determinar el papel de la enzima RppH sobre la síntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii*.

Específicos

- ▶ Determinar si los genes *rppH* y *ptsP* constituyen un operón en *A. vinelandii*.
- ▶ Caracterizar el efecto de la mutación en el gen *rppH* sobre la biosíntesis de PHB y la expresión de *phbR* y *phbBAC*.
- ▶ Identificar los RNAm blancos de RppH asociados a la síntesis de PHB.
- ▶ Determinar si AvRppH cumple la misma función que EcRppH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alineamiento de secuencias y modelaje de la estructura de RppH

El análisis de secuencia de la proteína RppH de *A. vinelandii* (AvRppH) fue realizada por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool -<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>-) y para el alineamiento de secuencias múltiples se usó el programa Mafft (Kato *et al.*, 2002) y fue visualizado con Geneious® 10.1.3 trial.

Un modelo para la estructura tridimensional de AvRppH fue generado con las 10 estructuras depositadas en el PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) usando el programa I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement). mejor modelo generado fue basado en la estructura de RppH de *E. coli* (EcRppH) (PDB 4s2X) y tiene un C-score de 1.22, con un TM-score estimado de 0.88 ± 0.07 y un RMSD de 2.5 ± 1.9 Å (Vasilyev and Serganov, 2015).

Procedimientos microbiológicos

Las cepas y plásmidos usados en este estudio se detallan en la tabla 2. Las cepas de *A. vinelandii* fueron crecidas en medio peptona (5 g/L) y extracto de levadura (3 g/L) con 2% de sacarosa (PY) o en Burk con 2% sacarosa (BS) a 30°C (Kennedy *et al.*, 1986). Las cepas de *E. coli* DH5α y K12 fueron crecidas en medio Luria Bertani

(LB) a 37 °C (Tryptona 10 g/L, Extracto de levadura 5g/L, NaCl 10 g/L). Las concentraciones de antibióticos ($\mu\text{g/mL}$) usados para *A. vinelandii* y *E. coli*, respectivamente, fueron como se describe a continuación: espectinomicina (Sp) 100 y 50; tetraciclina (Tc), 30 y 15; kanamicina (Km), 1 y 30; rifampicina (Rif) 10 y 0; ampicilina (Ap), 0 y 200; ácido nalidixico (Nal), 20 y 0; y gentamicina (Gm), 1.5 y 10. La transformación y conjugación en *A. vinelandii* se realizó como se describió previamente (Bali *et al.*, 1992).

Tabla 2. Cepas y plásmidos usados en este trabajo

Cepas de <i>A. vinelandii</i>	Descripción	Referencia o fuente
OP	Silvestre, sensible a rifampicina	(Bush and Wilson, 1959)
OP <i>rppH</i>	OP con una mutación en <i>rppH::Sp</i>	Este trabajo
UW136	Derivada de OP resistente a rifampicina	(Kennedy et al., 1986)
UW <i>rppH</i>	UW136 con una mutación en <i>rppH::Sp</i>	Este trabajo
UW <i>rppH-rppH+</i>	UW <i>rppH</i> con el plásmido pSM <i>rppH</i> -Km integrado en el cromosoma	Este trabajo
UW <i>rppH-rsmA</i>	UW136 con mutación en <i>rppH::Sp</i> y <i>rsmA::Km</i>	Este trabajo
LSW1	UW136 con mutación en <i>ptsP::Tc</i>	(Muriel-Millán et al., 2015)
AHW13	UW136 con una fusión transcripcional de <i>phbR-gusA</i> in	(Hernandez-Eligio et al., 2012)
RppH <i>phbR</i> -T	UW <i>rppH</i> con una fusión transcripcional de <i>phbR-gusA</i>	Este trabajo
AHW17	UW136 con una fusión traduccional de <i>phbR'-gusA</i>	(Hernandez-Eligio et al., 2012)
RppH <i>phbR</i> -PT	UW <i>rppH</i> con una fusión traduccional de <i>phbR'-gusA</i>	Este trabajo
AHW21	UW136 con una fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i>	(Hernandez-Eligio et al., 2012)
RppH <i>phbB</i> -T	UW <i>rppH</i> con una fusión transcripcional <i>phbB-gusA</i>	Este trabajo
AHW25	UW136 con una fusión traduccional de <i>phbB'-gusA</i>	
RppH <i>phbB</i> -PT	UW <i>rppH</i> con una fusión traduccional <i>phbB'-gusA</i>	Este trabajo
UW <i>rsmA</i> -T	UW136 con una fusión transcripcional de <i>rsmA-gusA</i>	Este trabajo
RppH <i>rsmA</i> -T	UW <i>rppH</i> con una fusión transcripcional <i>rsmA-gusA</i>	Este trabajo
UW <i>rsmA</i> -PT	UW136 con una fusión traduccional <i>rsmA'-gusA</i>	Este trabajo
RppH <i>rsmA</i> -PT	UW <i>rppH</i> con una fusión traduccional <i>rsmA'-gusA</i>	Este trabajo

Tabla 2 (continuación). Cepas y plásmidos usados en este trabajo

Cepas de <i>E. coli</i>	Descripción	Referencia o fuente
K12 BW25113	Silvestre	Colección KEIO
JW2798-1	K12 BW25113 con una mutación en <i>rppH</i> ::Km	Colección KEIO
IFC5010	KSB837 con una mutación en <i>csrA</i> ::Km	(Camacho <i>et al.</i> , 2015)
K12csrA-rppH	IFC 5010 con una mutación por delección en <i>rppH</i>	Este trabajo
K12-pET22	K12 BW25113 con el plásmido pET22b	Este trabajo
K12-pAvrppH	K12 BW25113 con el plásmido pET22b-AvrppH	Este trabajo
K12rppH-pET22	JW2798-1 con el plásmido pET22b	Este trabajo
K12rppH-pAvrppH	JW2798-1 con el plásmido pET22b:AvrppH	Este trabajo
Plásmidos		
pJET 1.2/blunt	Vector de clonación	Thermo Scientific
pLBrppH	pJET 1.2 con un fragment de 0.8 kb que corresponde al gen <i>rppH</i>	Este trabajo
pLFMrppH::Sp	Derivado de pLBrppH con mutación en <i>rppH</i> ::Sp	Este trabajo
pSMrppH::Km	Derivado de pLBrppH con un casete de resistencia a Km	Este trabajo
pUMATcgusAT	Plásmido para fusiones transcripcionales con <i>gusA</i>	(Muriel-Millán <i>et al.</i> , 2015)
pUMATcgusAPT	Plásmido para fusiones traduccionales con <i>gusA</i>	(Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2014)
PrsmA-gusAT	Plásmido con fusión transcripcional de <i>rsmA-gusA</i>	Este trabajo
prsmA-gusAPT	Plasmid con fusión traduccional <i>rsmA-gusA</i>	Este trabajo
pET22b	Vector de expresión	Novagen
pLB-AvrppH	pET22b con <i>AvrppH</i>	Este trabajo
pKD3	Contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (<i>cat</i>) flanqueado por FRT	(Datsenko and Wanner, 2000)
pkD46	Recombinante (para hacer delecciones cromosómicas de genes con sitios FRT)	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Plásmido Red helper. AmpR Expresa la actividad de recombinasa de FLP. AmpR y CmR. Con replicación sensible a la temperatura	(Datsenko and Wanner, 2000)

Construcción de una cepa mutante *rppH* de *A. vinelandii*

Un fragmento de DNA que contiene el gen *rppH* fue amplificado usando *Phusion DNA polymerase enzyme* (*Thermo Scientific*) y los oligonucleotidos AvNuxF y AvNuxR (Tabla 3). El producto de PCR de 800 pb fue clonado en el vector pJET1.2 (*Thermo Scientific*) para producir el plásmido pLBrppH. El casete de resistencia a espectinomicina fue obtenido del vector pHP45Ω (Fellay *et al.*, 1987) y se insertó en el sitio de restricción *BamHI* presente dentro del pLBrppH con el objetivo de interrumpir el gen *rppH*. Este nuevo plásmido es pLFMrppH::Sp. A través de un análisis de PCR y de un mapa de restricción, se confirmó que el casete de resistencia a espectinomicina estaba clonado en la misma dirección de la transcripción de *rppH* (orientación no polar). En *A. vinelandii*, la inserción de los casetes de resistencia en la misma orientación de la transcripción de un gen que está en operón, permite la transcripción de los genes que están corriente abajo en el mismo operón (Núñez *et al.*, 2000). El plásmido pLFMrppH::Sp fue digerido con *ScaI* e introducido en la cepa *A. vinelandii* (Kennedy *et al.*, 1986). Se escogieron 10 colonias resistentes a Sp, fueron aisladas y se confirmó por PCR que llevaban la mutación *rppH*::Sp.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia (5'->3')	Referencia o fuente
rppHFw	AGA CGC ACG CTA GAA CCT C	Este trabajo
rppHRev	AGA TAG ACC GAG CAC ACC TG	Este trabajo
rppHexpFw	ATC CAT ATG ATC GAC CCC GAT GGA TTT C	Este trabajo
rppHExpRev	ATC CTC GAG ATC CCG TGC CAG CAG GC	Este trabajo
lg-nHPtFw	CCA GAA GCA GAA GTG GTT TCT	Este trabajo
lg-nHPtRev	CGG CGA AGT AAC GGT AGC	Este trabajo
Interg. ptsP/48220Fw	CAA CCT GCC CAA GGT CAA AT	Este trabajo
Interg. ptsP/48220Rev	AGA CGC TGT CGC TAA CCT TG	Este trabajo
Avin16SFw	GAA CAA TAT GAA TGA TAA CTT G	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> 2012
Avin16SRev	GCC ACT GGT GTT CCT TCC TA	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> 2012
rsmAFw	ATC CAT ATG ATC GAC CCC GAT GGA TTT C	Quiroz-Rocha <i>et al.</i> 2017
rsmARev	ATC CTC GAG ATC CCG TGC CAG CAG GC	Quiroz-Rocha <i>et al.</i> 2017
rrsBHK-Forw	TGC AAG TCG AAC GGT AAC AG	Este trabajo
rrsBHK-Rev	AGT TAT CCC CCT CCA TCA GG	Este trabajo
CsrAFw	GATGCCTCCTCTCGACAAAC	Este trabajo
CsrARev	CTGCCTGGCACAGCAATTG	Este trabajo
FlhDFwEc	CTC CGA GTT GCT GAA ACA CA	Este trabajo
FlhDRvEc	GCT TAA CCA TTT GCG GAA GA	Este trabajo
prsmA F SacI:	GAGCTCGTTTCCGTGGTCATCGAG	Este trabajo
pRsmA R2 EcoR1	GAATTCGGAAGTCAACAGGACAAC	Este trabajo
pRsmA-R PstI	CTGCAGATCACCCACCATGAGGGT	Este trabajo
FwEcrppH731	GCC CTG CAG AGA GTG GTT TA	Este trabajo
RvEcrppH731	AAC CAG AAT ATT TAA CGC CTC A	Este trabajo
ErppH-DtskFw1	GTG ATT GAT GAC GAT GGC TAC CGC CCA AAC TGT AGG CTG GAG CTG CTT	Este trabajo
ErppH-DtskRv1	TTA ACC TCT TTT ACG TCG ATA AGC AGA TGC GCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG TTT CCT AT	Este trabajo
ErppH-DtskFw2	TTC GTA TAT AAA GCT TTA TTT TGA GGT AGT CCG GTG ATT GAT GAC GAT GGC	Este trabajo
ErppH-DtskRv2	CAG GCG AGT GAG CAT AAT TGG CGT GAC TTA ACC TCT TTT ACG TCG ATA AGC	Este trabajo

Complementación de la mutante *rppH*

El casete de kanamicina obtenido del plásmido pBSL97 (Alexeyev *et al.*, 1995) fue clonado en el sitio de restricción *ScaI* del plásmido pLBrppH para obtener el plásmido pSMrppH-Km, el cual contiene una copia silvestre del gen *rppH*, incluyendo su secuencia promotora y es incapaz de replicarse en *A. vinelandii*. El vector pSMrppH-Km fue introducido en la cepa mutante *UWrppH* para cointegrarse en el cromosoma. La cepa complementada *UWrppH-rppH+*, fue una transformante resistente a kanamicina que mostró un fenotipo de producción de PHB igual que la cepa silvestre. La cointegración fue confirmada por PCR y mapa de restricción y sucedió corriente abajo del casete de resistencia a espectinomicina, permitiendo que el gen silvestre se transcriba desde su propio promotor (Fig. 10).

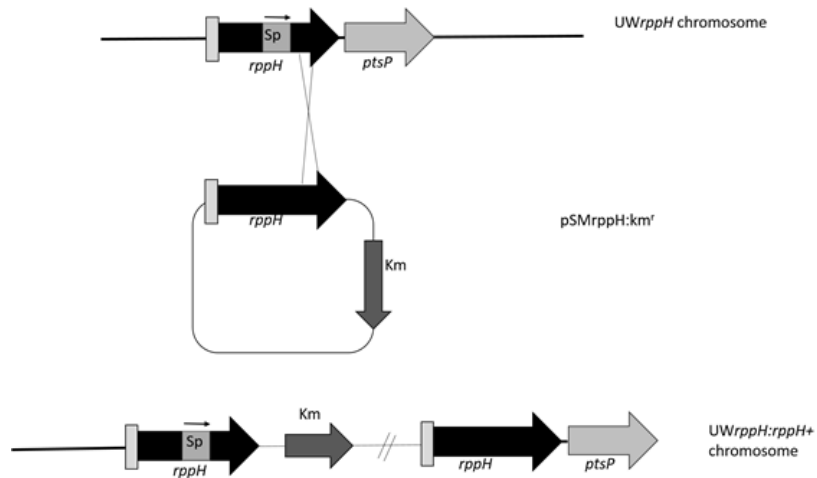


Figura 10. Cointegración del plásmido pSMrppH-Km en el cromosoma de la cepa *UWrppH*. La cointegración ocurre por un único evento de recombinación entre el gen silvestre *rppH* presente en el plásmido pSMrppH-Km y la región corriente abajo del casete de resistencia a espectinomicina en el gen mutado a *rppH::Sp*, presente en el cromosoma de la cepa *UWrppH*. La integración del plásmido fue confirmada por PCR.

Construcción de la doble mutante *csrA-rppH* en *E. coli*

La delección del gen *rppH* en el fondo de la mutante *csrA* fue realizada mediante el método reportado previamente (Datsenko & Wanner, 2000). El plásmido pKD3 se usó como templado para amplificar el fragmento de DNA que contiene el gen para la resistencia a cloranfenicol (*cat*) con los oligonucleótidos ErppHDtskFw1 y ErppHDtskRv1 (Tabla 3) y este gen está delimitado por los sitios RFT (*RFLP recognition target*). El producto de la PCR (PCR1) fue purificado y usado como templado para una segunda PCR (PCR2) usando los oligonucleótidos ErppH-DtskFw2 and ErppH-DtskRv2. El producto de PCR2 fue purificado, digerido con *DpnI* y usado para transformar por electroporación la cepa de *E. coli* K12 IFC5010 –*csrA*– (Camacho *et al.*, 2015) que contenía el plásmido ayudador pKD46. Las células transformantes resistentes a cloramfenicol fueron aisladas en agar LB adicionadas con cloranfenicol. Posteriormente, el plásmido pKD46 fue eliminado de la cepa incubando las transformantes en placas de LB sin antibiótico a 42°C. El gen *cat* fue eliminado del cromosoma de la mutante K12*csrA-rppH* usando el plásmido pCP20 que codifica la recombinasa FLP (Datsenko and Wanner, 2000).

Análisis de operón

Se extrajo RNA total de la cepa silvestre de *A. vinelandii* UW136, con Total RNA Purification Kit Cat#PP210L (*Jena Bioscience*) y se usó como templado para la síntesis de cDNA con *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1632* (*Thermo Scientific*). El cDNA se usó como templado para amplificar las regiones integénicas *rppH-ptsP* y *ptsP-Avin08220* con los oligonucleótidos Ig-nHPtFw y Ig-nHPtRv y Interg.ptsP/48220Fw y Interg.ptsP/48220Fw respectivamente. Un templado de DNA cromosomal de UW136 fue usado como control positivo y como control negativo se incluyó un templado de mezcla para cDNA sin transcriptasa reversa.

Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales *rsmA-gusA*

El plásmido con la fusión transcripcional de los genes *rsmA-gusA*, fue generado a partir de un fragmento de 274 pb, que contiene al promotor de *rsmA* amplificado por PCR usando los oligonucleótidos prsmA-F*SacI* y prsmA-R2*EcoR1* (Tabla 3). Este fragmento fue clonado en el vector pUMAT*cgusAT* (Muriel-Millán *et al.*, 2015), previamente digerido con *SacI* y *EcoRI*, lo que generó el plásmido *prsmA-gusAT*.

Para la construcción de la cepa que lleva la fusión traduccional *rsmA'-gusA*, se generó el plásmido *prsmA-gusAPT*. Un fragmento de DNA de 338 bp (contiene el

promotor, la región 5' no traducida y los primeros 16 codones de *rsmA*) fue amplificado usando los oligonucleótidos prsmA-F*SacI* y pRsmA-R*PstI* y clonado entre los sitios correspondientes en el plásmido pUMATcgusAPT (Cocotl-Yañez et al., 2014).

Los plásmidos resultantes fueron linearizados con la enzima *NdeI*, y usados para transformar las cepas UW136 y *rppH*. Diez colonias recombinantes, resistentes a tetraciclina (Tc^r) fueron seleccionadas y se verificó por PCR que contenían las fusiones transcripcionales *rsmA-gusA* o traduccionales *rsmA'-gusA* integradas en el cromosoma.

Análisis cuantitativo de PCR de transcripción inversa (qRT-PCR)

Los experimentos de qRT-PCR fueron realizado como se reportó previamente (Noguez *et al.*, 2008). El RNA total fue extraído de las cepas UW136 y *rppH* crecidas en medio BS líquido por 18 horas. Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio líquido LB por 4 horas. Los niveles relativos de *rsmA* y *csrA* fueron detectados usando los oligonucleótidos rsmAFw/Rev y csrAFw/Rev respectivamente (Tabla 3). Los niveles de 16s rRNA y *rrsB* fueron usados como control interno para normalizar los resultados en los análisis de *A. vinelandii* y *E. coli*, respectivamente. Todos los análisis fueron hechos por triplicado. Los datos fueron analizados por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Estabilidad de los transcritos de *rsmA* y *csrA*

Para el análisis de estabilidad del transcrito de *rsmA*, la cepa OP de *A. vinelandii* (silvestre sensible a rifampicina) (Bush and Wilson, 1959) y su derivada isogénica OP*rppH* (mutada en *rppH*) fueron crecidas en medio líquido BS 18 horas (precultivo de 12 horas). Se tomaron muestras en varios tiempos después de la adición de rifampicina (500 µg/mL concentración final) y el RNA total fue extraído. El análisis de qRT-PCR fue realizado como se describió previamente para los niveles del transcrito de *rsmA*. Los niveles de *gyrA* fueron usados como control interno.

Para determinar la estabilidad del transcrito de *csrA* en *E. coli*, las cepas fueron crecidas en medio LB líquido por 4 horas (precultivo de 12 horas). Se tomaron muestras en varios tiempos después de la adición de rifampicina (500 µg/mL concentración final) las cuales fueron usadas para determinar los niveles de transcrito de *csrA*, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. El gen *rrsB* fue usado como control de expresión constitutiva.

Complementación heteróloga de la mutante de *E. coli rppH*

El gen *AvrppH* fue amplificado por PCR usando como templado DNA comosomal de la cepa UW136 y los oligonucleótidos *rppHFwexp* y *rppHRevexp*. El producto de PCR de 480 pb fue digerido con las enzimas *XhoI* y *NdeI* y ligado en el vector

pET22b para generar el plásmido pLB-AvrppH. Las cepas de *E. coli* K12 y K12rppH fueron transformadas con este plásmido y con el plásmido pET22b vacío. Posteriormente se usaron para ensayos de motilidad en placas de agar suave (1% de triptona, 0.5% NaCl y 0.3% de agar) adicionadas con IPTG 0.1 mM.

Ensayos de motilidad

Las placas de agar suave preparadas con 1% de triptona, 0.5% NaCl y 0.3% de agar fueron utilizadas para los ensayos de motilidad en *E. coli* (Takekawa *et al.*, 2015). Un μL de muestra de un cultivo de 12 horas, crecido en agar líquido LB fue inoculado en las placas de agar suave. El halo de nado fue medido a las 6 horas de incubación a 37°C.

Métodos analíticos

Los niveles de producción de PHB se determinaron en células crecidas en placas de agar PY por 72 horas a 30°C (Slepecky and Law, 1961). El análisis de ARs fue hecho en células crecidas en placas de agar Burk Butanol (BBOH) por 120 horas, tal y como se describe previamente (Segura *et al.*, 2003b). La actividad de β -glucuronidasa fue medida como se describió previamente (Wilson *et al.*, 1995). Una unidad (U) corresponde a 1 nmol de p-nitrophenyl- β -D-glucuronida hidrolizado en

un minuto por mg de proteína. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism (version 7.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). La significancia estadística fue determinada considerando significativo un *p-value* ≤ 0.05 , usando una prueba de *t de Student*.

RESULTADOS

Las proteínas RppH de *E. coli* (EcRppH) y RppH de *A. vinelandii* (AvRppH) son homólogas

La actividad de la enzima RppH ha sido estudiada en diferentes géneros bacterianos y en todos se ha demostrado su papel como RNA pirofosfohidrolasa. Se realizó un análisis de BLAST con las RppH descritas en los diferentes géneros y la de *A. vinelandii*, que arrojó una identidad de secuencia entre AvRppH y EcRppH de 64%, y además identificó que la identidad de secuencia del motivo Nudix es 100% (Figura

11AC). Los aminoácidos que corresponden al sitio activo están conservados, excepto por Ser32 que en AvRppH corresponde a Ala32 (Figura 11A). Interesantemente, cuando en *E. coli* Ser32 es reemplazada por Ala, se observa una reducción en el número de sustratos de RNAm, es decir, su especificidad aumenta (Foley et al., 2015).

La estructura tridimensional de AvRppH fue modelada usando la estructura cristalográfica de EcRppH como templado y mostró una cobertura del 98 % (Figura 11B) (Vasilyev and Serganov, 2015). La similitud de secuencia y de estructura tridimensional (según el modelo) sugieren que AvRppH, al igual que EcRppH, es una RNA pirofosfohidrolasa.

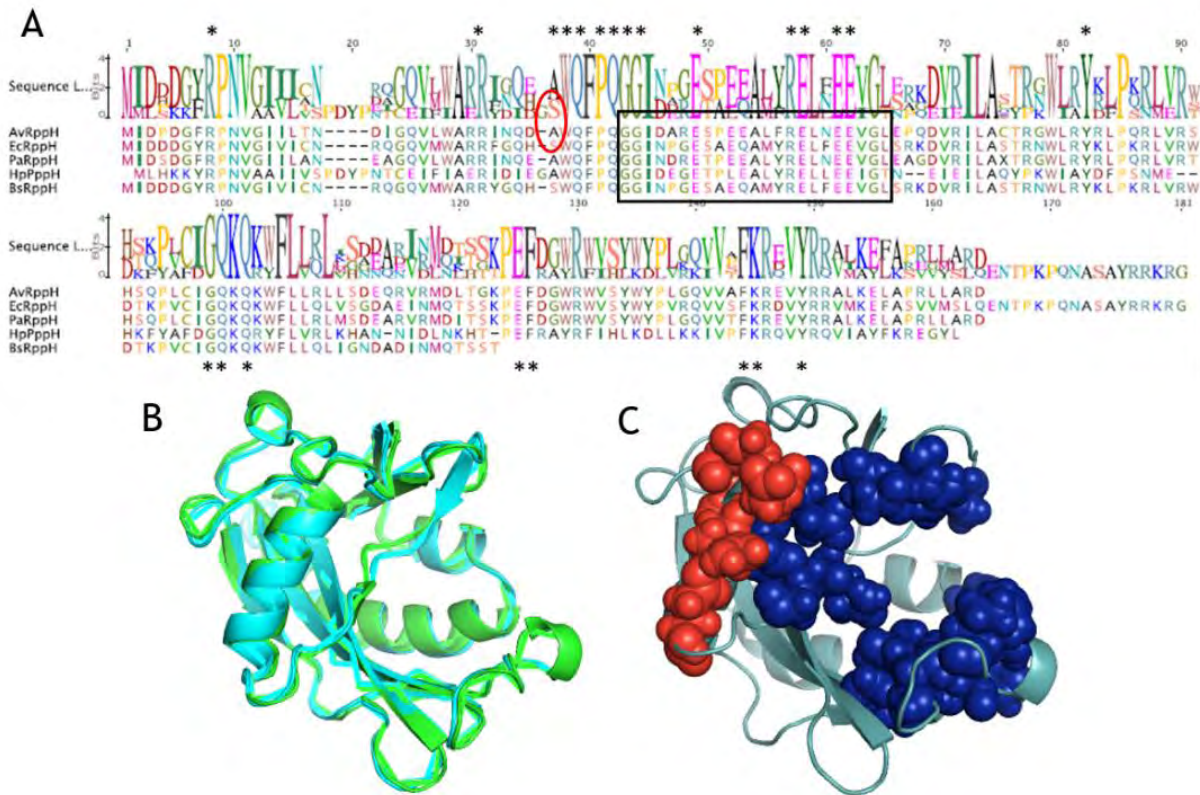


Figura 11. Alineamiento y estructura de RppH de *A. vinelandii* (AvRppH). **A.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AvRppH con la secuencia de RppH de *E. coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps), *Helicobacter pylori* (Hp) y *Bacillus subtilis* (Bs). El motivo nudix, (GX5EX7REUXEEXGU) está enmarcado en un rectángulo, los residuos catalíticos se indican con un asterisco (*). El cambio del residuo catalítico S por A es mostrado con un óvalo rojo. **B.** Predicción de estructura 3D de AvRppH (verde) sobrelapada con la estructura cristalizada de EcRppH (azul) **(C)** Predicción de estructura 3D de AvRppH con residuos catalíticos (azul) y caja Nudix (rojo).

Los genes *rppH*, *ptsP* y *Avin48220* son transcritos como un operón

En las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*, el gen *rppH* (*nudH*) está localizado corriente arriba de *ptsP*, que codifica para la proteína EI^{Ntr} del sistema PTS^{Ntr} (Pflüger-Grau and Görke, 2010). En *A. vinelandii* se predijo que los genes *rppH*, *ptsP* y *Avin48220* forman un operón. El arreglo genético *rppH-ptsP-Avin48220*

también se conserva en *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas resinovorans* y en algunas especies de Enterobacterias.

Con el propósito de confirmar la predicción del operón *rppH-ptsP-Av48220* en *A. vinelandii*, se realizó un ensayo de retrotranscripción a partir de RNA total obtenido de la cepa silvestre UW136. El cDNA sintetizado fue usado como templado para amplificar las regiones intergénicas *rppH* y *ptsP* y parte de las secuencias codificantes adentro de cada uno de los genes (500 pb). Y de igual forma entre *ptsP* y *Avin48220* (300 pb) (Figura 12A). Como control positivo se utilizó DNA cromosomal de la cepa UW136. En la figura 12B se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos de las regiones intergénicas, donde se usó como templado el cDNA (+) mezcla de cDNA sin transcriptasa reversa (-) y DNA cromosomal (C). Debido a que una molécula de transcrito contiene la secuencia de los dos genes amplificados y su región intergénica, este resultado confirma experimentalmente que *rppH*, *ptsP* y *Avin48220* constituyen un operón.

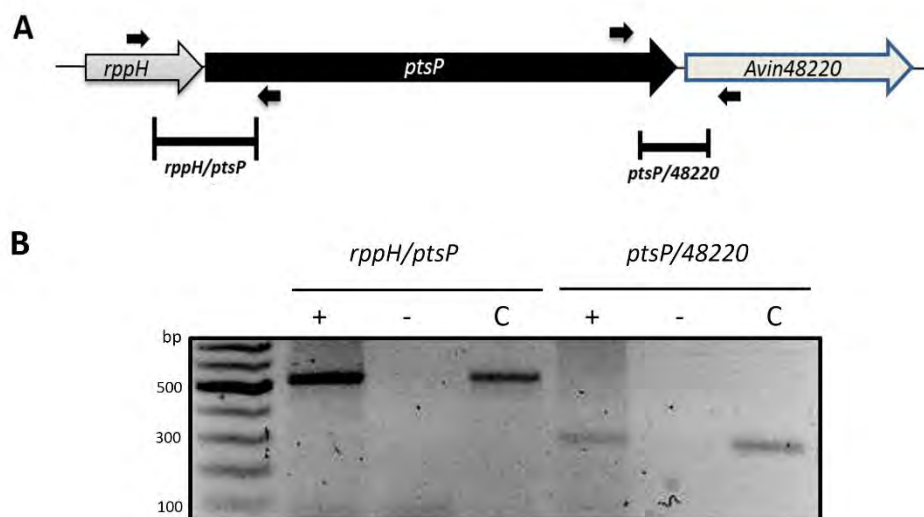


Figura 12. Los genes *rppH*, *ptsP* y *Avin48220* se transcriben como un operón. **A.** representación gráfica del operón, donde se muestra la región amplificada por RT-PCR usando los oligonucleótidos para las regiones intergénicas. **B.** Electroforesis de agarosa al 1% donde se muestran los fragmentos amplificados por RT-PCR de las regiones intergénicas a partir de templados de cDNA con (+) y sin (-) transcriptasa reversa y el fragmento correspondiente al control positivo (C), donde se usó como templado DNA cromosomal de la cepa silvestre de *A. vinelandii* UW136.

La mutación en *rppH* disminuye la producción de PHB y ARs

En bacterias, las proteínas codificadas por genes presentes en un operón, generalmente, están involucradas en la misma función o rutas metabólicas. Ya que *rppH* y *ptsP* forman un operón, y sabemos que EIA^{ntr}, codificada por *ptsP*, está involucrada en la síntesis de PHB y AR, nos preguntamos si *rppH*, también afecta la síntesis de estos compuestos en *A. vinelandii*.

Para la construcción de la mutante en *rppH*, es necesario aclarar que en estudios previos, se ha demostrado que en una mutación en el primer gen de un operón en *A. vinelandii*, la inserción de casetes Ω en la misma orientación de la dirección de la

transcripción, produce una mutación no polar, lo que permite la transcripción de los genes corriente abajo en el operón, a partir del promotor del casete insertado (Mouncey et al., 1995). Por medio de qRT-PCR se confirmó que la transcripción de *ptsP* no fue afectada en la mutante no polar de *rppH* (figura 13).

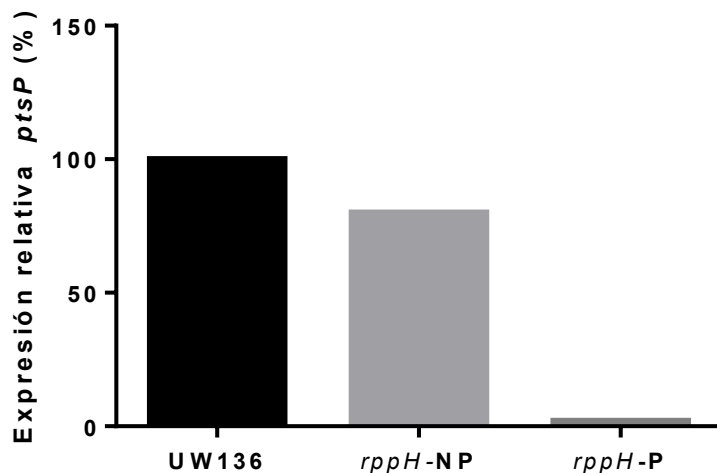


Figura 13. La expresión de *ptsP* no se altera en la mutante no polar de *rppH*. Por medio de análisis de qRT-PCR se comprobó que en la mutante no polar (NP) de *rppH* no se afecta de manera considerable la expresión de *ptsP*. Por el contrario la mutante polar (P) la expresión es casi nula.

La mutante UW*rppH* no polar, presentó una disminución de alrededor del 70% en la acumulación de PHB con respecto a la cepa silvestre UW136 (Figura 14A). Así mismo, la mutante UW*rppH* presentó una disminución en la producción de alquilresorcinoles (Figura 14B).

Para demostrar el papel positivo de RppH sobre la producción de PHB y AR, la cepa *UWrppH* fue transformada con el plásmido pSMrppH:Km^r, que contiene una copia silvestre del gen *rppH*, el cual fue integrado dentro del cromosoma. La cepa complementada *UWrppH:rppH+* presentó fenotipos de producción de PHB y AR similares a los silvestres (Figura 14AB). Este resultado confirma que RppH es requerida para la síntesis óptima de ambos compuestos.

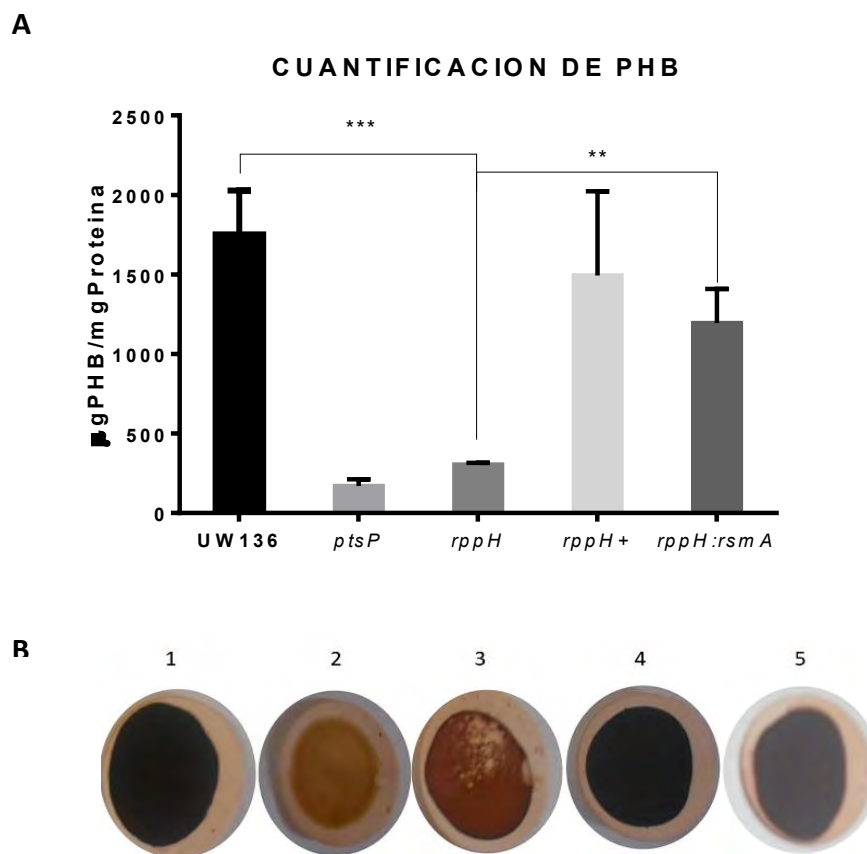


Figura 14. Cuantificación de PHB y ARs. **A.** Las cepas fueron crecidas en medio líquido PY 2% de sacarosa, por 48 horas de incubación a 30°C y posteriormente se extrajo y cuantificó el PHB. **B.** Análisis cualitativo de producción de AR, Las cepas fueron crecidas en filtros estériles sobre la superficie de medio sólido BB por 72 horas a 30°C. Las células se tiñeron con el colorante *fast blue B*, una coloración marrón fuerte indica un fenotipo positivo de síntesis de ARs. (1) UW136, cepa silvestre (2), mutante en *ptsP* (3), mutante en *rppH* (4), mutante en *rppH* complementada con gen silvestre de *rppH* de *A. vinelandii*, *rppH+*, (5) doble mutante *rppH-rsmA*. *** denotan valor P < 0.0001 y ** denotan valor P < 0.001.

Trabajos previos demostraron que a diferencia de RppH y EI^{Ntr}, la proteína codificada en *Avin48220* no está involucrada en el control de la síntesis de PHB, ya que un plásmido que lleva una copia silvestre del gen *ptsP* restauró la síntesis de PHB en una cepa con una mutación polar de *ptsP* (que afecta la transcripción de *Avin48220*) Sin embargo, es necesario realizar más estudios, con el objetivo de determinar si está relacionado con la actividad de los dos genes adicionales que conforman el operón (Segura and Espín, 1998).

RppH es necesaria para la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional

El operón *phbBAC* codifica las enzimas necesarias para la síntesis de PHB y es activado directamente por el regulador PhbR (Peralta-Gil et al., 2002; Hernandez-Eligio et al., 2011). Con el objetivo de determinar si la expresión de *phbR* está afectada en la mutante *UWrppH*, se usaron fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbR* con el gen *gusA*. La actividad de β -glucuronidasa se determinó en las cepas AHW13 y RppH*phbR*-T, derivadas de UW136 y UWrppH respectivamente, las cuales llevan la fusión transcripcional *phbR-gusA* (Figura 15A). Ambas cepas mostraron una actividad similar, lo que indica que la mutación en *rppH* no afecta la transcripción de *phbR*. Por el contrario, en la cepa RppH*phbR*-T, derivada de UWrppH con la fusión traduccional *phbR'-gusA* (Figura 15B), la

actividad de β -glucuronidasa se redujo alrededor del 70% comparada con la actividad presentada en la cepa silvestre UW*phbR*-PT (Figura 15B).

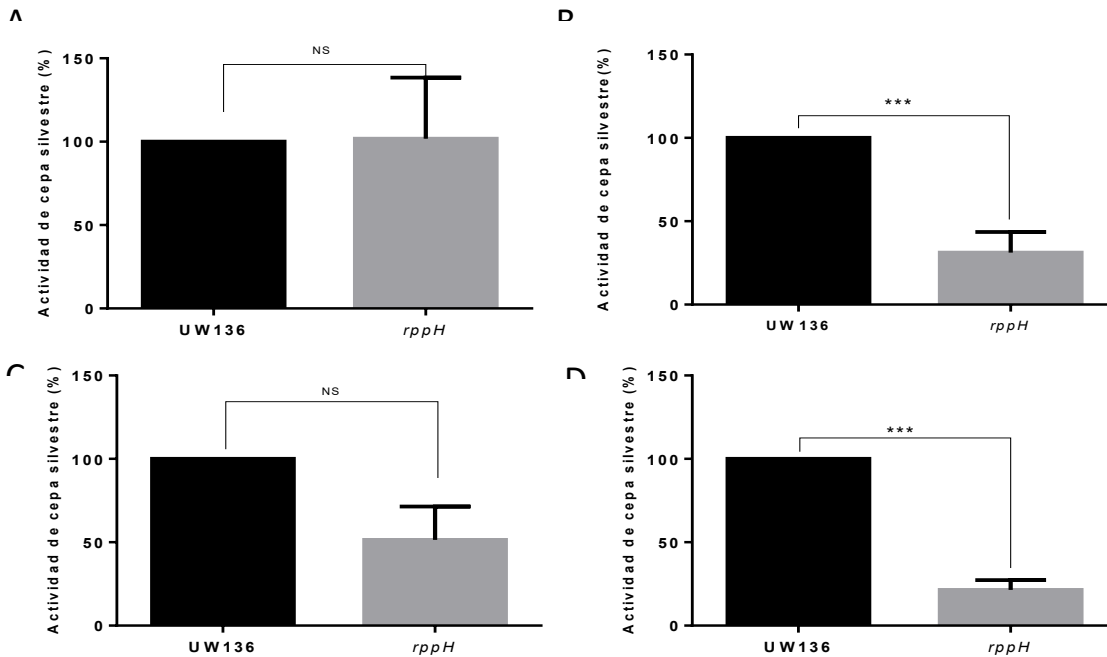


Figura 15. La actividad de β -glucuronidasa de las cepas derivadas de la cepa silvestre UW136 y de la mutante *rppH* con las fusiones transcripcionales y traduccionales de los genes *phbR* y *phbB*. **A.** Fusión transcripcional *phbR-gusA*. **B.** Fusión traduccional *phbR-gusA*. **C.** Fusión transcripcional *phbB-gusA*. **D.** Fusión traduccional *phbB-gusA*. El valor de la actividad de β -glucuronidasa fue reportado como porcentaje de la actividad en la cepa silvestre y fueron determinadas después de 48 horas de crecimiento en medio líquido BS. No significativo (NS, con valor $P > 0.05$), *** denotan valor $P < 0.0001$.

Adicionalmente, se determinó una disminución en la actividad de β -glucuronidasa en la cepa UW*rppH* que llevan la fusión transcripcional y traduccional de *phbB*, el primer gen del operón biosintético, (Figuras 15C y 15D). Este resultado era esperado, debido a que la traducción de PhbR se encuentra reducida en la mutante *rppH*, lo que afecta la transcripción de *phbB*. Por lo tanto, en la mutante *rppH*, la

reducción en la producción de PHB es debida a la reducción de la traducción de *phbR* y como consecuencia en la transcripción del operón biosintético *phbBAC*.

Estos resultados y el hecho de que EcRppH remueve los pirofosfatos del 5'-terminal de algunos RNAm, promoviendo su degradación por la RNAsa E, nos llevaron a plantear la hipótesis de que AvRppH participa en la degradación de un transcrito que codifica un regulador negativo de la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.

La inactivación del gen *rsmA* restaura la síntesis de PHB y AR en la mutante *rppH*

Previamente, se reportó que la proteína RsmA interacciona con la región líder de los transcritos de *phbR* y *phbB*, bloqueando el sitio de unión a ribosomas y por lo tanto su traducción (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta la hipótesis mencionada anteriormente y que RsmA es un regulador negativo a nivel postranscripcional, se construyó una doble mutante *rppH:rsmA*, con el objetivo de discernir si la represión en la traducción de *phbR* y el fenotipo de disminución en la producción de PHB observado en la mutante *rppH* es causada por esta proteína. Los niveles de PHB y AR en la doble mutante fueron similares a los de la cepa silvestre UW136 (Figura 14AB), lo que nos lleva a pensar que el fenotipo negativo

de producción de PHB y AR observado en la UW*rppH*, es causado en parte, por el aumento en la proteína RsmA.

Una mutación en *rppH* afecta la expresión de *rsmA*

Teniendo en cuenta que RppH contribuye en la degradación de algunos transcritos, y que uno de sus posibles blancos en *A. vinelandii* es *rsmA*, los niveles relativos de este transcrito fueron determinados por qRT-PCR en las cepas UW136 y UW*rppH*. Durante la fase estacionaria de crecimiento, la expresión de *rsmA* fue similar entre las dos cepas (24 y 30 horas), sin embargo, durante la fase exponencial (18 horas) se observó un incremento del 60% en la mutante UW*rppH* con respecto a la cepa silvestre UW136 (Figura 16A). Adicionalmente, se determinó por qRT-PCR, el efecto de la mutación de *rppH* en la estabilidad del transcrito de *rsmA*. Después de detener la transcripción por adición de rifampicina, el transcrito de *rsmA* aumentó su vida media en la mutante *rppH* comparada con la cepa silvestre (Figura 16B). Estos resultados sugieren que *rsmA* podría ser un sustrato de RppH (Figuras 16AB).

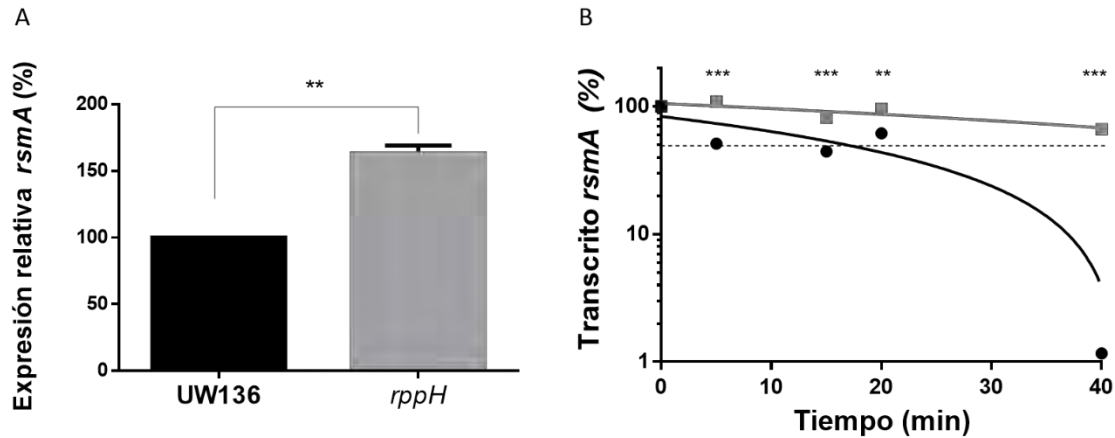


Figura 16. La expresión de *rsmA* incrementa y su transcrito es más estable en la mutante *rppH*. **A.** Análisis del transcrito de *rsmA* en las cepas UW136 y mutante *rppH* crecidas por 18 horas en medio líquido BS. El transcrito del gen RNA ribosomal 16S fue usado como control interno para normalizar los resultados. **B.** Análisis de la estabilidad de *rsmA* en la cepa silvestre *A. vinelandii* OP (círculos negros) y en la mutante *rppH* (cuadros grises). Los valores fueron determinados por qRT-PCR, a diferentes tiempos, después de detener la transcripción, por adición de rifampicina. Las cepas fueron crecidas en medio líquido BS por 18 horas (final de la fase exponencial), *gyrA* fue usado como control interno para normalizar los resultados. Este es un experimento representativo. ** indica valor $P < 0.001$, *** indican valor $P < 0.0001$

Con el objetivo de determinar si RppH afecta la transcripción y/o la traducción de *rsmA*, se usaron fusiones transcripcionales y traduccionales con *gusA* en UW136 y UW*rppH*. La actividad de la fusión transcripcional *rsmA-gusA* de las cepas fue similar (figura 17A). En contraste, y como muestra la figura 17B la actividad β -glucuronidasa de la fusión traduccional *rsmA'-gusA* es mucho más alta en la UW*rppH* que en la cepa silvestre. Este resultado indica que en ausencia de la actividad de RppH, la expresión de *rsmA* a nivel traduccional está aumentada y apoya la hipótesis de que el efecto negativo de la mutación de *rppH* sobre la síntesis de PHB y AR es causado por el exceso de RsmA.

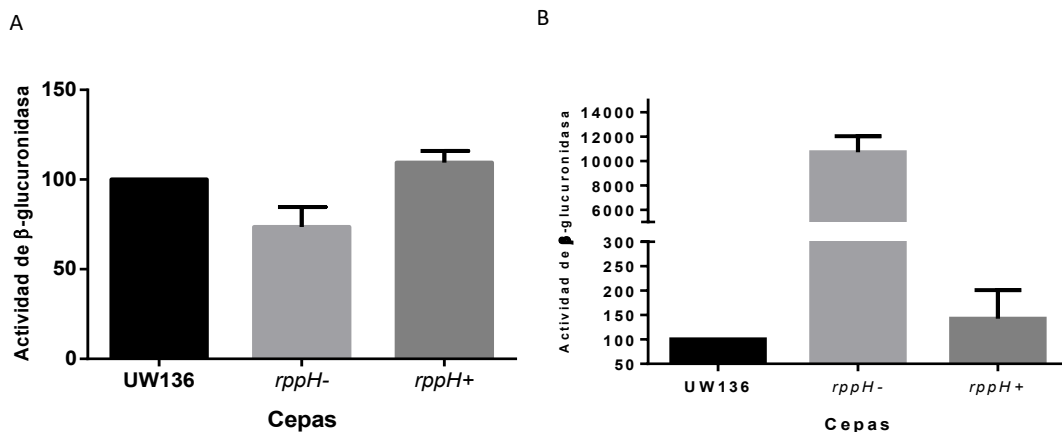


Figura 17 La mutación en *rppH* afecta expresión de *rsmA* a nivel postranscripcional. A. Actividad de β -glucuronidasa de la fusión transcripcional de *rsmA-gusA* determinada a las 18 horas de crecimiento en medio líquido BS en la cepa silvestre UW136 (barra negra), la mutante *rppH* (barra gris) y la mutante complementada con *rppH* silvestre (barra gris oscuro). **B.** Actividad de β -glucuronidasa de la fusión transcripcional de *rsmA-gusA* determinada a las 18 horas de crecimiento en medio líquido BS en la cepa silvestre UW136 (barra negra), la mutante *rppH* (barra gris) y la mutante complementada con *rppH* silvestre (barra gris oscuro). Los valores actividades fueron reportados como porcentaje (%) con respecto a cepa silvestre. ** denota valor $P < 0.001$, *** denota valor $P < 0.0001$.

La mutación en *rppH* aumenta la expresión de *csrA* en *E. coli*

Debido a que RppH de AvRppH comparte una identidad de secuencias de 64% con RppH de EcRppH y tiene 98% de cobertura con la estructura de la proteína 3D (figura 11), determinamos si al igual que en *A. vinelandii*, RppH afecta la expresión de *csrA* (homólogo de *rsmA*) en *E. coli* K12. Los niveles del transcrito de *csrA* fueron evaluados en la cepa *E. coli* K12 y su derivada mutante en *rppH* (*EcrppH*) a través de qRT-PCR. Se observó que los niveles de *csrA* aumentaron dos veces en la mutante *EcrppH* con respecto a la cepa silvestre (Figura 18A).

Adicionalmente, se analizó la estabilidad del transcrito de *csrA* en la cepa silvestre y su derivada mutante *rppH* en *E. coli* K12. Como lo muestra la figura 18B, en la

cepa mutante *EcrppH* la vida media de *csrA*, después de detener la transcripción por adición de rifampicina, fue mayor que en la cepa silvestre. Estos resultados indican que en *E. coli* K12, al igual que en *A. vinelandii*, RppH controla los niveles y la estabilidad del transcrito de *csrA* y sugiere que este es blanco de degradación por RppH (Figura 18AB).

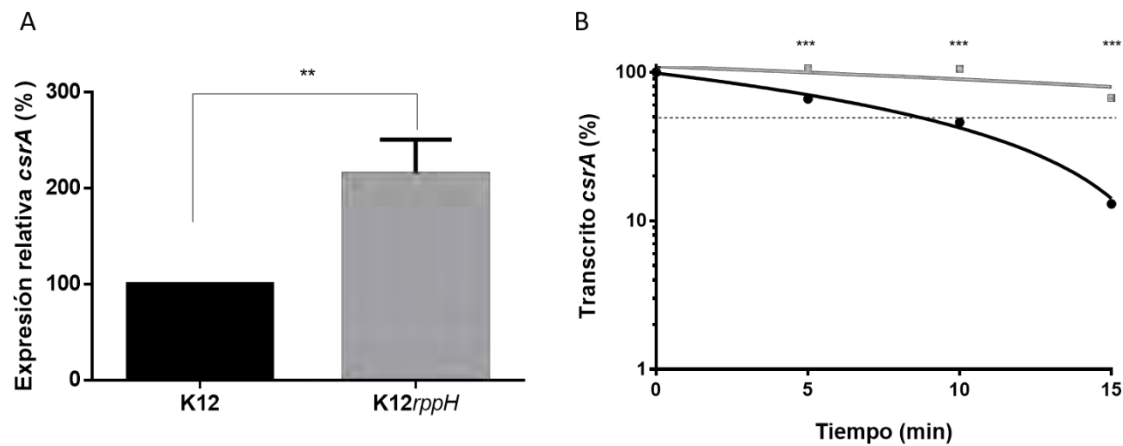


Figura 18. Los niveles del transcrito de *csrA* y su estabilidad aumentan en la mutante *EcrppH*. **A.** Análisis por qRT-PCR del transcrito de *csrA* en la cepa silvestre *E. coli* K12 y su derivada mutante *rppH*. Las cepas fueron crecidas por 4 horas en medio líquido LB. **B.** Análisis de estabilidad de *csrA* en la cepa silvestre *E. coli* K12 (círculos negros) y la mutante *EcrppH* (cuadros grises). La estabilidad fue determinada por qRT-PCR después de detener la transcripción al adicionar rifampicina. En ambos experimentos, el gen *rrsB* fue usado como control constitutivo. ** denota valor $P < 0.001$, *** denota valor $P < 0.0001$

La mutante *EcrppH* tiene un fenotipo de hipermotilidad que es suprimido por la mutación en *csrA*

En *E. coli*, una mutación en *csrA* produce defectos en el fenotipo de motilidad (Wei et al., 2001) debido a la ausencia en la expresión del operón *flhDC*, el principal regulador de la síntesis de flagelina, ya que CsrA se une a la región líder de este operón y lo protege de los cortes mediados por la RNAsa E (Yakhnin et al., 2013). Como se muestra en las figuras 19AB, la mutante *EcrppH* tiene un fenotipo de hipermotilidad. Adicionalmente, se analizaron los niveles del transcrito de *flhD* por qRT-PCR y estas fueron cinco veces más altos en la mutante *EcrppH* que en la cepa silvestre *E. coli* K12 (Figura 19C). Este resultado sugiere que *flhD* es sustrato de la vía RppH-RNAsaE.

Al igual que la disminución en la producción de PHB en la mutante *rppH* en *A. vinelandii*, el fenotipo de hipermotilidad en la mutante *rppH* en *E. coli* fue suprimido por la mutación en *csrA* (doble mutante *EcrppH-csrA*) (Figura 19AB). Adicionalmente, los niveles del transcrito de *flhD* en la doble mutante *EcrppH-csrA* fueron similares a los niveles en la cepa silvestre. Entonces, la ausencia de motilidad en la doble mutante *EcrppH-csrA*, aunque tiene niveles de *flhD* similares a los de la cepa silvestre, coincide con el papel de CsrA como regulador positivo de la traducción de *flhD* y protector de la degradación a través de RppH-RNAsaE. Como se reportó previamente, nosotros encontramos que los niveles del transcrito de *flhD* disminuyen en la mutante *csrA* (Figura 19C) (Yakhnin et al., 2013).

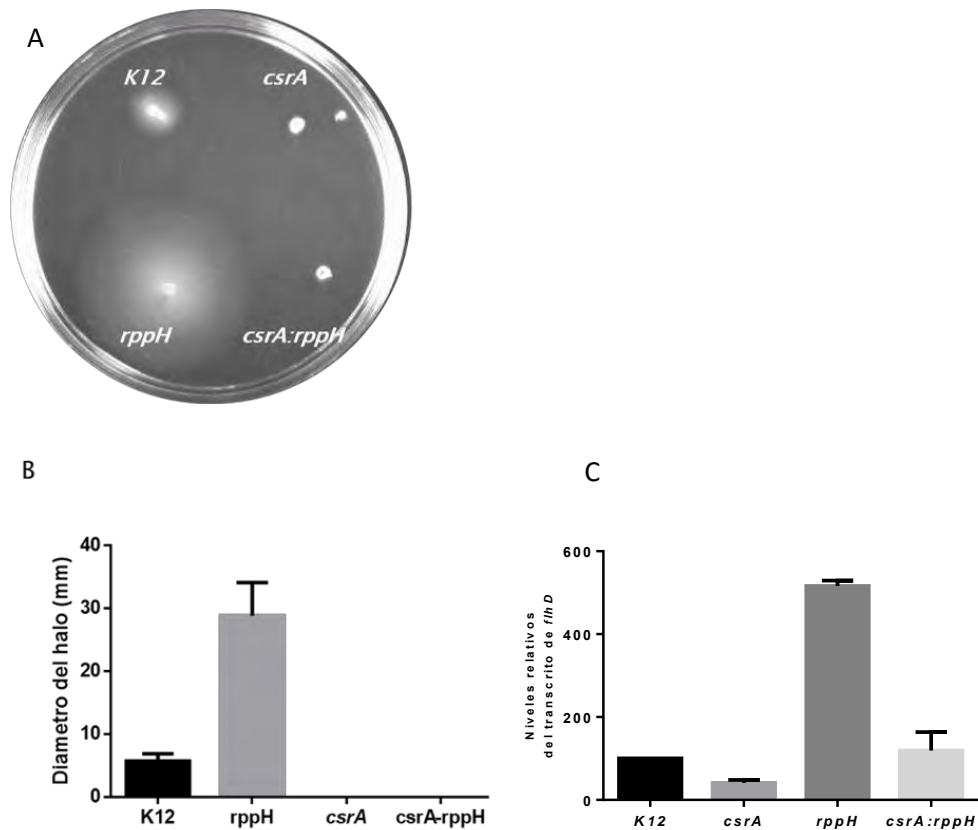


Figura 19. Efecto de la mutación en *rppH* sobre el fenotipo de motilidad en *E. coli* K12. A. Análisis de motilidad en la cepa silvestre *E. coli* K12 y sus derivadas mutantes *csrA*, *rppH* y *csrA-rppH*. **B.** El diámetro del halo fue medido 6 horas después de la inoculación en agar triptona semisólido (0.35% de agar). **C.** Análisis por qRT-PCR del transcrito de *flhD* en la cepa silvestre *E. coli* K12 y sus derivadas mutantes *csrA*, *rppH* y *csrA-rppH* después de 4 horas de crecimiento en LB líquido. El gen *rrsB* fue usado como control constitutivo.

Complementación de *EcrppH* con *AvrppH*

Con el objetivo de demostrar la actividad *in vivo* de AvRppH, se complementó la mutante *rppH* de *E. coli* con AvrppH. Se construyó el plásmido pLB-AvrppH, que contiene el gen silvestre de *rppH* de *A. vinelandii* que se transcribe a partir de un promotor inducible por IPTG y fue usado para transformar las cepas *E. coli* K12 y *EcrppH*. La cepa complementada K12rppH-pAvrppH mostró un fenotipo de

motilidad similar al de la cepa silvestre *E. coli* K12, mientras que la complementación con el plásmido vacío EcrppH-pET22 no afectó el fenotipo de hipermotilidad de la mutante EcrppH, lo que indica que AvRppH es funcional en *E. coli* (Figura 19). La sobreexpresión de AvRppH en el fondo de la cepa *E. coli* K12 silvestre genera un fenotipo negativo de motilidad similar al de su derivada mutante en *csrA*. Esos resultados proveen evidencia que indica que AvRppH es, en efecto, una proteína con actividad de pirofosfohidrolasa, igual que la EcRppH (Figura 20).

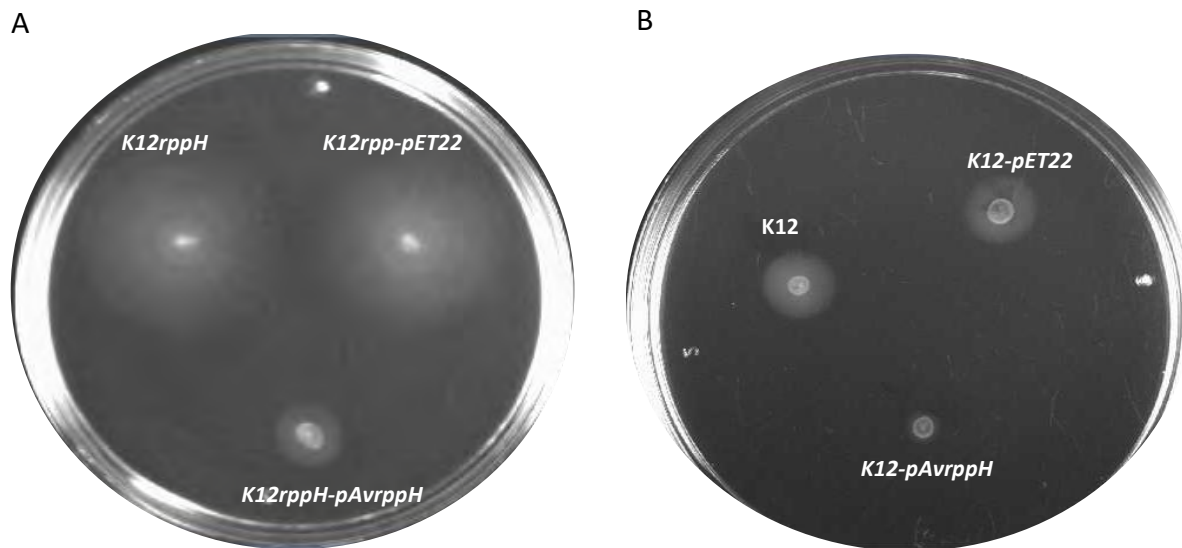


Figura 20. AvRppH restaura a niveles silvestres el fenotipo de motilidad en la mutante EcrppH. El ensayo de motilidad fue realizado en agar triptona semisólido (0.35% de agar) con 0.1 mM de IPTG en las cepas K12rppH (36 mm) K12rppH-pET22 (33 mm) K12rppH-pAvrppH (10 mm). K12 (10 mm) K12-pET22 (10mm) K12-pAvrppH (0 mm). El diámetro del halo se indica en paréntesis.

Otros blancos de RppH involucrados en la biosíntesis de PHB y AR en *A. vinelandii*

RppH es una enzima pleiotrópica, debido al hallazgo de su actividad de pirofosfohidrolasa de RNAm en *E. coli*, donde por medio de un análisis transcriptómico, Fulanito et al, reportaron que 382 RNAm aumentaron su expresión en la mutante *rppH*. También se ha estudiado en otros géneros bacterianos, como *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Helicobacter* en donde se han descrito varios blancos (Kujawa et al., 2017).

En *A. vinelandii*, encontramos que RppH tiene un efecto postranscripcional sobre *rsmA*, sin embargo, debido a la actividad enzimática que desarrolla, proponemos que otros transcritos también pueden ser blanco de esta enzima.

Como se mencionó anteriormente la proteína EIIA^{Ntr}, del sistema de fosfotransferasas, también está involucrada en la regulación de la síntesis de PHB y ARs. Adicionalmente, además de su papel regulatorio de la expresión de *phbBAC* y *arsABCD* a nivel transcripcional (a través de RpoS). También se conoce un efecto a nivel postranscripcional (Muriel-Millán et al., 2017). Es por esto que se construyó una mutante de *ptsN*, gen que codifica para la proteína EIIA^{Ntr} sobre el fondo de la mutante *rppH*. En este fondo genético se encontró que la disminución en el fenotipo de producción de PHB y ARs en la mutante *rppH*, fue restaurada casi a niveles silvestres cuando se muta *ptsN* (Figura 21).

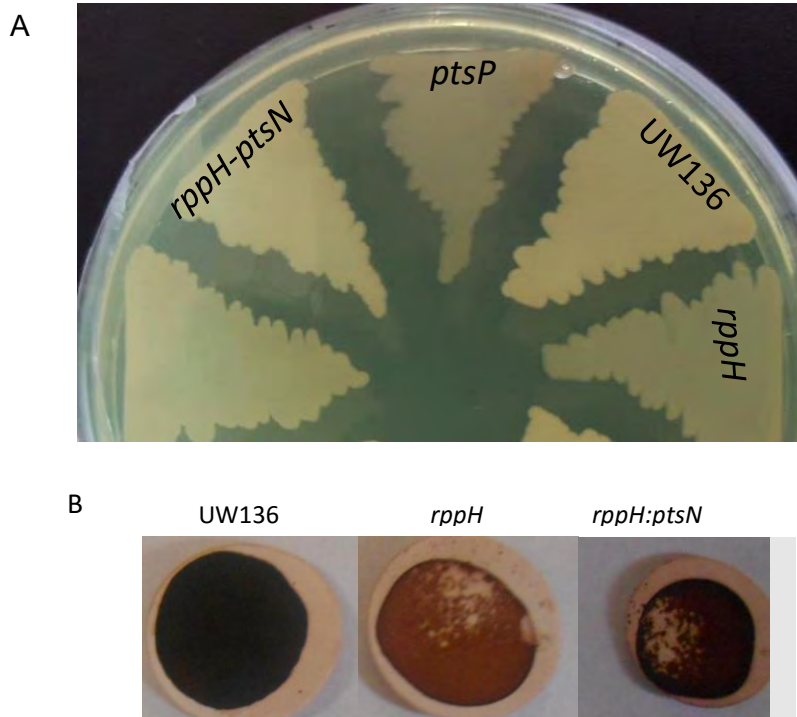


Figura 21. Fenotipo de producción de PHB y AR en la cepa doble mutante *rppH-ptsN*. Una mutación en *ptsN*, gen que codifica para la proteína EIIA^{Ntr} del sistema PTSN^{tr} en el fondo de una cepa de *A. vinelandii* mutada en *rppH*, restaura el fenotipo de producción de PHB y ARs. **A.** Las cepas fueron crecidas en agar PY 2% de sacarosa durante 48 horas a 30°C. Las cepas productoras de PHB se observan blancas y opacas (UW136 y *rppH-ptsN*), las que disminuyen su producción se observan translúcidas y más brillantes (*ptsP* y *rppH*) **B.** Análisis cualitativo de producción de AR, Las cepas fueron crecidas en filtros estériles sobre la superficie de medio sólido BB por 72 horas a 30°C. Las células se tiñeron con el colorante *fast blue B*, una coloración marrón fuerte indica un fenotipo positivo de síntesis de ARs.

DISCUSIÓN

La degradación de los RNAm juega un papel central en la regulación de la expresión de genes. En bacterias, las enzimas RNAsa E y J son las principales ribonucleasas involucradas en su degradación. La RppH pirofosfohidrolasa convierte el 5'-terminal tri/difosfato de algunos RNAm a 5'-terminal monofosfato, permitiendo la degradación por las RNAsas (Hui *et al.*, 2014).

En este estudio se demostró que en *A. vinelandii*, la inactivación de *rppH* reduce la traducción del transcrito de *phbR*. La regulación de este transcrito se realiza en parte por la proteína RsmA, la cual bloquea el sitio de unión al ribosoma y reduce su traducción, como consecuencia, reduce la transcripción del operón biosintético de PHB, *phbBAC* (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012). Por lo tanto, la inactivación de *rppH* en *A. vinelandii* reduce la traducción de *phbR* por incremento en la expresión de su represor traduccional RsmA.

Una importante evidencia del papel de RppH sobre la expresión de RsmA es el hecho de que la inactivación de *rsmA* en la mutante *rppH*, restauró el fenotipo de producción de PHB a niveles silvestres (Figura 13A). Adicionalmente, la expresión y estabilidad de *rsmA* fueron mayores en la mutante *rppH*. Estos resultados sugieren que RppH participa en la regulación de la expresión de *rsmA*, probablemente por conversión de su transcrito de 5'-terminal tri/difosfato a 5'-terminal monofosfato, lo que reduce la expresión de *rsmA* y a su vez favorece la traducción de *phbR*.

Recientemente, se demostró que en una mutante *ptsP* en *A. vinelandii* la transcripción de *phbR* está reducida porque la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada (presente en una mutante *ptsP*) induce la proteólisis del factor sigma de fase estacionaria RpoS, a través de ClpAP (Muriel-Millán et al., 2017). Este factor sigma es necesario para la activación de la transcripción de *phbR* y *phbBAC* (Peralta-Gil et al., 2002; Hernandez-Eligio et al., 2012).

En muchas proteobacterias el gen *rppH* está localizado corriente arriba de *ptsP*. En *A. vinelandii* y *E. coli* (y probablemente en muchas otras bacterias) ambos genes se transcriben en un operón, lo que sugiere que podrían estar involucrados en las mismas rutas metabólicas (Lee et al., 2014). El papel fisiológico de RppH y EI^{Ntr} ha sido estudiado independientemente en *E. coli* (Celesnik et al., 2007; Lee et al., 2013). Sin embargo, no hay evidencia de una relación funcional entre estas dos proteínas. Por trabajos previos (Noguez et al., 2008; Muriel-Millán et al., 2015), aunado a lo que encontramos en este estudio, ahora sabemos que en *A. vinelandii* las proteínas EI^{Ntr} y RppH, están involucrados en la regulación de la síntesis de PHB a través de la regulación de la expresión de *phbR* a nivel transcripcional y traduccional respectivamente.

Ya que los genes *rppH* y *ptsP* conforman un operón, las proteínas que son codificadas en ellos, son expresadas de forma paralela. Por un lado, la presencia de RppH contribuye en la degradación del transcrito de *rsmA* y por otro, la enzima EI^{Ntr} transfiere el fosfato a la enzima EIIA^{Ntr}. Esta forma fosforilada de EIIA^{Ntr} es incapaz de llevar a degradación a la proteína RpoS. En este sentido, la expresión

de *rppH* y *ptsP* permite que se realice la síntesis tanto de PHB como de ARs en *A. vinelandii*.

Este trabajo proporciona evidencia de que, al igual que en *A. vinelandii*, en *E. coli* K12, la proteína RppH está involucrada en la regulación de la expresión de CsrA, ya que en una mutante *EcrppH*, la vida media y los niveles del transcrito de *csrA* incrementan. Los datos que soportan esta hipótesis fueron obtenidos en análisis de microarreglos realizados en una mutante RppHE53A, en donde 382 transcritos, incluyendo *csrA*, se aumentaron significativamente con respecto a la cepa silvestre (Deana et al., 2008). Adicionalmente, experimentos de RNAseq en *Helicobacter pylori*, sugieren que el transcrito para hpy-HP1441, que forma parte del operón donde se incluye *csrA*, fue reportado como un blanco de RppH (Bischler et al., 2017).

Aunque CsrA reprime la traducción de varios genes, se sabe que esta proteína activa la expresión del operón *flhDC*, por su unión a dos sitios de la región líder. Esos dos sitios son necesarios para la activación de *flhDC* dependiente de CsrA y protegen al transcrito de la degradación mediada por la RNAsaE (Yakhnin et al., 2013).

En este trabajo también se demostró que la cepa *EcrppH* tiene un fenotipo de hipermotilidad y, similar a lo que ocurre en la mutante *csrA*, una doble mutante *rppH-csrA* presenta un fenotipo negativo de motilidad (figura 18AB). Adicionalmente, los niveles del transcrito de *flhD* aumentaron 5 veces en la mutante en *EcrppH*. Por lo

tanto, proponemos que en esta mutante, el fenotipo de hipermotilidad es el resultado de un incremento en los niveles de la proteína CsrA, la cual se une al transcrito de *flhDC*, permitiendo su traducción y previniendo la degradación por la RNasa E (Yakhnin et al., 2013).

Interesantemente, la complementación heteróloga de la cepa *EcrppH* con AvRppH restauró el fenotipo de motilidad a niveles silvestres, lo que sugiere que AvRppH tiene actividad de RNA pirofosfohidrolasa (Figura 19).

Los mecanismos de regulación de la expresión de *csrA* se han estudiado muy bien en *E. coli*. Su transcripción está dirigida por cinco promotores (P); dos dependientes de sigma 70 (P2 y P5), dos dependientes de RpoS (P1 y P3) y un quinto promotor dependiente de CsrA (P4). CsrA activa su propia transcripción de una forma indirecta y controla negativamente la traducción por unión directa a su transcrito (Yakhnin et al., 2011). En este estudio se revela que en la regulación de la expresión de CsrA también está involucrada la proteína RppH, probablemente, por participación en la degradación de su transcrito.

En *A. vinelandii* los mecanismos que controlan la expresión de RsmA están menos estudiados. Sin embargo, un estudio reciente muestra que la transcripción de *rsmA* inicia a partir de un promotor dependiente de RpoS, pero los niveles del transcrito fueron reducidos solo en un 40% en una mutante *rpoS*, sugiriendo la existencia de al menos un promotor adicional (Quiroz-Rocha et al., 2017).

Se desconoce si RsmA regula su propia expresión en *A. vinelandii*, no obstante, a través de un análisis *in silico* se observó la presencia de un sitio putativo de la secuencia reconocida por RsmA en su propio transcrito (Cocotl M., datos no publicados), lo que podría sugerir un mecanismo de autorregulación a nivel traduccional, similar al que se observa en *E. coli* y *Pseudomonas* (Yakhnin et al., 2011; Jean-Pierre et al., 2015). Este estudio contribuye al conocimiento en la regulación de la expresión de RsmA en *A. vinelandii*, ya que demuestra que RppH está involucrada en la vía de degradación de este transcrito. Sin embargo, la hipótesis de que RppH participe en la degradación de un RNAm que actúe como activador de la traducción de *rsmA* no puede excluirse.

Modelo de regulación propuesto para el control de la expresión de RsmA/CsrA por RppH en *A. vinelandii* y *E. coli*.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un modelo para la regulación de la expresión de RsmA/CsrA. En *A. vinelandii*, el transcrito de *rsmA* podría ser sustrato de la pirofosfohidrolasa RppH para la vía de degradación de RNAm dependiente del 5'-terminal, debido a que la ausencia de la actividad de RppH resulta en un incremento de los niveles de la proteína RsmA, que reprime la traducción de sus RNA blanco, incluyendo *phbR* y *arpR* y en efecto, reduce la síntesis de PHB y AR. En *E. coli*, RppH junto con la RNAsa E participan en la degradación de *csrA*. La ausencia de la actividad de RppH, aumenta el transcrito y

estabilidad de *csrA*, y por consiguiente la concentración de la proteína CsrA, que se une al transcrito de *flhDC*, previniendo su degradación por la vía RppH-RNasaE (Figura 22).

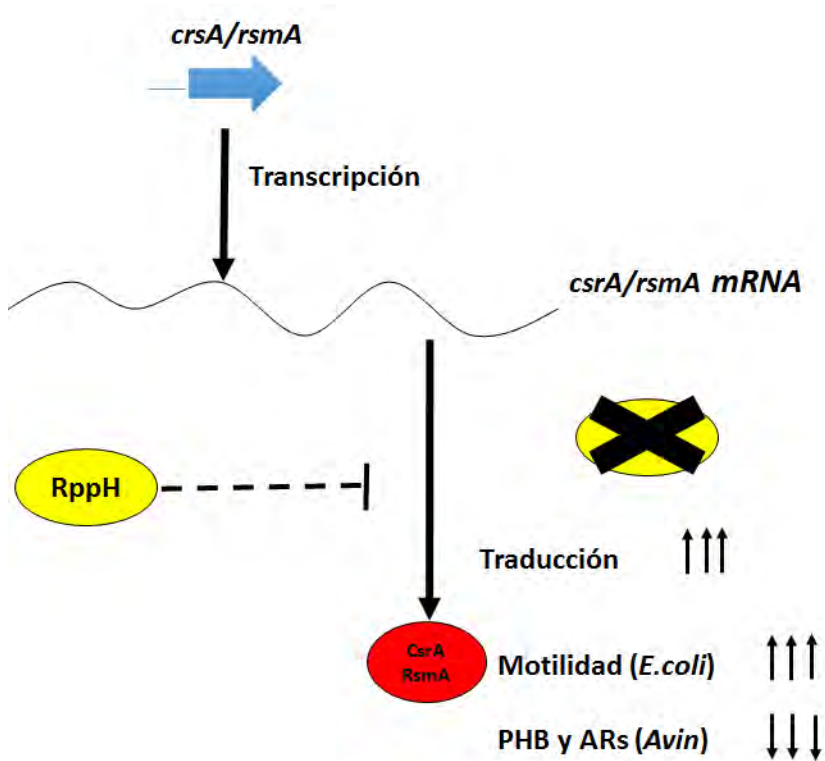


Figura 22. Modelo de regulación para el control de la expresión de RsmA/CsrA por RppH en *A. vinelandii* y *E. coli*. El 5'-terminal di/trifosfato de los transcritos de *rsmA* y *csrA* son probablemente convertidos a 5' monofosfato por RppH y llevados a degradación por la RNasa E. En ausencia de RppH, los transcritos de *rsmA* y *csrA* no son degradados, incrementan su concentración de proteína y consecuentemente produce un fenotipo de hipermotilidad en *E. coli* y una represión en la síntesis de PHB y AR en *A. vinelandii*.

CONCLUSIONES

- Los genes *rppH* y *ptsP* en *A. vinelandii*, se transcriben en un operón y las proteínas que codifican, están involucradas en la regulación de *phbR* a nivel postranscripcional y transcripcional respectivamente.
- La proteína RppH contribuye en la regulación de la motilidad en *E. coli* y de la síntesis de PHB y AR en *A. vinelandii* a través de la degradación del transcrito de *csrA/rsmA*.
- La proteína RppH realiza la misma actividad tanto en *A. vinelandii* como en *E. coli*. Esto se comprobó por medio de una complementación heteróloga, en donde AvRppH, complementa la actividad de EcRppH en *E. coli*.

PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis del estado de fosforilación del final 5' de los transcritos *rsmA/csrA* por medio del ensayo de PABLO –*phosphorylation assay by ligation of oligonucleotides*- con el objetivo de determinar si estos transcritos son blanco de RppH.
- Realizar un análisis transcriptómico de la mutante *rppH* en *A. vinelandii* para identificar otros transcritos que cambien su nivel de expresión en esta mutante y relacionarlos con la síntesis de PHB y AR.

- Estudiar las otras Nudix hidrolasas en *A. vinelandii* para determinar si actúan igual que RppH.
- Analizar la expresión de RppH a lo largo de la curva de crecimiento en *A. vinelandii* y demostrar si existe un cambio que pueda influir en la producción de PHB y AR.

REFERENCIAS

Ait-Bara S, Carpousis AJ, Quentin Y. RNase E in the γ -Proteobacteria: conservation of intrinsically disordered noncatalytic region and molecular evolution of microdomains. *Molecular Genetics and Genomics* 2015;290(3):847-862.

Babitzke P, Romeo T. CsrB sRNA family: Sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current Opinion in Microbiology* 2007;10(2):156-163.

Bernstein JA, Khodursky AB, Lin P-H, Lin-Chao S, Cohen SN. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99(15):9697-9702.

Bischler T, Hsieh P-k, Resch M, Liu Q, Tan HS, Foley PL, Hartleib A, Sharma CM, Belasco JG. Identification of the RNA pyrophosphohydrolase RppH of *Helicobacter pylori* and global analysis of its RNA targets. *Journal of Biological Chemistry* 2017;292(5):1934-1950.

Bush JA, Wilson PW. A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 1959;184(4683):381-381.

Camacho MI, Alvarez AF, Gonzalez Chavez R, Romeo T, Merino E, Georgellis D. Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system. *Journal of Bacteriology* 2015;197(5):983-991.

Celesnik H, Deana A, Belasco JG. Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5'-pyrophosphate removal. *Molecular Cell* 2007;27(1):79-90.

Cocotl-Yañez M, Moreno S, Encarnación S, López-Pliego L, Castañeda M, Espín G. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 2014;160(3):479-487.

Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(12):6640-6645.

Deana A, Celesnik H, Belasco JG. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5'-pyrophosphate removal. *Nature* 2008;451(7176):355-358.

Fellay R, Frey J, Krisch H. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 1987;52(2-3):147-154.

Fitzgerald DM, Bonocora RP, Wade JT. Correction: Comprehensive Mapping of the *Escherichia coli* Flagellar Regulatory Network. *PLOS Genetics* 2015;11(9):e1005456.

Foley PL, Hsieh P-k, Luciano DJ, Belasco JG. Specificity and Evolutionary Conservation of the *Escherichia coli* RNA pyrophosphohydrolase RppH. *Journal of Biological Chemistry* 2015.

Hernandez-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espín G. Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiology* 2011;157(11):3014-3023.

Hernandez-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millan LF, Espín G. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 2012;158(Pt 8):1953-1963.

Hockett KL, Ionescu M, Lindow SE. Involvement of rppH in Thermoregulation in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology* 2014;196(12):2313-2322.

Hsieh P-k, Richards J, Liu Q, Belasco JG. Specificity of RppH-dependent RNA degradation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110(22):8864-8869.

Hui MP, Foley PL, Belasco JG. Messenger RNA Degradation in Bacterial Cells. *Annual Review of Genetics* 2014;48(1):537-559.

Jean-Pierre F, Perreault J, Déziel E. Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2015;161(9):1889-1896.

Katoh K, Misawa K, Kuma K-i, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 2002;30(14):3059-3066.

Kennedy C, Gamal R, Humphrey R, Ramos J, Brigle K, Dean D. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Molecular and General Genetics MGG* 1986;205(2):318-325.

Kujawa M, Lirski M, Ziecina M, Drabinska J, Modzelan M, Kraszewska E. Nudix-type RNA pyrophosphohydrolase provides homeostasis of virulence factor pyocyanin and functions as a global regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 2017;106(3):381-394.

Lee C-R, Kim M, Park Y-H, Kim Y-R, Seok Y-J. RppH-dependent pyrophosphohydrolysis of mRNAs is regulated by direct interaction with DapF in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 2014;42(20):12746-12757.

Lee C-R, Park Y-H, Kim M, Kim Y-R, Park S, Peterkofsky A, Seok Y-J. Reciprocal regulation of the Autophosphorylation of Enzyme I(Ntr) by Glutamine and α -Ketoglutarate in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 2013;88(3):473-485.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193(1):265-275.

Luciano DJ, Vasilyev N, Richards J, Serganov A, Belasco JG. A Novel RNA Phosphorylation State Enables 5' end-dependent degradation in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 2017;67(1):44-54.e6.

Manzo J, Cocotl-Yañez M, Tzontecomani T, Martínez VM, Bustillos R, Velásquez C, Goiz Y, Solís Y, López L, Fuentes LE, Nuñez C, Segura D, Espín G, Castañeda M. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2011;21(3-4):147-159.

McLennan A. Substrate ambiguity among the nudix hydrolases: biologically significant, evolutionary remnant, or both? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013;70(3):373-385.

Miyayama A, Funa N, Awakawa T, Horinouchi S. Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid

synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(3):871-876. doi:10.1073/pnas.0709819105.

Mouncey NJ, Mitchenall LA, Pau RN. Mutational analysis of genes of the mod locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology 1995;177(18):5294-5302.

Muriel-Millán LF, Moreno S, Gallegos-Monterrosa R, Espín G. Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. Molecular Microbiology 2017;104(2):197-211.

Muriel-Millán LF, Moreno S, Romero Y, Bedoya-Pérez LP, Castañeda M, Segura D, Espín G. The unphosphorylated EIIA(Ntr) protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. PLoS ONE 2015;10(2):e0117184.

Noar JDBruno-Bárcena JM. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. Microbiology 2018;164(4):421-436.

Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernandez A, Juarez K, Espín G. 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 2008;15(4):244-254.

Núñez C, León R, Guzmán J, Espín G, Soberón-Chávez G. Role of *Azotobacter vinelandii* mucA and mucC Gene Products in Alginate Production. Journal of Bacteriology 2000;182(23):6550-6556.

Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín-González L, Espín G. Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly-β-Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. Journal of Bacteriology 2002;184(20):5672-5677.

Pflüger-Grau KGörke B. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. Trends in Microbiology 2010;18(5):205-214.

Potts AH, Vakulskas CA, Pannuri A, Yakhnin H, Babitzke P, Romeo T. Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics. Nature Communications 2017;8:1596.

Quiroz-Rocha E, Bonilla-Badía F, García-Aguilar V, López-Pliego L, Serrano-Román J, Cocotl-Yañez M, Guzmán J, Ahumada-Manuel CL, Muriel-Millán LF, Castañeda M, Espín G, Nuñez C. Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology 2017;163(7):1105-1115.

Richards J, Luciano DJ, Belasco JG. Influence of translation on RppH-dependent mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 2012;86(5):1063-1072.

Romero Y, Moreno S, Guzmán J, Espín G, Segura D. Sigma Factor RpoS Controls Alkylresorcinol Synthesis through ArpR, a LysR-Type Regulatory Protein, during Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 2013;195(8):1834-1844.

Romero Y, Guzmán J, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Vences-Guzmán MÁ, Castañeda M, Espín G, Segura D. The GacS/A-RsmA signal transduction pathway controls the synthesis of alkylresorcinol lipids that replace membrane phospholipids during encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE* 2016;11(4):e0153266.

Segura D, Espín G. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects Poly- β -Hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 1998;188(18):4790-4798.

Segura D, Guzmán J, Espín G. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003a;63(2):159-163.

Segura D, Cruz T, Espín G. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology* 2003b;179(6):437-443.

Slepecky RA, Law JH. Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 1961;82(1):37-42.

Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig A-K, Melefors Ö, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2002;184(18):5130-5140.

Takekawa N, Nishiyama M, Kaneseki T, Kanai T, Atomi H, Kojima S, Homma M. Sodium-driven energy conversion for flagellar rotation of the earliest divergent hyperthermophilic bacterium. *Scientific Reports* 2015;5:12711.

Vasilyev N, Serganov A. Structures of RNA Complexes with the *Escherichia coli* RNA pyrophosphohydrolase RppH Unveil the Basis for Specific 5'-end-dependent mRNA Decay. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290(15):9487-9499.

Wachter JHill SA. Small transcriptome analysis indicates that the enzyme RppH influences both the quality and quantity of sRNAs in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiology Letters* 2015;362(4):1-7.

Wei BL, Brun-Zinkernagel A-M, Simecka JW, Prüß BM, Babitzke P, Romeo T. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2001;40(1):245-256.

Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL, Jefferson RA. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 1995;141(7):1691-1705.

Yakhnin AV, Baker CS, Vakulskas CA, Yakhnin H, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Molecular microbiology* 2013;87(4):851-866.

Yakhnin H, Yakhnin AV, Baker CS, Sineva E, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by $E\sigma(70)$ and $E\sigma(S)$, and indirect transcriptional activation by CsrA. *Molecular microbiology* 2011;81(3):689-704.



The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of RsmA/CsrA expression in *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*

Leidy Patricia Bedoya-Pérez, Luis Felipe Muriel-Millán, Soledad Moreno, Elva Quiroz-Rocha, Nancy Rivera-Gómez, Guadalupe Espín*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

csrA
rsmA
 RppH
 5'-End-dependent RNA degradation
 PHB
 Motility

ABSTRACT

In bacteria, the 5'-end-dependent RNA degradation is triggered by the RNA pyrophosphohydrolase RppH converting tri/diphosphate to monophosphate transcripts. This study shows that in the soil bacterium *Azotobacter vinelandii*, inactivation of *rppH* gene negatively affected the production of bioplastic poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by reducing the expression at the translational level of PhbR, the specific transcriptional activator of the *phbBAC* biosynthetic operon. The effect of RppH on the translation of *phbR* seemed to be exerted through the translational repressor RsmA, as the inactivation of *rsmA* in the *rppH* mutant restored the *phbR* expression. Interestingly, in *Escherichia coli* inactivation of *rppH* also affected the expression of CsrA, the RsmA homolog. The level of the *csrA* transcript was higher and more stable in the *E. coli rppH* mutant than in the wild type strain. Additionally, and in contrast to the *csrA* mutants that are known to have a defective swimming phenotype, the *E. coli rppH* mutant showed a hyper-swimming phenotype that was suppressed by a *csrA* mutation, and the AvRppH restored to wild type level the swimming phenotype to the *E. coli rppH* mutant. We propose that in both *A. vinelandii* and *E. coli*, RppH activity plays a role in the expression of the translational regulator protein RsmA/CsrA.

1. Introduction

Azotobacter vinelandii is a soil nitrogen-fixing bacterium that synthesizes poly-β-hydroxybutyrate (PHB), a polymer of industrial importance to produce bioplastic (Galindo et al., 2007). This bacterium is able to undergo a differentiation process to form desiccation-resistant cysts and during the encystment, *A. vinelandii* synthesizes the phenolic lipids alkylresorcinols (AR) that replace the membrane phospholipids and are components of the cyst outer layer (Reusch and Sadoff, 1981). The *phbBAC* operon encodes the enzymes necessary for PHB synthesis (Segura et al., 2003b). The PhbR protein of the AraC/XylS family and the RpoS stationary phase sigma factor activate transcription of the *phbBAC* operon (Peralta-Gil et al., 2002; Hernandez-Eligio et al., 2011).

Additionally, in *A. vinelandii* the expression of PHB and AR related genes is controlled at the posttranscriptional level by the GacS/GacA-RsmA regulatory system (Hernandez-Eligio et al., 2012; Romero et al., 2016). This system is conserved in a variety of Gram-negative bacteria and in *Escherichia coli* (BarA/UvrY-CsrA) regulates the central carbon metabolism (Suzuki et al., 2002). The RsmA (CsrA) protein binds its messenger RNA (mRNA) targets to repress their translation, while the

response regulator GacA (UvrY) activates transcription of genes encoding small-RNAs (sRNAs) *RsmZ* and *RsmY*, (named CsrB, CsrC in *E. coli*) that interact with the RsmA (CsrA) protein to counteract its repressor activity. In *E. coli*, CsrA has also been shown to act as positive regulator of motility, as expression of the *flhDC* master regulator of flagella biosynthesis is under CsrA control. In this case, CsrA binds to the *flhDC* mRNA protecting it from RNase E-mediated cleavage (Wei et al., 2001; Yakhnin et al., 2013). In *A. vinelandii*, the RsmA protein binds to the *phbR* and *phbBAC* mRNAs acting as a translational repressor, while the *RsmZ/Y* sRNAs bind the RsmA protein counteracting its repressor activity (Hernandez-Eligio et al., 2012). The RsmA protein also binds the *arpR* mRNA that encodes the transcriptional activator of the AR biosynthetic operon *arsABCD* (Romero et al., 2013; Romero et al., 2016).

The Nitrogen-related Phosphotransferase System (PTS^{Ntr}) is another global regulatory system present in most Gram-negative bacteria and controls some essential processes such as potassium homeostasis; phosphate starvation response, virulence, nitrogen fixation and ABC transport activation (Pflüger-Grau and Görke, 2010; Lee et al., 2014). The EI^{Ntr}, Npr and EIIA^{Ntr} proteins are components of the PTS^{Ntr} and are

* Corresponding author at: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62251, Mexico.
 E-mail address: espin@ibt.unam.mx (G. Espín).

encoded by the *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* genes, respectively. These proteins participate in a phosphorylation cascade from phosphoenolpyruvate (PEP), where EIIA^{Ntr} appears to be the terminal phosphoryl acceptor. In *A. vinelandii*, the PTS^{Ntr} regulates the expression of genes related to the synthesis of PHB and AR. Inactivation of *ptsP* or *ptsO* results in the presence of the EIIA^{Ntr} in its unphosphorylated state and in a reduced transcription of the *phbR*, *phbB*, *arsA* and *arpR* genes (Noguez et al., 2008; Muriel-Millán et al., 2015; Trejo et al., 2017).

Recently, it was shown that the unphosphorylated EIIA^{Ntr} induces the ClpAP mediated degradation of the sigma factor RpoS, which is required for activation of the *phbR*, *phbB* and *arpR* transcription (Muriel-Millán et al., 2017; Peralta-Gil et al., 2002; Hernandez-Eligio et al., 2011; Romero et al., 2013). Also, a recent study has shown that in a *gacA* mutant the EIIA^{Ntr} is present only in its unphosphorylated state (Trejo et al., 2017). Thus, in *A. vinelandii* the GacA protein that controls the synthesis of PHB and AR by the mean of RsmA, also affects the phosphorylation of EIIA^{Ntr}.

In bacteria, regulation of stability and translation of mRNAs is one of the main regulatory mechanisms of gene expression. Characteristics of mRNAs as nucleotide sequence, structure (3'-terminal stem-loop), interactions with molecules (sRNAs and RNA-binding proteins) and 5'-terminal phosphorylation, influence the half-life time of mRNAs (Bernstein et al., 2002; Celesnik et al., 2007). RNase E is an essential endoribonuclease that can attack transcripts directly in 5'-end-independent pathway but has preference for RNA substrates with 5'-monophosphate. The rate-determining conversion of a triphosphate to a monophosphorylated 5' is a prior step in mRNA decay that triggers subsequent internal cleavage by the endonuclease RNase E (Celesnik et al., 2007; Bouvier and Carpousis, 2011). In *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Helicobacter pylori* and *Pseudomonas aeruginosa*, the pyrophosphohydrolase RppH enzyme, a member of multiple Nudix hydrolase family present in all domains of life, has been shown to convert 5'-terminal tri/diphosphate to a monophosphate for the control of mRNA decay (Hsieh et al., 2013; Bischler et al., 2017; Kujawa et al., 2017). Additionally RppH has been described to be involved in thermoregulation in *Pseudomonas syringae*, quality and quantity of sRNAs in *Neisseria gonorrhoeae* and growth at high osmolality in *E. coli* (Wachter and Hill, 2015; Hockett et al., 2014; Lee et al., 2014).

In this study we found that in *A. vinelandii*, like in other Gammaproteobacteria, including *E. coli*, the *rppH* gene encoding RppH enzyme is present immediately upstream of the *ptsP* gene forming a operon (Lee et al., 2014). Therefore, we investigated the effect of RppH on regulation of PHB synthesis and found that inactivation of *rppH* reduced PHB and AR synthesis. We also found that in *E. coli* K12 and in *A. vinelandii*, RppH negatively affects the expression of *csrA* and *rsmA* at a post-transcriptional level.

2. Materials and methods

2.1. Sequence analysis, alignment and modeling structure

The sequence analysis of the *A. vinelandii* RppH protein (AvRppH) was performed by Blast searches and a multiple sequence alignment using Mafft (Kato et al., 2002) and were visualized with Geneious® 10.1.3 trial.

A model for the *A. vinelandii* RppH structure was generated with ten structures deposited in the PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) using the program I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement). The model has a C-score of 1.22, with estimated TM-score of 0.88 ± 0.07 and a RMSD of 2.5 ± 1.9 Å. The AvRppH structure predicted by I-TASSER overlaps with the RppH *E. coli* structure (PDB 4s2X) (Vasilyaev and Serganov, 2015).

2.2. Microbiological procedures

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *A.*

vinelandii strains were grown in peptone yeast medium 2% sucrose (PY) or Burks salt medium 2% sucrose (BS) at 30 °C. Strains of *E. coli* DH5α and K12 were grown in Luria Bertani medium (LB) at 37 °C. Antibiotic concentrations (in µg/mL) used for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were as follows: spectinomycin (Sp) 100 and 50; tetracycline (Tc), 30 and 15; kanamycin (Km), 1 and 30; rifampicin (Rif) 10 and 0; ampicillin (Ap), 0 and 200; nalidixic acid (Nal), 20 and 0; and gentamicin (Gm), 1.5 and 10. *A. vinelandii* transformation and conjugation were carried out as described previously (Bali et al., 1992).

2.3. Construction of *A. vinelandii* *rppH* mutant

A DNA fragment containing the *rppH* gene was amplified using Phusion DNA polymerase enzyme (Thermo Scientific) and oligonucleotides AvNuxF and AvNuxR (Table S1). The 800 bp PCR product was cloned into the pJET1.2 vector (Thermo Scientific) to produce plasmid pLBrppH. A spectinomycin cassette obtained from vector pHP45Ω (Fellay et al., 1987) was inserted into a *Bam*HI restriction site present within the *rppH* gene of pLBrppH to produce plasmid pLFMrppH:Sp. This plasmid was confirmed to contain the antibiotic resistant cassette cloned in the same direction of *rppH* transcription (non-polar orientation). In *A. vinelandii*, the insertion of this cassette into a gene with the same orientation as the direction of transcription allows transcription of downstream genes in the same operon (Núñez et al., 2000). Plasmid pLFMrppH:Sp was digested with *Sca*I and introduced into *A. vinelandii* strains (Kennedy et al., 1986). Transformants resistant to Sp were isolated and confirmed by PCR to carry the *rppH*:Sp mutation (data not shown).

2.4. Complementation of *rppH* mutation

A kanamycin cassette obtained from vector pBSL97 (Alexeyev et al., 1995) was cloned into the *Sca*I site of plasmid pLBrppH to obtain pSMrppH-Km. This plasmid unable to replicate in *A. vinelandii* and carrying a wild type copy of *rppH* including its promoter sequences, was transformed into the UW*rppH* mutant strain for cointegration into the chromosome. Kanamycin and spectinomycin resistant transformants were isolated. Transformant UW*rppH*-*rppH*+ that showed a wild type PHB production phenotype was confirmed by PCR to carry pSMrppH-Km cointegrated into the chromosome. Cointegration was shown to occur downstream the Spectinomycin-resistance cassette, allowing the wild-type *rppH* gene to be transcribed from its own promoter (Fig. S1).

2.5. Construction of *E. coli* *csrA*-*rppH* double mutant

The deletion of *rppH* gene in the *csrA* mutant background was done as previously described (Datsenko and Wanner, 2000). Briefly, the oligonucleotides ErppHDtskFw1 and ErppHDtskRv1 (Table S1) and plasmid pKD3 as template, were used to amplify a DNA fragment containing a chloramphenicol resistance (*cat*) gene flanked by RFT (RFLP recognition target) sites. The resultant PCR product was purified and used as template for a second PCR using the oligonucleotides ErppH-DtskFw2 and ErppH-DtskRv2. The second PCR product was purified by column, digested with *Dpn*I and used to transform *E. coli* K12 IFC5010 – *csrA* mutant – (Camacho et al., 2015) harboring the pKD46 vector. Chloramphenicol resistant transformants were isolated. Loss of the helper plasmid (pKD46) was done incubating the transformants in LB plates without antibiotic at 42 °C. The *cat* gene was eliminated from chromosome of K12*csrA*-*rppH* mutant by using the pCP20 plasmid which encodes the FLP recombinase (Datsenko and Wanner, 2000).

2.6. Operon analysis

Total RNA from UW136 wild type was extracted with Total RNA Purification Kit Cat#PP210L Jena Bioscience and was used as template for cDNA synthesis with Thermo Scientific RevertAid H Minus First

Table 1
Strains and plasmids used in this work.

	Description	Reference or source
A. vinelandii strains		
OP	Wild-type rifampicin sensitive	Bush and Wilson (1959)
OP $rppH$	OP with a $rppH$:Sp mutation	This work
UW136	OP derivative resistant to rifampicin	Kennedy et al. (1986)
UW $rppH$	UW136 with a $rppH$:Sp mutation	This work
UW $rppH$ - $rppH$ +	UW $rppH$ with plasmid pSM $rppH$ -Km integrated into the chromosome	This work
UW $rppH$ - $rsmA$	UW136 with $rppH$:Sp and $rsmA$:Km mutations	This work
LSW1	UW136 with a $ptsP$:Tc mutation	Muriel-Millán et al. (2015)
AHW13	UW136 with a $phbR$ - $gusA$ transcriptional fusion	Hernandez-Eligio et al. (2012)
RppH $phbR$ -T	UW $rppH$ with a $phbR$ - $gusA$ transcriptional fusion	This work
AHW17	UW136 with a $phbR$ - $gusA$ translational fusion	Hernandez-Eligio et al. (2012)
RppH $phbR$ -PT	UW $rppH$ with a $phbR$ - $gusA$ translational fusion	This work
AHW21	UW136 with a $phbB$ - $gusA$ transcriptional fusion	Hernandez-Eligio et al. (2012)
RppH $phbB$ -T	UW $rppH$ with a $phbB$ - $gusA$ transcriptional fusion	This work
AHW25	UW136 with a $phbB$ - $gusA$ translational fusion	Hernandez-Eligio et al. (2012)
RppH $phbB$ -PT	UW $rppH$ with a $phbB$ - $gusA$ translational fusion	This work
UW $rsmA$ -T	UW136 with an $rsmA$ - $gusA$ transcriptional fusion	This work
RppH $rsmA$ -T	UW $rppH$ with an $rsmA$ - $gusA$ transcriptional fusion	This work
UW $rsmA$ -PT	UW136 with an $rsmA$ - $gusA$ translational fusion	This work
RppH $rsmA$ -PT	UW $rppH$ with a $rsmA$ - $gusA$ translational fusion	This work
E. coli strains		
K12 BW25113	Wild type	KEIO Collection
JW2798-1	K12 BW25113 with an $rppH$:Km mutation	KEIO Collection
IFC5010	KSB837 with a $csrA$:Km mutation	Camacho et al. (2015)
K12 $csrA$ - $rppH$	IFC 5010 with an $rppH$ deletion mutation.	This work
K12-pET22	K12 BW25113 with pET22b plasmid	This work
K12-pAvr $rppH$	K12 BW25113 with the pET22b-Avr $rppH$ plasmid	This work
K12 $rppH$ -pET22	JW2798-1 with pET22bplasmid	This work
K12 $rppH$ -pAvr $rppH$	JW2798-1 with pET22b-Avr $rppH$	This work
Plasmids		
pJET 1.2/blunt	Cloning vector	Thermo Scientific
pLBrppH	pJET 1.2 carrying a 0.8 kb fragment containing the $rppH$ gene	This work
pLFMrppH:Sp	pLBrppH derivative with a $rppH$:Sp mutation	This work
pSMrppH:Km	pLBrppH derivative with a Km resistance cassette gene	This work
pUMAT $gusA$ AT	Plasmid for $gusA$ transcriptional fusions	Muriel-Millán et al. (2015)
pUMAT $gusA$ PT	Plasmid for $gusA$ translational fusions	Cocotl-Yañez et al. (2014)
Prsma- $gusA$ AT	Plasmid with a $rsmA$ - $gusA$ transcriptional fusion	This work
prsmA- $gusA$ PT	Plasmid with a $rsmA$ - $gusA$ translational fusion	This work
pET22b	Expression vector	Novagen
pLB-Avr $rppH$	pET22b-Avr $rppH$ carrying <i>A. vinelandii</i> $rppH$	This work
pKD3	Contains an FRT flanked chloramphenicol resistance (cat) gene	Datsenko and Wanner (2000)
pKD46	Recombineering (Making chromosomal deletions of genes with FRT sites) Red helper plasmid. Amp ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	Expresses FLP recombinase activity. Amp ^R and Cm ^R . temperature-sensitive replication	Datsenko and Wanner (2000)

Strand cDNA Synthesis Kit #K1632. The resultant cDNAs and the oligonucleotides UpIg-nHPT y LwIg-nHPT and upIntgpts_220 and lwIntgpts_220 were used to amplify the intergenic $rppH$ - $ptsP$ and $ptsP$ -*Avin08220* intergenic regions, respectively. Positive controls were included using UW136 chromosomal DNA as template. A negative control without reverse transcriptase was included.

2.7. Construction of transcriptional and translational $gusA$ -gene fusions

To generate a transcriptional $rsmA$ - $gusA$ gene fusion, a fragment of 274 bp, corresponding to the $rsmA$ promoter was amplified by PCR using oligonucleotides prsma-F $SacI$ and prsma-R2 $EcoR1$. This fragment was cloned into vector pUMAT $gusA$ AT (Muriel-Millán et al., 2015), previously digested with $SacI$ and $EcoR1$ generating plasmid prsma- $gusA$ AT.

For the construction of strains carrying $rsmA$ - $gusA$ translational fusion, plasmid prsma- $gusA$ PT was generated. A $SacI$ - $PstI$ fragment of 338 bp (containing promoter, the untranslated 5' end and the first 16 codons of $rsmA$) was amplified using oligonucleotides prsma-F $SacI$ and pRsmA-R $PstI$ and cloned between the corresponding sites of plasmid pUMAT $gusA$ PT (Cocotl-Yañez et al., 2014).

The resulting vectors were linearized with $NdeI$, and used to transform *A. vinelandii* strains. Tc^r recombinants were selected and verified to carry the $rsmA$ - $gusA$ transcriptional fusion or $rsmA$ - $gusA$ translational

fusion into the chromosome (data not shown).

2.8. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assays

qRT-PCR was performed as previously reported (Noguez et al., 2008). Total RNA was extracted from *A. vinelandii* strains grown in BS liquid medium for 18 h, and *E. coli* strains grown in LB liquid medium for 4 h. The relative levels of $rsmA$ and $csrA$ were detected using the oligonucleotides previously reported (Table S1). The levels of 16 s rRNA and $rrsB$ were used as internal control to normalize the results in analysis in *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively. All assays were done for triplicate. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The reproducibility of the whole procedure was confirmed in two independent experiments.

2.9. Stability of $rsmA$ and $csrA$ transcripts

For $rsmA$ mRNA stability assays, the *A. vinelandii* OP strain (rifampicin-sensitive wild type) (Bush and Wilson, 1959) and its OP $rppH$ isogenic derivative were grown on BS liquid medium for 18 h. Cells were harvested at various times following the addition of rifampicin (500 μ g/mL final concentration) and total RNA was extracted. qRT-PCR was performed as described above to determine the levels of $rsmA$ transcripts. The RNA remaining through the time-course was

determined by calculating differences in cycle threshold (Ct); subsequent fold differences were obtained comparing with the 0 time point. The *gyrA* mRNA levels were used as internal control.

For determination of *csrA* mRNA stability in *E. coli*, strains were grown on LB liquid medium for 4 h (pre-cultivated for 12 h), Cells harvested at various times after addition of rifampicin to a final concentration of 500 µg/mL were used to determine the level of the *csrA* transcript following the same protocol described for the *rsmA* transcript. The *rrsB* gene was used as constitutive control.

2.10. Heterologous complementation

The *A. vinelandii rppH* gene was amplified by PCR using chromosomal DNA of UW136 strain as template and *rppH*ExpFw and *rppH*ExpRev oligonucleotides. The PCR product of 480 bp was digested with *XhoI* and *NdeI* and then ligated into pET22b to generate plasmid pLBA*rppH*. *E. coli* K12 and K12*rppH* strains were transformed with this plasmid or empty plasmid pET22b. These strains were used for motility assays in soft agar plates with IPTG 0.1 mM as described below.

2.11. Motility assays

Soft agar plates containing 1%, triptone, 0.5% NaCl and 0.3% agar were used for the *E. coli* motility assays (Takekawa et al., 2015). A 1 µL samples from overnight cultures grown in LB were inoculated into the soft agar plates. The swimming halos were observed after 6 h of inoculation at 37 °C.

2.12. Analytical methods

PHB levels were determined in cells grown in PY plates at 72 h by the Law and Slepceky method (Slepceky and Law, 1961). The ARs were measured from cells grown in Burk Butanol (BBOH) plates for 120 h as described (Segura et al., 2003a). The β-glucuronidase activity was measured as previously described (Wilson et al., 1995). 1 U corresponds to 1 nmol of *p*-nitrophenyl-β-D-glucuronide hydrolyzed per minute per mg of protein. Protein concentration was determined by Lowry method (Lowry et al., 1951).

2.13. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 7.0) software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was determined using the two-tailed, unpaired Student's *t*-test, and a *P*-value ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. The RppH proteins from *E. coli* and *A. vinelandii* are highly identical

The RNA pyrophosphohydrolase RppH, a member of the Nudix hydrolase family that contains the Nudix motif (GX₅EX₇REUXEEXGU), converts 5'-terminal tri/diphosphate of mRNA to a monophosphate for the control of mRNA decay (Deana et al., 2008; Luciano et al., 2017). A BLAST search showed that the *A. vinelandii* RppH protein (AvRppH) is 64% identical to the *E. coli* RppH protein (EcRppH) and contains a region that matches 100% the Nudix motif (Fig. 1A,C). The amino acids corresponding to the active site are conserved between EcRppH and AvRppH except for the Ser32 that in AvRppH corresponds to Ala (Fig. 1A). Interestingly, when in the EcRppH the Ser32 residue is replaced by Ala, its specificity increased because the number of mRNA substrates was reduced (Foley et al., 2015), suggesting that AvRppH could be more specific than EcRppH. The AvRppH showed an identity of 62% and 39% with *B. subtilis* and *H. pylori* RppH, respectively, which have been shown to possess the RNA pyrophosphohydrolase activity (Hsieh et al., 2013; Bischler et al., 2017). The three-dimensional

structure of AvRppH was modeled using the X-ray crystal structure of EcRppH (Vasilyaev and Serganov, 2015) as a template with a coverage of 98% (Fig. 1B). The sequence similarity and the three-dimensional structure model strongly suggest that AvRppH, like EcRppH, is an RNA pyrophosphohydrolase.

3.2. The *rppH*, *ptsP* and *Avin48220* genes are transcribed as an operon

In bacteria belonging to the *Pseudomonadaceae* and *Enterobacteriaceae* family, the *rppH* (*nudH*) gene is located immediately upstream of *ptsP*, which encodes the EI^{Ntr} protein from PTS^{Ntr}. *Avin48220* encodes a transduction signal protein involved in the synthesis of c-diGMP and in *A. vinelandii*, the *rppH*, *ptsP* and *Avin48220* genes are predicted to constitute an operon (<http://operons.ibt.unam.mx/gctNG/>). In order to confirm this prediction, we carried out experiments to identify the presence of an *rppH-ptsP-Avin48220* transcript in *A. vinelandii*. Total RNA extracted from UW136 strain was used for end-point RT-PCR assays using specific oligonucleotides shown in Fig. 2A. RT-PCR products that correspond to *rppH-ptsP* (500 bp) and *ptsP-Avin48220* (300 bp) intergenic regions were obtained from cDNA (Fig. 2B). This result indicated that the *rppH-ptsP-Avin48220* gene cluster is transcribed as an operon headed by *rppH*. This operon is flanked by *Avin48200* located downstream and in opposite direction of *Avin48220* and *Avin48250* located upstream and in opposite direction of *rppH* (Fig. S2).

3.3. Inactivation of *rppH* affects the production of PHB

In bacteria, the products of genes present in an operon are generally involved in the same function or pathway, thus the question whether *rppH* and *Avin48220* are involved in the control of PHB synthesis was raised. We investigated whether *rppH* similar to *ptsP* was involved in regulation of the PHB synthesis. We constructed, as described in materials and methods, the strain UW*rppH*, a UW136 derivative carrying an *rppH* mutation that allows transcription of downstream genes (*ptsP* and *Avin48220*). As expected, the *ptsP* mRNA levels in the UW*rppH* mutant and UW136 strains as detected by qRT-PCR were very similar (data not shown). As shown in Fig. 3A, the UW*rppH* mutant exhibited a less opaque phenotype than the parental UW136 strain due to a reduction in PHB accumulation. Quantification of PHB levels revealed that in the UW*rppH* strain, polymer accumulation was reduced by 70% as compared with the UW136 strain (Fig. 3B).

To further demonstrate the positive role of RppH in PHB synthesis, we constructed as described in materials and methods, strain UW*rppH-rppH*+, a derivative of UW*rppH* strain carrying a copy of the wild-type *rppH* gene within plasmid pSM*rppH*-Km, which was integrated into the chromosome. The complemented UW*rppH-rppH*+ strain showed a phenotype of PHB production very similar to that of the wild type strain (Fig. 3) confirming that RppH is required for optimal synthesis of PHB in *A. vinelandii*.

A previous study showed that, in contrast to *ptsP* and *rppH*, the *Avin48220* gene of the *rppH-ptsP-Avin48220* operon, does not seem to be involved in the control of PHB synthesis, since a plasmid carrying a copy of the *ptsP* wild type gene, restored the PHB biosynthesis in a mutant carrying a *ptsP:Tn5* polar mutation (Segura and Espín, 1998).

3.4. *RppH* is necessary for expression of *phbR* at post-transcriptional level

PhbR is the transcriptional activator of the *phbBAC* operon. We determined the effect of the *rppH* mutation on *phbR* expression using transcriptional *phbR-gusA* and translational *phbR::gusA* gene fusions. The β-glucuronidase activity in strains AHW13 and RppH*phbR*-T derivatives of UW136 and UW*rppH* strains carrying the *phbR-gusA* transcriptional fusion, respectively, was determined. As shown in Fig. 4A, the β-glucuronidase activity was similar in these strains, indicating that the *rppH* mutation did not affect transcription of *phbR*. In contrast, in strain

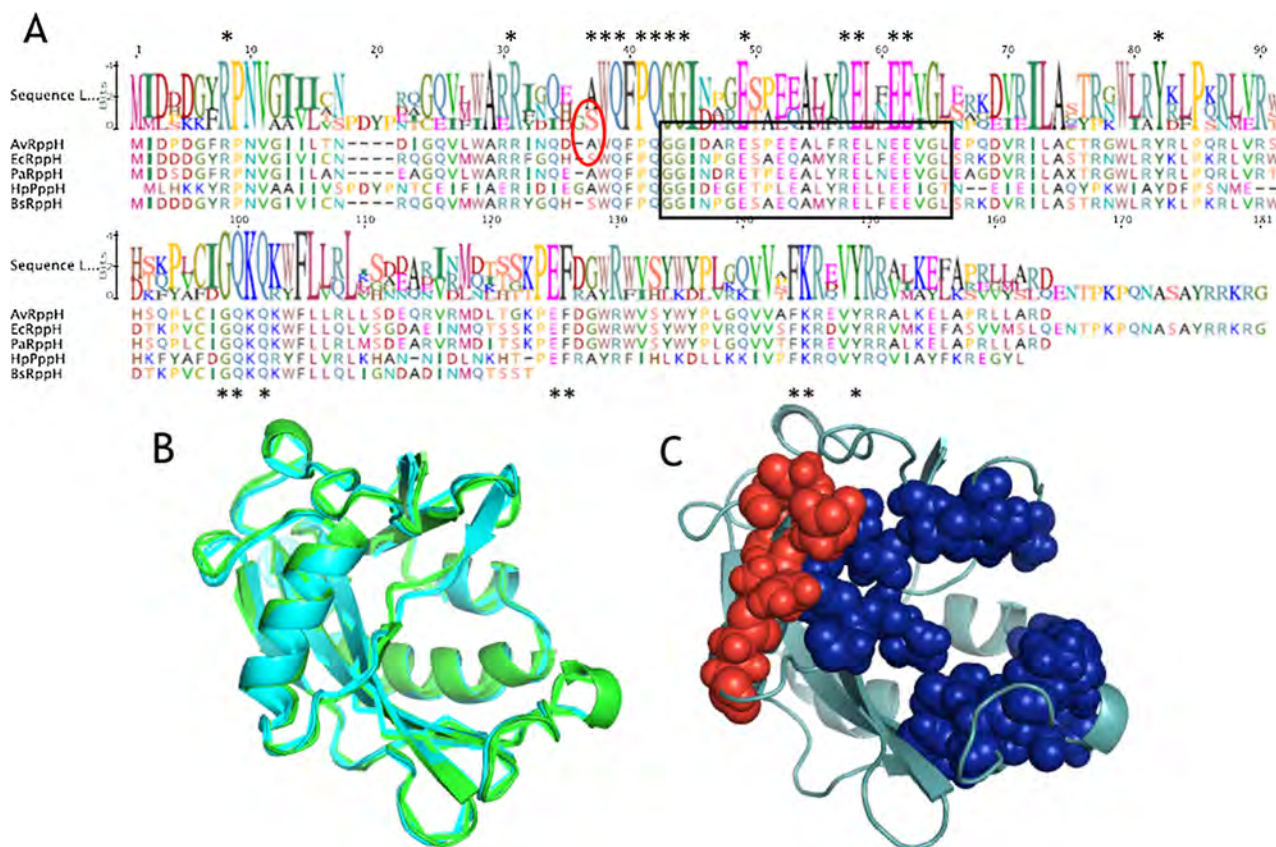


Fig. 1. *A. vinelandii* RppH alignment and structure. (A) Alignment of AvRppH amino acid sequence with RppH sequences from *E. coli* (*Ec*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps*), *Helicobacter pylori* (*Hp*) and *Bacillus subtilis* (*Bs*). The Nudix motif (GX₅EX₇REUXEEXGU) is enclosed in a rectangle, Catalytic residues are indicated by an asterisk (*). The change of catalytic residue S by A is shown within the red oval. (B) Prediction of *A. vinelandii* RppH 3D structure (green) overlapped with crystal structure of *E. coli* RppH (blue). (C) Prediction of *A. vinelandii* RppH 3D structure with catalytic residues (blue) and Nudix box (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

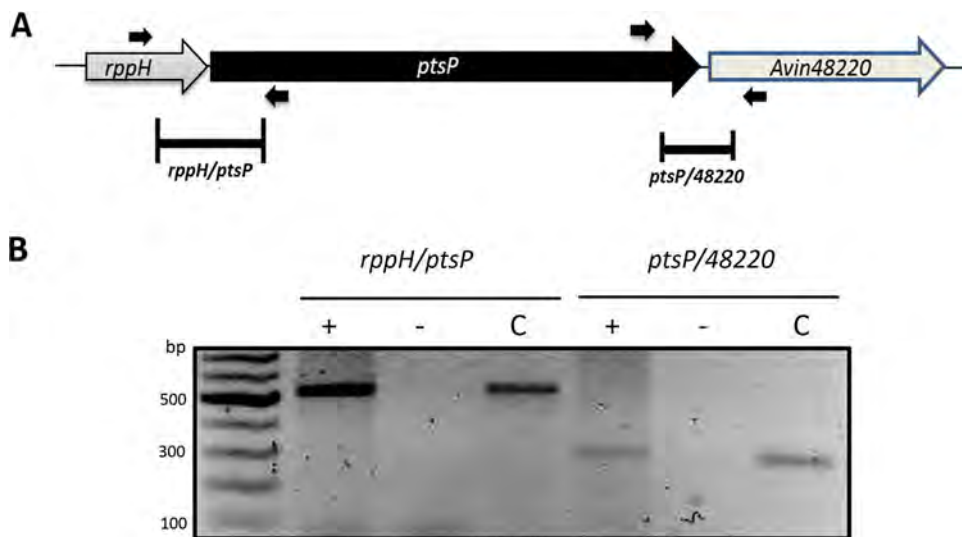


Fig. 2. *rppH*, *ptsP* and *Avin48220* genes are transcribed as an operon. (A) Schematic representation of the *rppH-ptsP-Avin48220* operon, showing the region amplified for RT-PCR using specific oligonucleotides to amplify intergenic regions. (B) Electrophoresis in agarose 1% of RT-PCR amplified fragments carrying the intergenic regions with (+) and without (-) reverse transcriptase, and fragments corresponding to the chromosomal DNA positive control (C).

RppHphbR-PT, a derivative of UW*rppH* carrying the *phbR-gusA* translational fusion, the β -glucuronidase activity was reduced about 70% as compared to the activity observed in the wild-type strain carrying the *phbR-gusA* translational fusion (Fig. 4B). The β -glucuronidase activity in derivatives of UW136 and UW*rppH* carrying *phbB-gusA* transcriptional and *phbB-gusA* translational fusions was also determined and is shown in Fig. 4C and D. A negative effect of the *rppH* mutation on the transcription and translation of *phbB* was observed. This effect was expected

since the *rppH* mutation reduced translation of PhbR, the activator of *phbB* transcription (Fig. 4B). These results indicate that in the UW*rppH* mutant, the translation of the *phbR* transcript is reduced resulting in a diminished *phbBAC* transcription and therefore in a negative PHB phenotype.

Together, these results and the fact that the *E. coli* RppH homolog removes pyrophosphates from 5'-end of some mRNAs promoting their degradation by RNase E, allow us to hypothesize that RppH

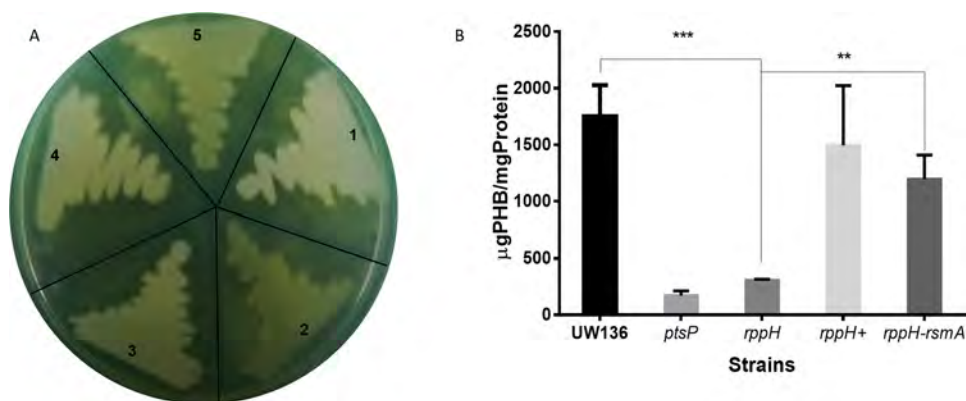


Fig. 3. The *rppH* mutation negatively affects PHB production. (A) PHB synthesis phenotype of strains: wild-type UW136 (1), UW*rppH* (2), UW*rppH-rppH+* (3), UW*rppH-rsmA* (4), and *ptsP* mutant LSW1 (5). Strains were grown in PY 2% sucrose plates for 72 h at 30 °C. (B) Quantification of PHB produced by strains under the conditions described in panel A. ** denotes *P* value < 0.001 *** denotes *P* value < 0.0001.

participates in the degradation of a transcript encoding a negative regulator of *phbR* translation.

3.5. Inactivation of *rsmA* restores the synthesis of PHB in the *rppH* mutant

Previously, we reported that the RsmA protein is a translational repressor of the *phbR* mRNA (Hernandez-Eligio et al., 2012). Therefore, and in agreement with the hypothesis mentioned above, the question whether the repression of *phbR* translation and the PHB defective phenotype observed in the *rppH* mutant strain was caused by the RsmA protein was raised. A double mutant *rppH-rsmA* strain was constructed as described in materials and methods. As expected, the production of PHB in the *rppH-rsmA* strain was similar to that observed in the wild type UW136 strain (Fig. 3A,B), indicating that the PHB negative phenotype in the *rppH* strain is caused by the RsmA protein.

3.6. Alkylresorcinol synthesis is also affected by the *rppH* mutation

The RsmA protein negatively controls AR synthesis by binding the *arpR* mRNA that encodes the transcriptional activator of the AR biosynthetic operon *arsABCD* (Romero et al., 2016). Therefore, it was expected that the *rppH* mutant strain should show a negative phenotype of AR production caused by the RsmA protein, and also that in the *rppH-rsmA* double mutant the synthesis of AR should be restored. The AR phenolic lipids produced by these *A. vinelandii* strains were visualized

by staining with Fast Blue B (Romero et al., 2013). As expected, the *rppH* mutation reduced the synthesis of AR, and inactivation of the *rsmA* gene restored the phenotype of synthesis of these lipids (Fig. S3). These data further reinforce the notion that in the *rppH* mutant the RsmA protein causes the negative effects on PHB and AR synthesis.

3.7. The expression of *rsmA* is affected in the *rppH* mutant

To investigate whether RppH affected the expression of *rsmA*, the relative levels of the *rsmA* transcript were determined by qRT-PCR in the wild type and the UW*rppH* mutant. Similar levels of *rsmA* mRNA for the two strains in the stationary phase of growth (24 and 30 h) were observed (data not shown), although an increase of about 60% in the UW*rppH* mutant as compared to the wild type was observed at 18 h during the exponential growth (Fig. 5A). Additionally, we determined the effect of the *rppH* mutation on the stability of the *rsmA* mRNA, as described in materials and methods. As shown in Fig. 5B, after the arresting of transcription, the *rsmA* transcripts in the *rppH* mutant are more stable than in the wild type strain. Taken together, these results suggest that the *rsmA* mRNA could be an RppH substrate.

We also determined whether RppH affected the transcription and/or translation of *rsmA*, using UW136 and UW*rppH* derivatives carrying *rsmA-gusA* transcriptional and *rsmA-gusA* translational fusions. The β -glucuronidase activity of the strains with the transcriptional fusion was very similar (data not shown). In contrast, and as shown in Fig. 5C, the

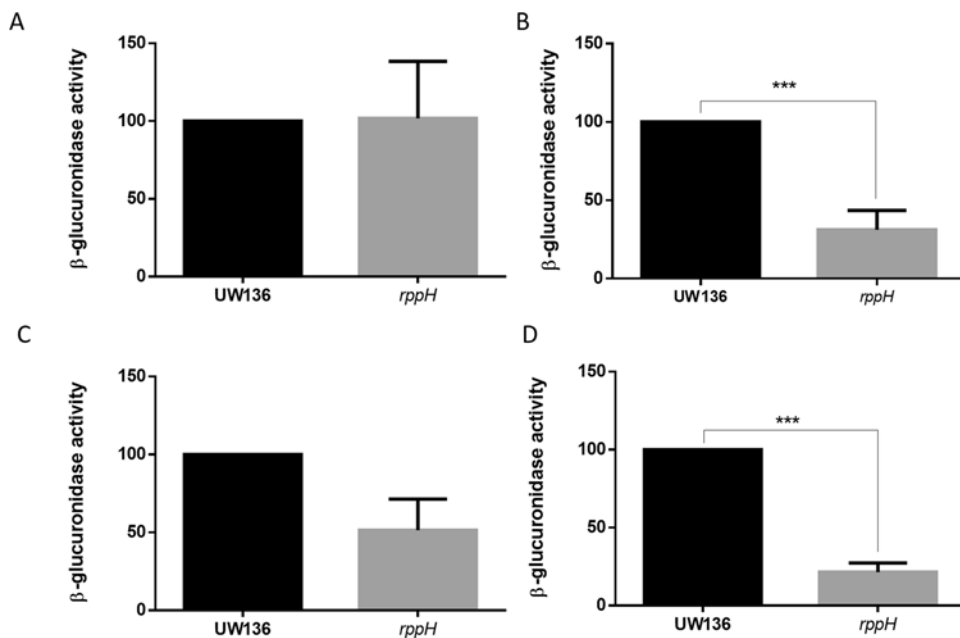


Fig. 4. The *rppH* mutation reduced the translation of *phbR*. β -glucuronidase activity of the wild type UW136 (black bars) and *rppH* mutant (gray bars) derivatives carrying *phbR-gusA* and *phbB-gusA* transcriptional and *phbR-gusA* and *phbB-gusA* translational gene fusion. (A), *phbR-gusA* transcriptional fusion, (B) *phbR-gusA* translational fusion (C), *phbB-gusA* transcriptional fusion and (D), *phbB-gusA* translational fusion. β -glucuronidase activity values are reported as% of wild type, and were determined after 48 h of growth in BS liquid medium. Values are the average of three independent experiments; error bars, SD. *** denotes *P* value < 0.0001.

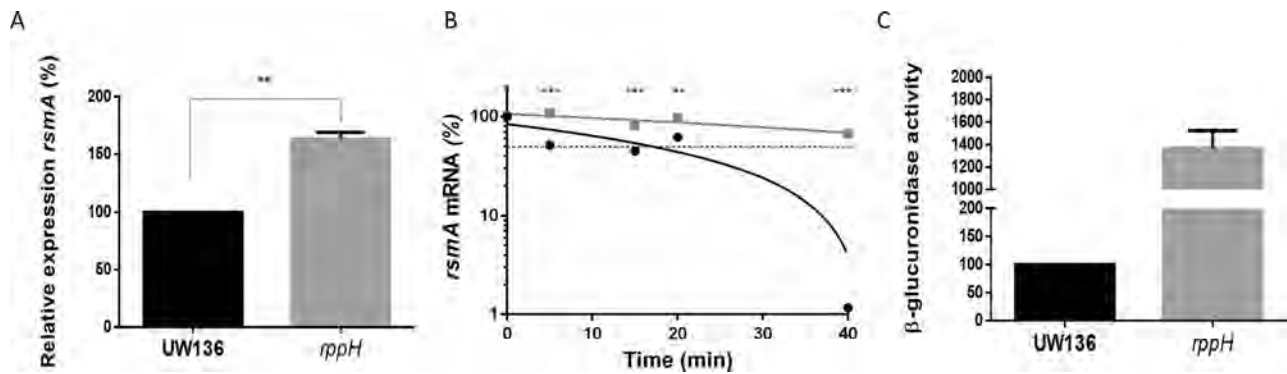


Fig. 5. The *rsmA* expression is increased in *rppH* mutant. (A), Level of *rsmA* transcript (determined by qRT-PCR) from cultures of UW136 and UW*rppH* strains. The strains were grown 18 h in BS liquid medium. (B), Stability of the *rsmA* transcript in the wild type OP (black) and the UW*rppH* mutant (gray). The values were determined by qRT-PCR, at different times after transcriptional arrest by addition of rifampicin. The strains were grown in BS medium for 18 h (late exponential phase). *gyrA* was used as internal control to normalize the results. This is one representative experiment. (C), β -glucuronidase activity in wild type UW136 (black bar) and UW*rppH* mutant (gray bar) derivatives carrying an *rsmA:gusA* translational fusion. β -glucuronidase activity was determined at 18 h of growth in BS liquid medium, activity values are reported as% of wild type. ** denotes P value < 0.001, *** denotes P value < 0.0001.

activity of the *rsmA:gusA* translational fusion in the UW*rppH* mutant was much higher than in the UW136 strain. These results indicate that, in the absence of the RppH activity, the expression of *rsmA* at the translational level is increased and are in agreement with the proposal that the negative effects of the *rppH* mutation on PHB and AR synthesis are caused by the RsmA protein.

Altogether, these results (Figs. 3–5) indicate that in the *rppH* mutant the decrease in PHB production is caused by an increase in the expression of RsmA.

3.8. The level of the *csrA* transcript is higher and more stable in an *E. coli rppH* mutant

We determined whether in *E. coli* the level of the *csrA* transcript (encoding the RsmA homolog) was also affected in an *rppH* mutant. The relative levels of the *csrA* transcript in the wild type *E. coli* K12 and its derivative *rppH* mutant were determined by qRT-PCR during exponential growth phase. The *csrA* mRNA levels increased by two-fold in *rppH* mutant as compared to the wild type (Fig. 6A).

Additionally, we analyzed the stability of the *csrA* transcript in the wild type and the *rppH* mutant. As shown in Fig. 6B, in *E. coli* K12 the half-life of the *csrA* transcripts, after the arrest of transcription by addition of rifampicin, was 8 min approximately, however in the *rppH* mutant strain, the half-life of *csrA* increased to more than 15 min. These results indicate that in *E. coli* K12, RppH controls the mRNA levels and stability of *csrA* and suggests that the *csrA* transcript may be a degradation target of RppH.

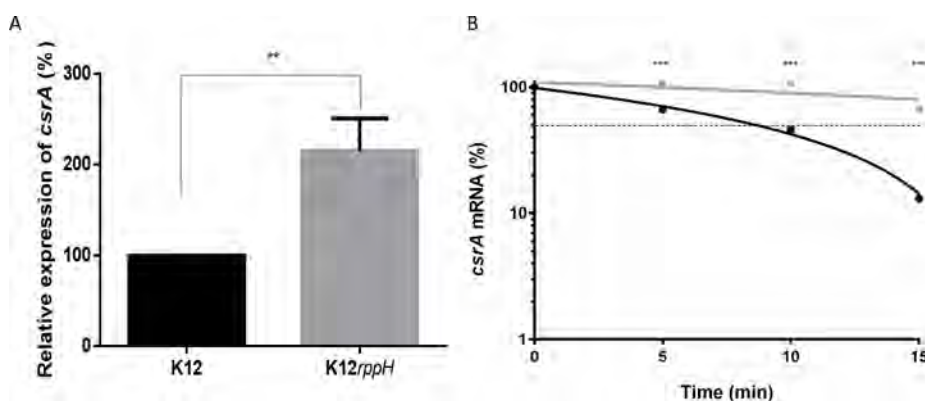


Fig. 6. The stability of *csrA* transcript in *E. coli* is increased in an *rppH* mutant. (A), Analysis by qRT-PCR of the level of the *csrA* transcript using RNA isolated from cultures of *E. coli* K12 and its *rppH* mutant derivative. The strains were grown 4 h in LB liquid medium. (B), *csrA* mRNA stability in the wild type strain *E. coli* K12 (black) and its *rppH* mutant (gray). The stability was determined by qRT-PCR, after transcriptional arrest by addition of rifampicin. The strains were grown in LB medium to an O.D. of 0.6. This is one representative experiment. For (A) and (B) *rpsB* gene was used as constitutive control and as internal control to normalize the results. ** denotes P value < 0.001, *** denotes P value < 0.0001.

3.9. The *E. coli rppH* mutant has an hyper-swimming phenotype that is suppressed by a *csrA* mutation

In *E. coli*, *csrA* mutants showed a swimming defective phenotype (Wei et al., 2001), due to a lack of expression of *flhDC*, the master regulator of flagella synthesis, as CsrA binds the *flhDC* mRNA protecting it from RNase E-mediated cleavage (Yakhnin et al., 2013). As shown in Fig. 7, and in agreement with the high levels of *csrA* transcript (Fig. 6A), the *E. coli rppH* mutant showed a hyper-swimming phenotype (Fig. 7A,B). Additionally, the level of the *flhDC* transcript determined by qRT-PCR was 5-fold higher in the *rppH* mutant as compared to the wild type (Fig. 7C). This result strongly suggests that the *flhDC* transcript is a substrate of the RppH-RNase E pathway. As expected the hyper-swimming phenotype of the *rppH* mutant was suppressed by the *csrA* mutation, as the K12*rppH-csrA* double mutant showed a negative motility phenotype (Fig. 7A,B). Interestingly, the *flhDC* transcript level in the K12*rppH-csrA* strain was similar to that of the wild type (Fig. 7C). Thus, the lack of motility in the K12*rppH-csrA* mutant, even though has levels of the *flhDC* transcript similar to those present in the wild-type, indicates that in addition to its previously reported role providing protection from degradation by RppH-RNaseE (Yakhnin et al., 2013), CsrA plays an additional positive role on translation of the *flhDC* transcript. As expected, we found that the *flhDC* mRNA is reduced in the *csrA* mutant (Fig. 7C).

3.10. Complementation of the *E. coli rppH* mutant with the *A. vinelandii rppH* gene

To further demonstrate the *in vivo* activity of *A. vinelandii* RppH, we complemented the *E. coli rppH* mutant with the *AvrppH* gene. A plasmid

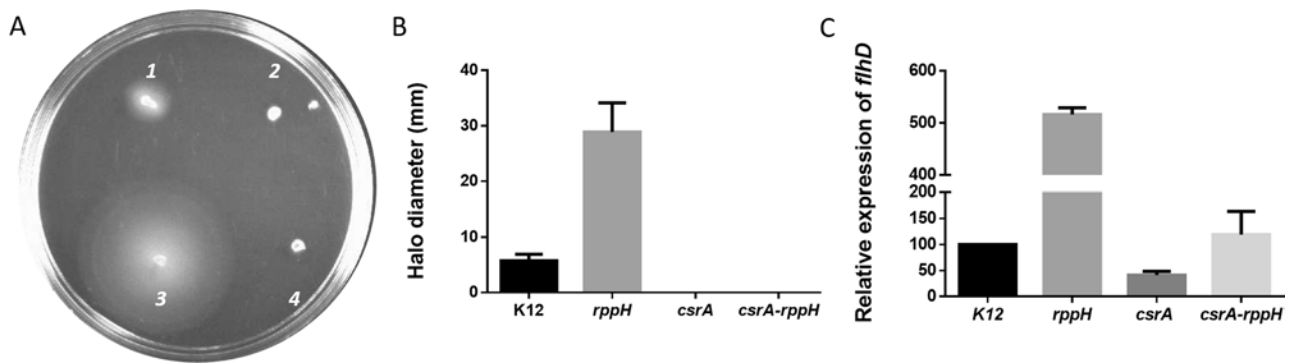


Fig. 7. Motility phenotype of *E. coli* strains. (A), Swimming assays of wild type strain K12 (1), and its mutant derivatives *csrA* (2), *rppH* (3), and *csrA-rppH* (4). (B), Diameter of swimming halos was determined after 6 h of inoculation. (C) Analysis by qRT-PCR of the level of the *flhD* transcript using RNA isolated from cultures of these *E. coli* strains. The *rrsB* gene was used as constitutive control. The strains were grown 4 h in LB liquid medium.

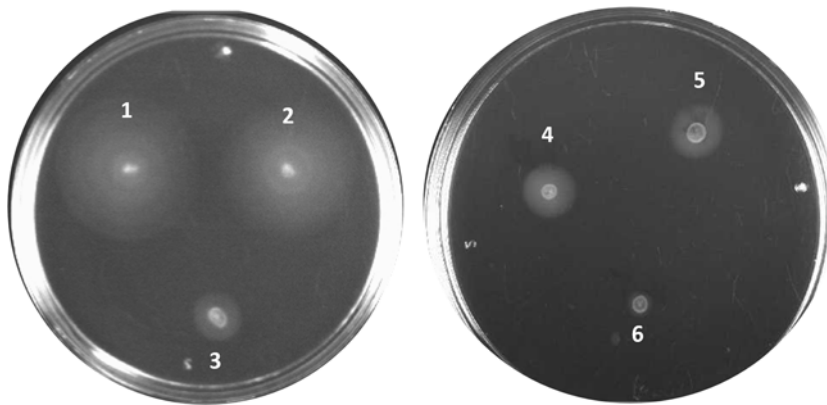


Fig. 8. *A. vinelandii rppH* restores the wild type swimming phenotype to the *E. coli rppH* mutant. (A), Swimming assays of (1) JW2798-1 *rppH* mutant (36 mm), (2) K12*rppH*-pET22 (33 mm), (3) K12*rppH*-pAvrppH (10 mm), (4) K12 (10 mm), (5) K12-pET22 (10 mm) and (6) K12-pAvrppH (0 mm). Diameter of swimming halo is shown in parenthesis. The assays were carried out in semi-solid triptone agar 0.35% with 0.1 mM IPTG.

carrying the *A. vinelandii rppH* gene transcribed from an IPTG-inducible promoter (pLB-AvrppH) was constructed and introduced into both K12 and the *rppH* mutant. The complemented K12*rppH*-pAvrppH strain showed a swimming phenotype similar to that of the wild-type K12 strain, while complementation with empty plasmid K12*rppH*-pET22 did not affect the hyper-swimming phenotype of the *rppH* strain (Fig. 8), indicating that AvRppH was functional in *E. coli*. The expression of AvRppH in the wild-type K12 background produced a negative motility phenotype similar to that of *csrA* mutant (Figs. 7A and 8). These results provide evidence indicating that AvRppH is a protein with pyrophosphohydrolase activity on mRNA.

4. Discussion

Messenger RNA degradation plays a central role in regulation of gene expression. In bacteria, the enzymes RNase E and J are the main ribonucleases involved in RNA metabolism. The RppH pyrophosphohydrolase participates in RNA degradation by converting the 5'-terminal tri/diphosphate of some mRNAs to a monophosphate, exposing the transcripts to the activity of 5'-monophosphate-dependent endoribonucleases (Hui et al., 2014).

This study showed that, in *A. vinelandii*, the inactivation of *rppH* reduced the translation of the *phbR* mRNA that encodes for the transcriptional activator of the *phbBAC* biosynthetic operon.

The translational repression of *phbR* in the *rppH* strain involved the RNA-binding protein RsmA, which represses the translation of *phbR* resulting in a reduction in the transcription of *phbBAC* and the synthesis of PHB (Hernandez-Eligio et al., 2012). Evidence for the role of RppH in the control of the RsmA expression was provided by the fact that inactivation of the *rsmA* gene in the *rppH* mutant restored the synthesis of PHB to wild type levels (Fig. 3). Additionally, the translation and stability of the *rsmA* mRNA were higher in the *rppH* strain than in the wild

type, suggesting that RppH reduces the expression of *rsmA*, favoring the translation of *phbR* (Fig. 3).

We hypothesized that RppH participates in the regulation of *rsmA* expression probably by converting 5'tri/diphosphate to monophosphate of *rsmA* mRNA favoring its degradation. In agreement with this hypothesis, the level of the *rsmA* transcripts and their stability were higher in the *rppH* mutant than those in wild type strain at the exponential phase of growth (Fig. 3).

The question whether the *rsmA* transcript is a substrate for RppH remains to be solved, because we did not detect RppH activity on the *rsmA* transcript using PABLO assay (Celesnik et al., 2008). Interestingly, a recent report showed that the *E. coli* RppH enzyme is more active on mRNA substrates with 5'diphosphate than 5'triphosphate ends, suggesting that a yet undiscovered enzyme converts 5'triphosphates to diphosphates that are in turn the substrates of RppH (Luciano et al., 2017). Thus, the negative results obtained in PABLO assay could be the result of a reduced activity of AvRppH on 5'triphosphate mRNAs. Alternatively, as RppH recognize sequence in the mRNA 5'end (Foley et al., 2015), some but not all transcripts originated from different start sites could be substrates of RppH. In *A. vinelandii*, transcription of *rsmA* can be driven from more than one promoter (Quiroz-Rocha et al., 2017), thus the possibility that the start site of the *rsmA* transcript evaluated in the PABLO assay is not recognized by RppH needs to be ruled out.

The heterologous complementation of the *E. coli* K12*rppH* mutant with the AvRppH implies that AvRppH is a pyrophosphohydrolase enzyme (Fig. 8). Other alternative hypothesis such as that RppH participates in degradation of an RNA that acts as, or encodes an activator of *rsmA* mRNA translation cannot be ruled out.

In the *rppH* mutant, the translation of *rsmA* determined by the use of an *rsmA*:*gusA* translational fusion was 10 fold higher than in the wild type, while the increase in the *rsmA* transcript as determined by qRT-

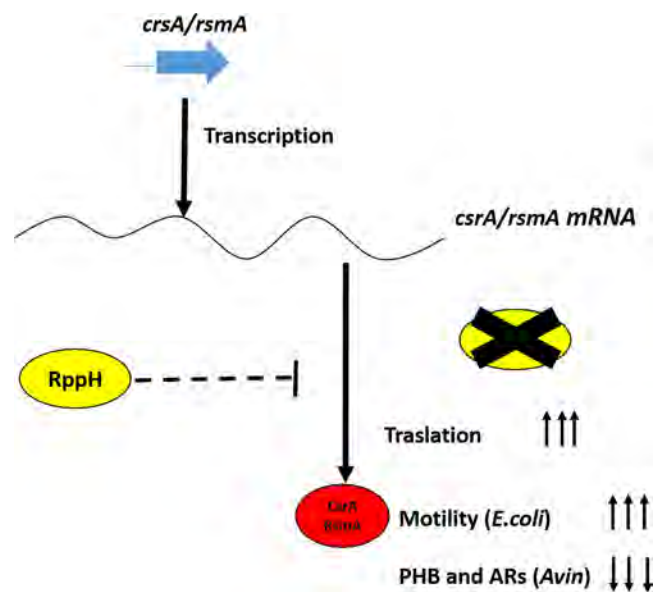


Fig. 9. Hypothetical model for the control of RsmA/CsrA expression by RppH in *A. vinelandii* and *E. coli*. The translation of *rsmA/csrA* is inhibited directly or indirectly by RppH. In absence of RppH, translation of the *crsA/rsmA* transcripts increase, increasing the level of the CsrA/RsmA protein and consequently producing a hyper motility phenotype in *E. coli* and a repression of PHB and ARs synthesis in *A. vinelandii*.

PCR was 0.6 fold (Fig. 5). This difference is not understood at present, but suggest that *rsmA* mRNA translation in the *rppH* mutant is increased by stabilizing the transcript and also by another unknown mechanism.

In many Gamma-proteobacteria the *rppH* gene is located upstream of *ptsP*. In *A. vinelandii* and *E. coli*, (and likely in many other bacteria), *rppH* and *ptsP* are transcribed as part of the same an operon (Fig. 2), suggesting that both genes could be involved in a same functional pathway (Lee et al., 2014). Although the physiological roles of *rppH* and *ptsP* have been independently studied in *E. coli* (Celesnik et al., 2007; Lee et al., 2013), there was no evidence for a functional relationship between the products to these two genes. This and previous studies now show that in *A. vinelandii*, *rppH* and *ptsP* genes are involved in the process of PHB synthesis by the mean of regulating the expression of PhbR, the transcriptional activator of the *phbBAC* biosynthetic operon (Noguez et al., 2008).

Recently, we demonstrated that in a *ptsP* mutant strain, the transcription of *phbR* was reduced because the unphosphorylated EIIA^{Ntr} (present in the *ptsP* mutant) induced the ClpAP-dependent proteolysis of the RpoS sigma factor (Murriel-Millán et al., 2017), which is necessary for transcriptional activation of the *phbR* and *phbBAC* genes (Peralta-Gil et al., 2002; Hernandez-Eligio et al., 2012). This study showed that the inactivation of *rppH* did not reduce the transcription of *phbR* but reduced its translation by increasing the expression of the translational repressor protein RsmA (Fig. 4). Taken together, these data provide evidence for a functional relationship between *ptsP* and *rppH* genes products in which they control the expression of *phbR* at the transcriptional and translational levels, respectively.

We also provided experimental evidence that, as in *A. vinelandii*, in *E. coli* RppH is involved in the regulation of expression of the RsmA homolog, CsrA, since in the *E. coli rppH* mutant the half-life of the *csrA* transcript was increased. Other studies supporting the hypothesis that in *E. coli* RppH affects the expression of CsrA come from microarrays assays carried out in an *E. coli* K12 derivative carrying an RppH-E53A mutation. In these assays, the abundance of 382 gene transcripts, including the *csrA* mRNA, were found to increase significantly in the *rppH* mutant as compared to the wild-type strain (Deana et al., 2008). Interestingly, RNAseq experiments in *Helicobacter pylori* suggested that

the transcript for the hpy-HP1441 gene, that forms part of an operon including *csrA*, was described as an RppH target (Bischler et al., 2017).

Although CsrA represses the translation of numerous genes, this protein was shown to activate the expression of FlhDC proteins by its binding to two sites in the *flhDC* transcript leader. These two sites are required for CsrA-dependent activation of *flhDC* and for CsrA protection of the *flhDC* transcript from RNase E-mediated cleavage (Yakhnin et al., 2013). Here, we showed that an *E. coli rppH* strain has a hyper-swimming phenotype and that similar to that of the *csrA* mutant, an *rppH-csrA* double mutant showed a negative swimming phenotype. Additionally the level of *flhDC* transcript was shown to increase by 5-fold in the *rppH* strain. Thus, we propose that in the *rppH* mutant, the hyper-swimming phenotype is the result of an increase in the level of the CsrA protein that binds the *flhDC* transcript allowing its translation and preventing its degradation by the RppH-RNase E pathway.

The regulatory mechanisms of *csrA* expression have been well described in *E. coli* and are very complex. The transcription of *csrA* is driven from five promoters (P); two sigma 70 dependent (P2 and P5), two sigma S dependent (P1 and P3), and a fifth *csrA* promoter (P4). CsrA activates its own transcription in an indirect form, and negatively controls its translation by directly binding to its own mRNA (Yakhnin et al., 2011). This study revealed that the regulation of CsrA expression also involves the RppH protein probably by participating in the degradation of the *csrA* transcript.

In *A. vinelandii* the mechanisms that control the expression of RsmA are much less known. A recent study showed that the transcription of *rsmA* initiates from an RpoS-dependent promoter, and that the levels of *rsmA* mRNA were reduced about 40% in an *rpoS* mutant suggesting the existence of additional promoters driving transcription of *rsmA* (Quiroz-Rocha et al., 2017). Therefore, similar to *E. coli*, in *A. vinelandii* the expression of *rsmA* partway is transcriptionally regulated by RpoS.

Whether RsmA regulates its own expression in *A. vinelandii* remains to be elucidated. An *in silico* search revealed the presence of a putative RsmA recognition sequence in the *rsmA* transcript (data not shown), suggesting an auto regulation mechanism at the translation level similar to that observed in *E. coli* and *Pseudomonas* (Yakhnin et al., 2011; Jean-Pierre et al., 2015). This study adds to our knowledge of RsmA regulation in *A. vinelandii* as it shows that RppH is involved in the control of RsmA expression at the translational level.

Taken together, the data presented in this study allows us to propose the models depicted in Fig. 9, for the regulation of RsmA/CsrA expression by RppH in *A. vinelandii* and *E. coli*. In *A. vinelandii* translation of the *rsmA* is increased in a *rppH* mutant. Thus, the absence of the RppH pyrophosphohydrolase activity results in an increase in the level of the RsmA protein that represses the translation of its target RNAs including the *phbR* and *arpR* mRNAs, which in turn reduces the synthesis of PHB and AR. In the *E. coli* model in the absence of RppH, the *csrA* translation is also increased resulting in an increase in the concentration of the CsrA protein, that binds the *flhDC* transcript to allow its translation, in addition to its previously reported role preventing degradation of *flhDC* mRNA by the RppH-RNase E pathway.

Acknowledgements

The authors are grateful to CONACYT for PhD. scholarship to L. Bedoya. This study was partially funded by Grants CONACYT CB255212 and PAPIIT-UNAM IN207017 to G. Espin. The authors thank Dr. Joel Belasco, for his advice on this project; to Dr. Adelfo Escalante and Dr. Dimitris Georgellis for providing *E. coli* strains and to M.B. Maria L. Tabche and Dra. Alejandra Vazquez Ramos for technical support. This work is part of the fulfillment required for L. B. Ph. D. thesis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the

online version, at <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.013>.

References

- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., Croughan, T.P., 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160, 63–67.
- 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.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.-H., Lin-Chao, S., Cohen, S.N., 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *PNAS* 99, 9697–9702.
- Bischler, T., Hsieh P.-k. Resch, M., Liu, Q., Tan, H.S., Foley, P.L., Hartleib, A., Sharma, C.M., Belasco, J.G., 2017. Identification of the RNA pyrophosphohydrolase RppH of *Helicobacter pylori* and global analysis of its RNA targets. *J. Biol. Chem.* 292, 1934–1950.
- Bouvier, M., Carpousis, A.J., 2011. A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol. Microbiol.* 82, 1305–1310.
- Bush, J.A., Wilson, P.W., 1959. A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 184, 381.
- Camacho, M.I., Alvarez, A.F., Gonzalez Chavez, R., Romeo, T., Merino, E., Georgellis, D., 2015. Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system. *J. Bacteriol.* 197, 983–991.
- Celesnik, H., Deana, A., Belasco, J.G., 2007. Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5'pyrophosphate removal. *Mol. Cell* 27, 79–90.
- Celesnik, H., Deana, A., Belasco, J.G., 2008. Chapter 5 PABLO analysis of RNA: 5'-phosphorylation state and 5'-end mapping. *Methods Enzymol.* Academic Press, pp. 83–98.
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., Espín, G., 2014. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 160, 479–487.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97, 6640–6645.
- Deana, A., Celesnik, H., Belasco, J.G., 2008. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5'pyrophosphate removal. *Nature* 451, 355–358.
- Fellay, R., Frey, J., Krisch, H., 1987. Intersposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52, 147–154.
- Foley, P.L., Hsieh, P.-k., Luciano, D.J., Belasco, J.G., 2015. Specificity and evolutionary conservation of the *Escherichia coli* RNA pyrophosphohydrolase RppH. *J. Biol. Chem.* Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G., 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.* 6, 7.
- Hernandez-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., Espín, G., 2011. Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology* 157, 3014–3023.
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millán, L.F., Espín, G., 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 158, 1953–1963.
- Hockett, K.L., Ionescu, M., Lindow, S.E., 2014. Involvement of *rppH* in Thermoregulation in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 196, 2313–2322.
- Hsieh, J., Richards, P.-k., Liu, Q., Belasco, J.G., 2013. Specificity of *rppH*-dependent RNA degradation in *Bacillus subtilis*. *PNAS* 110, 8864–8869.
- Hui, M.P., Foley, P.L., Belasco, J.G., 2014. Messenger RNA degradation in bacterial cells. *Annu. Rev. Genet.* 48, 537–559.
- Jean-Pierre, F., Perreault, J., Déziel, E., 2015. Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 161, 1889–1896.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, T., Miyata, K.-i., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Kennedy, C., Gamal, R., Humphrey, R., Ramos, J., Brigle, K., Dean, D., 1986. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFRI gene banks. *MGG* 205, 318–325.
- Kujawa, M., Lirski, M., Ziecina, M., Drabinska, J., Modzelan, M., Kraszewska, E., 2017. Nudix-type RNA pyrophosphohydrolase provides homeostasis of virulence factor pyocyanin and functions as a global regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* n/a-n/a.
- Lee, C.-R., Park, Y.-H., Kim, M., Kim, Y.-R., Park, S., Peterkofsky, A., Seok, Y.-J., 2013. Reciprocal regulation of the Autophosphorylation of Enzyme I(Ntr) by Glutamine and α -Ketoglutarate in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 88, 473–485.
- Lee, C.-R., Kim, M., Park, Y.-H., Kim, Y.-R., Seok, Y.-J., 2014. RppH-dependent pyrophosphohydrolysis of mRNAs is regulated by direct interaction with DapF in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42, 12746–12757.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Luciano, D.J., Vasilyev, N., Richards, J., Serganov, A., Belasco, J.G., 2017. A novel RNA phosphorylation state enables 5' end-dependent degradation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 67, 44–54 e46.
- Muriel-Millán, L.F., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya-Pérez, L.P., Castañeda, M., Segura, D., Espín, G., 2015. The unphosphorylated EIIA(Ntr) protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS One* 10, e0117184.
- Muriel-Millán, L.F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., Espín, G., 2017. Unphosphorylated EIIANtr induces clpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* 104, 197–211.
- Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G., Soberón-Chávez, G., 2000. Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J. Bacteriol.* 182, 6550–6556.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., Espín, G., 2008. Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 244–254.
- 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.
- Pflüger-Grau, K., Görke, B., 2010. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol.* 18, 205–214.
- Quiroz-Rocha, E., Bonilla-Badía, F., García-Aguilar, V., López-Pliego, L., Serrano-Román, J., Cocotl-Yañez, M., Guzmán, J., Ahumada-Manuel, C.L., Muriel-Millán, L.F., Castañeda, M., Espín, G., Nuñez, C., 2017. Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 163, 1105–1115.
- Reusch, R.N., Sadoff, H.L., 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 145, 889–895.
- 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.
- Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M.Á., Castañeda, M., Espín, G., Segura, D., 2016. The *gacS*/RsmA signal transduction pathway controls the synthesis of alkylresorcinol lipids that replace membrane phospholipids during encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS One* 11, e0153266.
- 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, 4790–4798.
- Segura, D., Cruz, T., Espín, G., 2003a. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* 179, 437–443.
- Segura, D., Guzmán, J., Espín, G., 2003b. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 159–163.
- Slepecky, R.A., Law, J.H., 1961. Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 82, 37–42.
- Suzuki, K., Wang, X., Weibacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T., 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 5130–5140.
- Takekawa, N., Nishiyama, M., Kaneseki, T., Kanai, T., Atomi, H., Kojima, S., Homma, M., 2015. Sodium-driven energy conversion for flagellar rotation of the earliest divergent hyperthermophilic bacterium. *Sci. Rep.* 5, 12711.
- Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Espín, G., 2017. GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, fw278–fw278.
- Vasilyev, N., Serganov, A., 2015. Structures of RNA complexes with the *Escherichia coli* RNA pyrophosphohydrolase RppH unveil the basis for specific 5'-end-dependent mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 290, 9487–9499.
- Wachter, J., Hill, S.A., 2015. Small transcriptome analysis indicates that the enzyme RppH influences both the quality and quantity of sRNAs in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–7.
- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.-M., Simecka, J.W., Prüß, B.M., Babitzke, P., Romeo, T., 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40, 245–256.
- Wilson, K.J., Sessitsch, A., Corbo, J.C., Giller, K.E., Akkermans, A.D.L., Jefferson, R.A., 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 141, 1691–1705.
- Yakhnin, H., Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., Babitzke, P., 2011. Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by Eo(70) and Eo(S), and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol. Microbiol.* 81, 689–704.
- Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., Babitzke, P., 2013. CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol. Microbiol.* 87, 851–866.