



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Papel de la proteína EIIA^{Ntr} en el mecanismo de regulación de la síntesis de PHB en
Azotobacter vinelandii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

CRISTIAN CAMILO ORTIZ VASCO

TUTORA

Dra. ELDA GUADALUPE ESPÍN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. KATY JUAREZ

Dr. VICTOR BUSTAMANTE

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CUERNAVACA, MORELOS, MAYO 2019



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.

DEDICATORIA

El presente trabajo esta dedicado a mi familia, quienes siempre han sido mi apoyo para cada objetivo que me he propuesto y que en la distancia han sabido acompañarme y aconsejarme para afrontar los retos que llevó realizar este trabajo.

A Arianna por haber encontrado en ella el apoyo, el amor y la motivación en cada día que compartimos y que me permitió crecer tanto personal como profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Guadalupe Espín por su acompañamiento en todo este proceso de aprendizaje y por estar siempre al pendiente y dispuesta a escuchar las opiniones de todos los miembros del grupo de trabajo.

A los integrantes del comité tutorial la Dra. Katy Juarez y el Dr. Victor Bustamante por aportar y contribuir a la realización del presente trabajo.

A todos los miembros del grupo Espín quienes siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos y quienes enriquecieron esta experiencia de formación durante todo este tiempo compartido.

Al jurado conformado por el Dr. Edmundo Calva, Dra. Maria de Lourdes Girard, Dra. Claudia Martínez Anaya, Dra. Susana Brom Klanner y Dr. Ismael Hernandez; por su revisión y comentarios para la realización de este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del IBT y al CONACyT por el apoyo recibido durante mis estudios.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2. ANTECEDENTES | 9 |
| 2.1 SÍNTESIS DE POLIHIDROXIBUTIRATO PHB | 10 |
| 2.2 MECANISMOS DE REGULACIÓN | 11 |
| GEN <i>phbR</i> | 11 |
| SISTEMA GacS/GacA/RsmA | 13 |
| SISTEMA DE FOSFOTRANSFERENCIA ASOCIADO A NITRÓGENO PTS ^{Ntr} | 17 |
| COMPLEJO PROTEOLÍTICO <i>ClpAP</i> FACTOR σ^S | 20 |
| NUDIX HIDROLASAS: PROTEÍNA <i>RppH</i> | 21 |
| 2.3 RESPUESTA “STRINGENT” Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE PHB | 22 |
| 3. HIPÓTESIS | 28 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 28 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 6. METODOLOGÍA | 29 |
| 6.1 Cepas bacterianas, oligonucleótidos y plásmidos empleados | 29 |
| 6.2 Condiciones de crecimiento | 31 |
| 6.3 Evaluación de la producción de PHB | 32 |
| 6.4 Extracción de RNA y RT-qPCR | 33 |
| 6.5 Fusión transcripcional y traduccional del gen <i>phbB</i> | 35 |
| 6.6 Construcción de las mutantes <i>avin02810 (spoT)</i> y <i>avin37060(relA)</i> | 36 |
| 6.7 Construcción de la doble mutante <i>relA/spoT</i> (p)ppGpp ⁰ | 39 |
| 6.8 Construcción doble mutante <i>relA/avin03910 (phbZ1)</i> | 39 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 7.1 Análisis in silico de genes <i>relA/spoT</i> en <i>A. vinelandii</i> | 40 |
| 7.2 Evaluación de la producción de PHB en las mutantes <i>relA</i> , <i>spoT</i> y <i>relA/spoT</i> | 43 |
| 7.3 Evaluación de la expresión de las depolimerasas <i>avin03910</i> , <i>avin33500</i> y <i>avin34710</i> en la cepa UW136 <i>relA</i> | 48 |
| 7.4 Evaluación de la producción de PHB en la mutante <i>rppH/ptsN</i> | 51 |
| 8. CONCLUSIONES | 59 |

9 PERSPECTIVAS 61

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Quiste maduro de <i>A. vinelandii</i> | 10 |
| Figura 2 Síntesis y degradación de PHB..... | 11 |
| Figura 3 Mapa genético <i>phbBAC</i> y gen <i>phbR</i> | 12 |
| Figura 4 Estructura primaria de <i>CsrA/RsmA</i> y <i>RsmE</i> en diferentes organismos..... | 14 |
| Figura 5 Estructura de la proteína <i>RsmE</i> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 15 |
| Figura 6 Mecanismo de regulación de <i>CsrA</i> en <i>E. coli</i> | 17 |
| Figura 7 Organización de los genes que codifican para el sistema PTS^{Ntr} en diferentes <i>Proteobacterias</i> | 18 |
| Figura 8 Modelo de regulación de PHB y AR..... | 21 |
| Figura 9 Fenotipo de producción de PHB en diferentes mutantes de <i>A. vinelandii</i> | 22 |
| Figura 10 Conformación de (p)ppGpp y sustratos empleados para su síntesis..... | 23 |
| Figura 11 Integración de modelos de regulación en el ciclo de PHB en <i>A. vinelandii</i> | 27 |
| Figura 12 Contexto génico <i>avin02810</i> | 40 |
| Figura 13 Dominios conservados proteína <i>avin02810</i> | 42 |
| Figura 14 Contexto génico <i>avin37060</i> | 42 |
| Figura 15 Dominios conservados proteína <i>avin37060</i> | 43 |
| Figura 16 Producción de PHB..... | 44 |
| Figura 17 Cuantificación de PHB..... | 44 |
| Figura 18 Producción de PHB..... | 46 |
| Figura 19 Acumulación de PHB..... | 47 |
| Figura 20 Expresión depolimerasas en la mutante <i>UW136 relA</i> . 4 días de incubación en medio PY..... | 48 |
| Figura 21 Cuantificación PHB..... | 49 |
| Figura 22 Producción de PHB en las diferentes mutantes..... | 50 |
| Figura 23 Curva de acumulación de PHB..... | 51 |
| Figura 24 Producción de PHB..... | 52 |
| Figura 25 A. Producción de PHB..... | 52 |
| Figura 26 Porcentaje de expresión del gen <i>rsmA</i> | 54 |
| Figura 27 Porcentaje de expresión del gen <i>ptsN</i> | 54 |
| Figura 28 Actividad transcripcional de <i>phbB</i> | 55 |
| Figura 29 Actividad traduccional de <i>phbB</i> | 57 |

1. INTRODUCCIÓN

Azotobacter vinelandii es una bacteria del suelo con una importante función en el medio ambiente ya que es capaz de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias; esta bacteria de la familia *Pseudomonadaceae* ha despertado gran interés industrial por su capacidad de sintetizar biopolímeros como el alginato y el polihidroxibutirato (PHB), este último ha sido introducido en la industria como una alternativa al uso de plásticos derivados de petróleo dada su fácil y rápida degradación y su cualidad de ser un compuesto biocompatible; aunque el costo elevado de su producción hace un poco limitado su uso. La biocompatibilidad del PHB ha impulsado su uso en el campo biomédico siendo empleado, entre otras aplicaciones, en válvulas cardíacas, andamios óseos y nano o micro perlas para la administración controlada de fármacos. El PHB en *A. vinelandii*, es almacenado en forma de polímeros de longitud variable dentro de gránulos intracelulares y que funcionarán, en caso de ser necesarios, como fuente de carbono y energía para el metabolismo celular.

El proceso de síntesis de PHB ha sido ampliamente estudiado y los mecanismos de regulación génica involucrados en este proceso son aún objeto de interés en nuestro grupo de investigación. Se ha evidenciado la presencia de diferentes vías que regulan la síntesis de PHB, ya sea por medio de la regulación de la expresión del operón biosintético *phbBAC* o por regulación de su activador transcripcional, la proteína PhbR. Se ha descrito que la proteína GacS del sistema de dos componentes GacS/GacA ante un estímulo aún desconocido se autofosforila y es capaz de activar el regulador de respuesta citoplasmático GacA el cual promueve, entre otros efectos, la síntesis de 8 pequeños RNAs (*rsmZ1-7* y *rsmY*) de los cuales se ha demostrado que RsmZ1 y RsmZ2 se unen a la proteína RsmA y regulan su actividad; RsmA libre actúa como un regulador negativo de la traducción de *phbR* regulando la síntesis de PHB. Por otra parte se demostró que el sistema PTS^{Ntr}; un sistema de fosforelevo similar al empleado para la fosforilación de azúcares en la célula, transfiere un grupo fosfato desde la proteína EI^{Ntr} hacia la proteína NPr y finalmente a la proteína EIIA^{Ntr}, esta última, dependiendo de su estado de fosforilación, regula una amplia variedad de procesos celulares. En *A. vinelandii*, se demostró que EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado promueve la proteólisis del factor sigma RpoS (σ^S); el cual es necesario para la transcripción

de *phbR* y del operón *phbBAC*, adicionalmente se demostró que la proteína EIIA^{Ntr} en estado no fosforilado regula de manera desconocida la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.

Recientemente se demostró que el transcrito de *rsmA* es degradado a través de una vía de degradación de mRNAs en la que participa la pirofosfohidrolasa RppH; la inactivación de *rppH* causó una disminución en la síntesis de PHB esto debido a que se incrementó la estabilidad del transcrito de *rsmA* y la concentración de proteína RsmA. Sorpresivamente se evidenció que una doble mutante *rppH/ptsN* restauraba parcialmente la síntesis de PHB lo cual sugiere una relación entre EIIA^{Ntr} y RsmA.

Lo anterior nos permitió plantearnos interrogantes como: ¿es la proteína EIIA^{Ntr} necesaria para que RsmA pueda actuar como represor de la traducción?, ¿estas dos proteínas interactúan? o si la regulación postranscripcional ejercida por EIIA^{Ntr} es dependiente de RsmA y/o de algún otro mecanismo de señalización intracelular. Teniendo en cuenta este último punto, se realizó una revisión bibliográfica sobre mecanismos de regulación en donde participara EIIA^{Ntr}; se encontró que en la bacteria *Ralstonia eutropha* (modelo del estudio para la producción de PHB), la síntesis y degradación de PHB es controlada por los niveles intracelulares de (p)ppGpp; este segundo mensajero intracelular es sintetizado y degradado por proteínas tipo RSH (Rel Spo Homolog) por su similitud con las proteínas RelA y SpoT de *E. coli*, las cuales tienen actividad sintetasa y sintetasa/hidrolasa de (p)ppGpp respectivamente. En esta bacteria se describió una interacción entre la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado y la proteína SpoT que provoca una pérdida de la actividad hidrolasa de (p)ppGpp y favorece la acumulación de PHB.

Adicionalmente en *E. coli* existe un *link* entre CsrA y los niveles de (p)ppGpp, se demostró que la proteína CsrA interactúa con el transcrito de *relA* y que actúa como un regulador negativo; así mismo, una mutante Δ *csrA* acumuló mayor cantidad de (p)ppGpp durante la respuesta *stringent*. Así mismo, (p)ppGpp activa aproximadamente 10 veces la transcripción de sRNAs *csrB* y *csrC*, los cuales secuestran a la proteína CsrA, por tanto, durante la respuesta *stringent*, los altos niveles de (p)ppGpp antagonizarían los efectos de CsrA y viceversa.

Teniendo en cuenta lo anterior nos proponemos llevar a cabo un estudio que nos permita profundizar en los mecanismos por los cuales la proteína EIIA^{Ntr} controla la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

2. ANTECEDENTES

Las bacterias constituyen un grupo de organismos ampliamente distribuidos en los diferentes ambientes de la biosfera terrestre, se desarrollan bajo condiciones ambientales distintas que pueden variar a lo largo del tiempo, por lo que estas deben ser capaces de resistir y adaptarse a dichos cambios que, en algunas ocasiones, ocurren de manera repentina.

Azotobacter vinelandii pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* género *Azotobacter*, es una proteobacteria de la subdivisión γ , pleomórfica, en su estado vegetativo es móvil gracias a flagelos peritricos y de coloración negativa al teñido de Gram, habitante común del suelo, aerobia estricta, aunque puede desarrollarse en concentraciones bajas de oxígeno. Posee una membrana interna, una capa de peptidoglicano que contiene ácido murámico y mureína y una membrana externa (1).

En el suelo, entorno en el cual se desarrolla, realiza una importante función al fijar el nitrógeno ambiental de forma aerobia, dependiente de la humedad, la disponibilidad de oxígeno y de materia orgánica mediante el uso de tres sistemas de nitrogenasas los cuales dependen estrictamente de los niveles de oxígeno disponibles (2), llegando a ser capaz de fijar hasta 10 mg de N_2 por cada gramo de glucosa consumido; además, posee un complejo sistema que protege dichas nitrogenasas de la inactivación por oxígeno, lo que lo convierte en objeto de estudio dentro de estos procesos.

Otra interesante característica de *A. vinelandii* es su capacidad para formar quistes que resisten la desecación, este mecanismo le permite soportar condiciones ambientales adversas y realizar un proceso de germinación cuando encuentra condiciones más favorables para su desarrollo; este proceso involucra una serie de reacciones enzimáticas, de síntesis y cambios morfológicos en la célula que conllevan a la formación de dos capas: la capa interna (intina) y la capa externa (exina), que protegen el metabolismo en “pausa” que posee la bacteria en estado de enquistamiento (1).

Durante el proceso de enquistamiento, *A. vinelandii* sintetiza compuestos como: el alginato (Alg), polihidroxibutirato (PHB) y alquilresorcinoles (ARs) que forman parte de la estructura del quiste; los alginatos y los AR son componentes fundamentales de la intina y

la exina y el PHB esta presente en forma de numerosos granulos en el citoplasma de los quistes; compuestos como el alginato y el PHB son de interés industrial, ya que se utilizan como agente gelificante y/o espesante y como plástico biodegradable respectivamente.

El polihidroxibutirato (PHB), ha sido introducido en la industria como alternativa para la producción de biopolímeros amigables con el medioambiente gracias a su fácil degradación y a sus características similares a los derivados de polietileno/propileno.

2.1 SÍNTESIS DE POLIHIDROXIBUTIRATO PHB

Ante la problemática mundial que implica la acumulación de desechos plásticos derivados del petróleo de difícil degradación, han surgido nuevas alternativas de compuestos más amigables con el medio ambiente, que han desembocado en el uso de nuevos materiales en la industria, dentro de estos, los polihidroxicanoatos PHA (familia a la cual pertenece el PHB) han tomado un gran peso; estos compuestos son producidos de manera intracelular en algunas bacterias como reserva de carbono y energía.

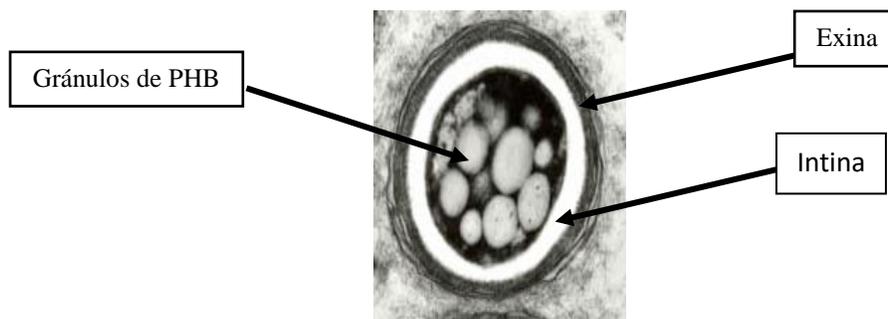


Figura 1 Quiste maduro de *A. vinelandii*.

De manera general los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que mediante acción enzimática condensan el grupo carboxílico de un monómero con un grupo hidroxilo del siguiente formando un enlace tipo éster (3); en *A. vinelandii*, la síntesis de PHB se realiza durante la fase estacionaria (ver figura 2) e inicia con la condensación de dos moléculas de acetilCoA por la acción de la enzima β -cetotiolasa, produciendo acetoacetil-CoA, seguido a ello, la enzima *acetoacetil reductasa* (dependiente de NADPH) lo reduce hasta β -hidroxibutiril-CoA, este producto es el monómero sobre el cual actúa la enzima *PHB sintasa* que polimerizará las cadenas de monómeros (4).

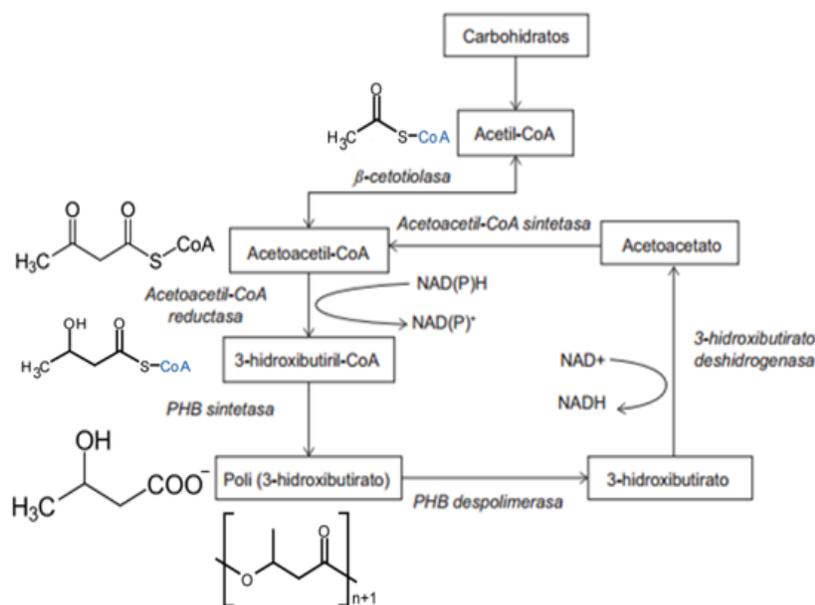


Figura 2 Síntesis y degradación de PHB (4).

En *A. vinelandii*, los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de PHB se encuentran contenidos en el operón *phbBAC*: β-cetotilasa (*phbA*), acetoacetil reductasa (*phbB*) y PHB sintasa (*phbC*) (5).

2.2 MECANISMOS DE REGULACIÓN

GEN *phbR*

Corriente arriba del operón *phbBAC* y en dirección opuesta, se encuentra el gen *phbR*, que codifica la proteína PhbR (figura 3) la cual pertenece a la familia de reguladores *AraC/XylS*; estas proteínas se han encontrado en diferentes organismos procariontes, teniendo en común un dominio conservado de 99 aminoácidos que presenta una estructura hélice-giro-hélice (HTH), se ha propuesto que los residuos presentes en la primera hélice de esta familia de reguladores están asociados con el reconocimiento específico de sus secuencias blanco, mientras que los residuos de la segunda hélice se encuentran más conservados entre especies, lo cual sugiere un papel común, como puede ser la unión a la maquinaria transcripcional. Las secuencias reconocidas por esta familia de reguladores se encuentran cercanas o superpuestas con la región -35 de los promotores de sus genes blanco, por lo que se sugiere que interactúa

directamente con la ARN polimerasa y así regula positivamente (en su gran mayoría) la transcripción de sus genes blanco (6).

Los resultados obtenidos por Peralta-Gil y col. (5), demuestran que una mutación en *phbR* conlleva una disminución en la síntesis de PHB en *A. vinelandii*; se encontró que PhbR actúa como un activador del operón biosintético *phbBAC* y tiene una capacidad de autoregular positivamente su expresión. Este activador reconoce dos secuencias específicas de 18 pb dentro de la región promotora de *phbB* (denominadas como R1 y R2, ver figura 3) (4), pero aún en su ausencia hay expresión del operón dependiente de RpoS. Así mismo, se identificaron dos promotores que sobrelapan en la posición -92 y -115 corriente arriba del codón de inicio ATG del gen *phbB*, los cuales se denominaron P_{B1} y P_{B2}, siendo P_{B1} activado por PhbR y P_{B2} reconocido por el factor sigma de fase estacionaria RpoS (4).

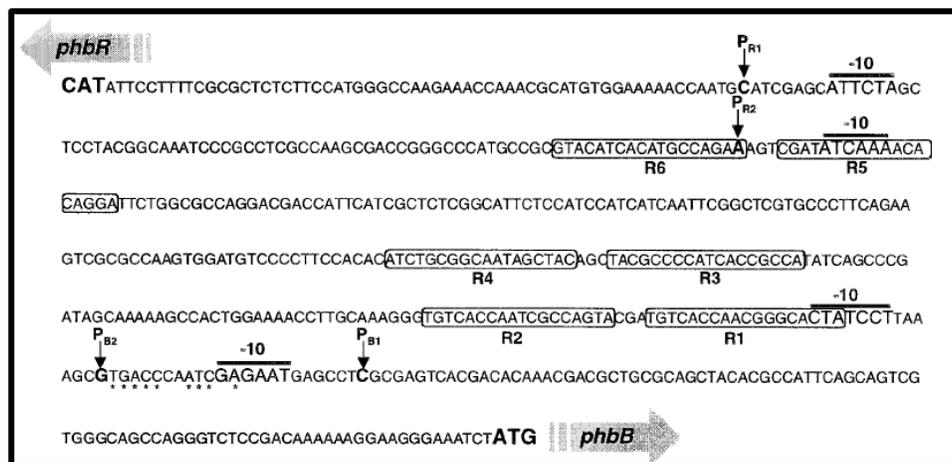


Figura 3 Mapa genético *phbBAC* y gen *phbR*. Tomado de Peralta-Gil y col. (5). Los sitios de inicio de la transcripción están señalados por una flecha y denominados como pB1, pB2, pR1 y pR2. La secuencia -10 esta delineada. Los sitios R1 a R6 son posibles sitios de unión de PhbR

La transcripción del gen *phbR* inicia a partir de dos sitios denominados P_{R1} y P_{R2}. Se demostró que la transcripción desde el sitio P_{R2}, es dependiente de RpoS y se expresa mayoritariamente en fase estacionaria aunque se desconoce si esta activación ocurre de manera directa o indirecta. Hernandez-Eligio y col. (4) demostraron que *phbR* autoregula de manera positiva su transcripción y proponen que esta regulación puede ser de manera indirecta o por unión de PhbR a algún otro metabolito debido a que PhbR por si sola, es incapaz de unirse a los sitios R5 y R6 ubicados corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción P_{R1}.

SISTEMA GacS/GacA/RsmA

En conjunto, las proteínas GacS/GacA (homologas a BarA/UvrY de *E. coli*) han sido descritas como un sistema de dos componentes ampliamente distribuido en bacterias Gram Negativas; la quinasa sensora (GacS) contiene en su región N-terminal (dominio sensor) dos dominios transmembranales separados por un *loop* dirigido al espacio periplásmico; posee un dominio de unión el se ubica cerca al segundo dominio transmembrana y el cual se ha propuesto que interactúa con las diferentes señales que activan su autofosforilación. En su extremo C-terminal citoplasmático, tiene la capacidad de autofosforilarse en un residuo de Histidina (H1) (Histidin-quinasa), de allí, el fosfato es transferido hasta un segundo residuo de histidina (H2) en el dominio Hpt, el cual actúa como segundo transmisor y transfiere el fosfato hacia el regulador de respuesta GacA (7).

La proteína GacA es un regulador de respuesta citoplasmático; en su región N-terminal (aminoácidos 1 al 148) posee un dominio de respuesta del cual reconoce GacS y promueve que la Asp54 se fosforile; así mismo, desde el aminoácido 149 hasta el extremo C-terminal tiene un dominio con estructura de hélice-giro-hélice, el cual determina la especificidad del reconocimiento de promotores y la unión a la maquinaria de transcripción; se ha descrito que en dependencia de su estado de fosforilación puede actuar como activador o represor transcripcional en diferentes especies (7).

En *A. vinelandii* GacS/GacA actúa como un sistema de regulación de la síntesis de PHB, debido a que, entre otros efectos, activa la transcripción *sRNAs* (small RNAs) no codificantes, nombrados como Rsm (Regulator of secondary metabolism) Z del 1 al 7 y RsmY; de estos *sRNAs* se ha demostrado que RsmZ 1 y 2 se unen a la proteína RsmA e inhiben su actividad de represor de la traducción (8).

La proteína RsmA es un homólogo de la proteína CsrA (Carbon storage regulator) descrita en *E. coli* y en otras γ -proteobacterias (ver figura 4), estas proteínas actúan como reguladores postranscripcionales globales de una gran variedad de genes involucrados en la función del metabolismo en fase estacionaria, mantenimiento de las propiedades fisiológicas fundamentales de la célula, expresión de diversos factores de virulencia, entre otros (9).

RsmA y CsrA presentan una estructura idéntica, compuesta por un dímero, con igual número de subunidades que comprenden un tándem de 5 hojas β , una pequeña α -hélice y un extremo C-terminal flexible, la interacción entre las hojas β de los dos monómeros crea un core hidrofóbico con los extremos C-terminal y α -hélices hacia el exterior de la proteína (9). La interacción de esta proteína con su RNA blanco esta facilitada por los residuos de los aminoácidos presentes en las hojas $\beta 1$ y $\beta 5$. El estudio de los sitios de reconocimiento para CsrA, demostró que son secuencias de ARNm ricas en motivos GGA (secuencia más conservada CAGGA(U/A/C)G) la cual es similar a la secuencia de Shine-Delgarno (RBS); los cambios conformacionales generados por la interacción de CsrA con el RNAm provocan inhibición de la unión del ribosoma, reprimiendo así la traducción (10).

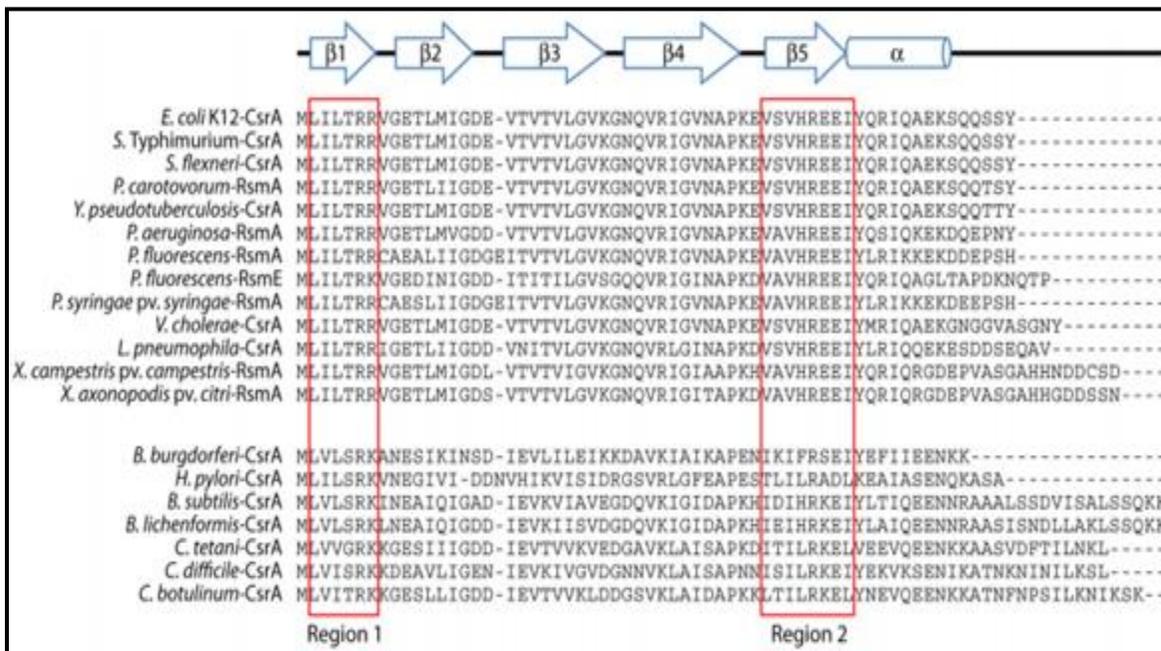


Figura 4 Estructura primaria de CsrA/RsmA y RsmE en diferentes organismos. En las cajas rojas se encuentran los residuos importantes para la unión al RNAm (9).

Anja Brencic y Stephen Lory en 2009 (11) realizaron un estudio del regulón RsmA en *P. aeruginosa* cepa PAK, en el cual demostraron que cerca de 500 genes son regulados por este mecanismo; una tercera parte de los transcritos de estos genes disminuyeron en una mutante *rsmA* y el resto de ellos aumentaron su expresión; por tanto, los efectos de regulación ejercidos por RsmA pueden tanto activar como inhibir la traducción, así mismo, RsmA puede actuar a nivel transcripcional, como en el caso del operón *pgaABCD* en *E. coli*, el cual es

necesario para la síntesis y excreción de una adhesina de polisacáridos en las biopelículas; allí, la unión de CsrA al extremo 5' de *pgaA* inhibe su traducción y el cambio conformacional generado expone una región reconocida por la proteína Rho la cual impide la elongación de la cadena naciente de RNA, regulando así la transcripción del operón. (9)(12).

La regulación de los sistemas CsrA/RsmA esta mediada por la presencia de sRNAs, CsrB/C en *E. coli* y RsmX/Y/Z u homólogos en otros organismos como *Pseudomonas spp.* En *A. vinelandii* al igual que en otras especies, estos sRNAs presentan varias copias del motivo GGA los cuales son reconocidos por la proteína CsrA/RsmA y le permiten competir con los sitios de unión presentes en los mRNAs, de esta forma se titula la proteína y constituye un mecanismo por el cual se regula su actividad (ver figura 5) (11).

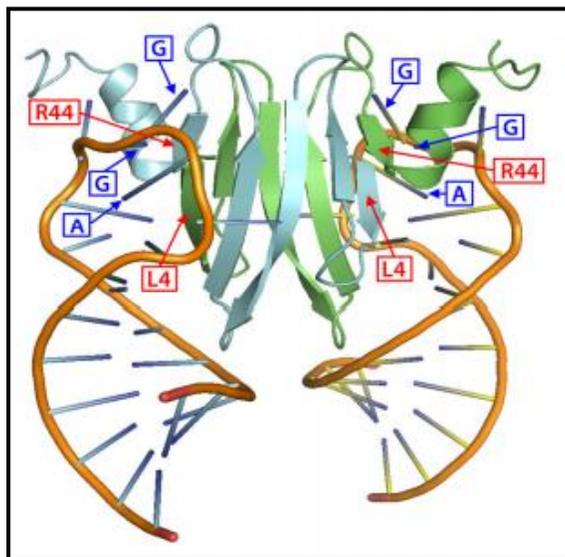


Figura 5 Estructura de la proteína RsmE de *Pseudomonas fluorescens*. Péptidos individuales cian y verde. Interacción con un esqueleto ribosa-fosfato (naranja) de 20 nucleótidos de RNA-*hcnA*. Las cajas rojas indican los residuos críticos de RsmE y en las cajas azules los motivos GGA de reconocimiento (9).

Los sRNAs producidos por las especies de *Pseudomonas*, difieren de los empleados por *E. coli* o *Salmonella* en varias características tales como: la longitud, siendo más cortos en promedio los de *Pseudomonas spp* (aproximadamente 184 nt); el número de sitios de unión para RsmA, en promedio la mitad o un tercio de los de *E. coli* (18-22 para CsrB) y el tiempo de vida media; esta última característica, difiere entre sRNAs de *Pseudomonas* (y especies relacionadas como *A. vinelandii*) en las cuales tienen un tiempo de vida medio de entre 20-

60 minutos comparado con los 1.7 minutos de CsrB en *E. coli*, esta diferencia es atribuible a un mecanismo de degradación presente en *E. coli*, mediado por la proteína CsrD (ver figura 6) y que emplea la RNasa E para degradar sRNAs (13); CsrD u homólogos no han sido descritos en *Pseudomonas* ni en *A. vinelandii*, de allí que poco se conozca del mecanismo de degradación de sRNAs en estas bacterias.

En *A. vinelandii*, la proteína RsmA actúa como un regulador negativo de la traducción del gen *phbR* y es regulada por los sRNAs (RsmZ 1 y 2) los cuales permiten la liberación de la represión del mRNA de *phbR* y su traducción; bajo condiciones de síntesis de PHB, la proteína GacA estimula la transcripción de *rsmZ* y *rsmY*, lo cual posibilita la traducción de *phbR* y la activación del operón biosintético *phbBAC* (8) (14).

En la figura 6 se describe la red de regulación del sistema CsrA en *E. coli* y su interacción con otros sistemas. Se ha demostrado que existe un tipo de regulación cruzada entre la respuesta estricta (ejercida por (p)ppGpp) y el sistema CsrA; la proteína CsrA reconoce el transcrito de *relA* (sintetasa de (p)ppGpp) e inhibe su traducción, a su vez, (p)ppGpp promueve la síntesis de sRNAs CsrB/C los cuales titulan y regulan la actividad de CsrA, este mecanismo controla la expresión y/o represión de diferentes genes, como por ejemplo *glgC* y *flhDC*. Por otra parte, se ha demostrado que las RNA helicasas DeaD y SrmB promueven la traducción de *uvrY* y los niveles de CsrB/C respectivamente, se propone que esta actividad esta relacionada con la respuesta a estrés por bajas temperaturas y condiciones en las cuales la célula disminuye su capacidad de síntesis de proteínas (10).

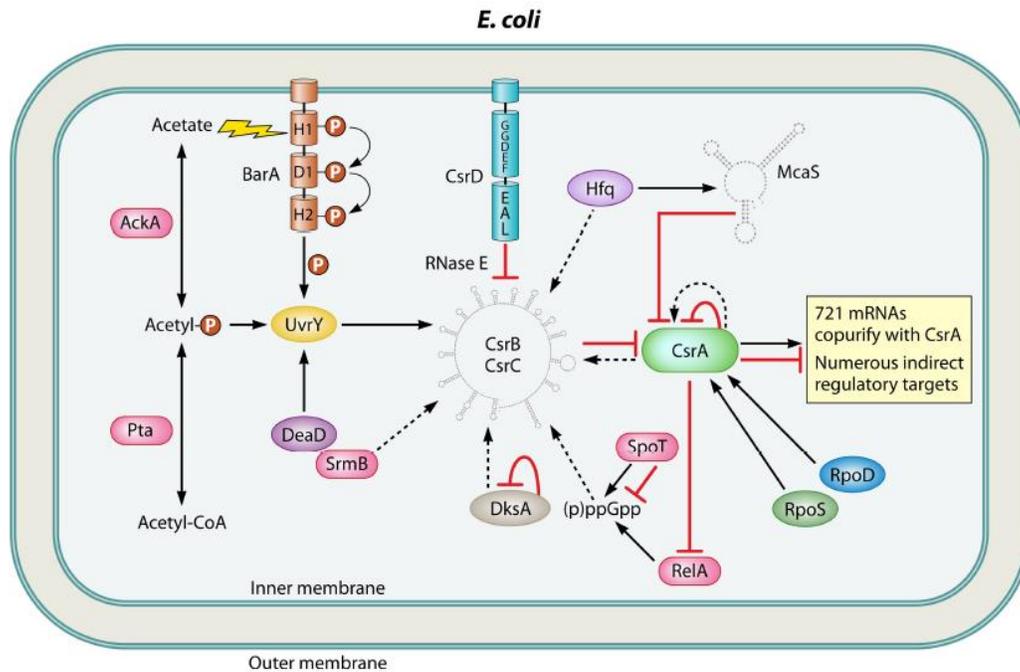


Figura 6 Mecanismo de regulación de CsrA en *E. coli*. Tomado de Vakulskas, C. y col. (10).

SISTEMA DE FOSFOTRANSFERENCIA ASOCIADO A NITRÓGENO PTS^{Ntr}

El sistema de fosfotransferencia asociado a Nitrógeno (PTS^{Ntr}) es un sistema similar al sistema PTS de azúcares que es responsable del transporte y la fosforilación de los carbohidratos que ingresarán a las rutas metabólicas de la célula; en el proceso de fosforilación de azúcares, el sistema PTS utiliza el Fosfoenolpiruvato (PEP) como donador inicial del grupo fosfato y activa una cascada de transferencia entre las proteínas EI, una proteína de histidina Hpr y la proteína EIIA, esta última presenta especificidad por ciertos carbohidratos, por tanto una misma célula presenta varios complejos EIIA que interactúan con su debido sustrato (azúcar) para transferir el grupo fosfato. El estado de fosforilación de estas proteínas modula la respuesta celular a las diferentes fuentes de carbono disponibles (15).

Paralelo al sistema PTS, muchas Proteobacterias poseen el sistema PTS^{Ntr} (ver figura 7), a excepción de la subdivisión-ε, esta conservación sugiere un rol importante en la fisiología celular; este sistema, no interviene en el proceso de transporte de azúcares pero si ejerce un papel regulador de varios procesos celulares. La cascada de fosforelevo consta de las

proteínas EI^{Ntr} , Npr y $EIIA^{Ntr}$, fue descrito inicialmente en *E. coli* y se describió como ancestro común al operón *rpoN* de *Desulfuromonas acetoxidans*. Las diferentes especies que expresan PTS^{Ntr} han diversificado el operón ancestral como se evidencia en la figura 7 (16).

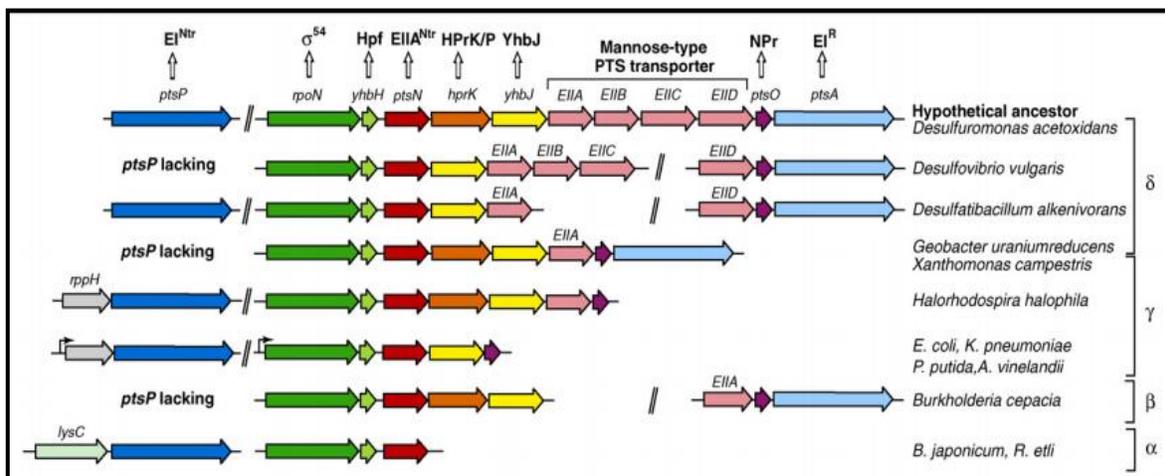


Figura 7 Organización de los genes que codifican para el sistema PTS^{Ntr} en diferentes proteobacterias. (16)

Estructuralmente las proteínas EI^{Ntr} y Npr son muy similares a EI y Hpr del sistema PTS , sin embargo, la proteína $EIIA^{Ntr}$ presenta diferencias con su homóloga del sistema PTS de carbohidratos, aunque las dos comparten un residuo de histidina en el sitio de interacción con Npr/Hpr el cual une el grupo fosfato, la proteína $EIIA^{Ntr}$ no tiene el segundo residuo de Histidina el cual es responsable de la transferencia a $EIIB$ y permite la fosforilación de azúcares; adicionalmente, no se ha encontrado un aceptor final del grupo fosfato para el sistema PTS^{Ntr} , por lo que se propone que su mecanismo de acción esta asociado al estado de fosforilación de sus proteínas y no a una activación/inactivación por transferencia del grupo fosfato hacia un aceptor final (16).

En *A. vinelandii*, se ha demostrado que el sistema PTS^{Ntr} está involucrado en la regulación de la síntesis de PHB y alquilresorcinoles (AR). Una mutación en el gen *ptsP* (EI), genera una disminución en la síntesis de PHB al igual que lo observado en una mutante en el gen *ptsO* (Npr), de manera opuesta, una mutación en *ptsN* ($EIIA^{Ntr}$) aumenta la síntesis de PHB. Hernandez-Eligio en su tesis de maestría (2007), demostró que una mutación H68A en la proteína $EIIA^{Ntr}$ la cual inhibe su fosforilación, provocaba una disminución en la producción de PHB, lo cual evidencia que el estado no fosforilado de esta proteína regula negativamente

la producción de PHB. En *A. vinelandii* la proteína EIIA^{Ntr} en estado no fosforilado, activa de manera desconocida la degradación del factor sigma RpoS a través del complejo protéico ClpAP, lo cual disminuye la transcripción de *phbR* (8) (17).

La importancia de la proteína EIIA^{Ntr} como reguladora de diferentes procesos y en diferentes especies ha sido estudiada, por ejemplo, en *Salmonella typhimurium*, el estudio del transcriptoma de una cepa mutante en *ptsN* demostró que el 3.5% de los genes son regulados por EIIA^{Ntr}, entre ellos el regulador transcripcional HilD el cual aumenta su estabilidad lo que conlleva a un aumento en la capacidad invasiva de esta cepa (18). Así mismo, en *E. coli* la proteína EIIA^{Ntr} regula la homeostasis de K⁺ a través de la interacción con la quinasa sensora KdpD del sistema de dos componentes KdpD/KdpE (19); se demostró también que la proteína EIIA^{Ntr} controla la selectividad de los factores sigma σ^S ó σ^{70} a través de la regulación de los niveles intracelulares de K⁺ (20).

En *P. putida* se encontró que la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado únicamente se detecta en fase exponencial del crecimiento mientras que la forma fosforilada está presente durante la fase exponencial y se acumula mayoritariamente en la fase estacionaria, lo cual indica que el estado fisiológico de la célula determina el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} y a su vez la represión o expresión de los genes que regula (16). En *Ralstonia eutropha* H16, especie productora de PHB, se demostró que la proteína EIIA^{Ntr} interactúa, únicamente en su estado no fosforilado, con la enzima SpoT1, la cual tiene actividad de sintetasa/hidrolasa de (p)ppGpp y es fundamental en la respuesta a diferentes condiciones de estrés metabólico (21).

Interesantemente en *E. coli* se describió que la proteína EIIA^{Glc} en estado no fosforilado, participa en la degradación de los sRNAs CsrB/CsrC a través de la unión al dominio EAL de la proteína CsrD, lo cual facilita el reconocimiento de los sRNAs y permite la acción de la RNasa E; por tanto se propone que la proteína EIIA^{Glc} responde a las condiciones nutricionales de la célula y regula indirectamente a la proteína CsrA a través de la degradación de los sRNAs (CsrB/CsrC) (13); en *A. vinelandii*, no se ha descrito una proteína homóloga a CsrD y el mecanismo de degradación/regulación de sRNAs aún es desconocido, pero estos resultados nos permiten hipotetizar que la proteína EIIA^{Ntr} (en *A. vinelandii* no

presenta EIIA^{Glc}) podría estar implicada en la regulación de RsmZ/RsmY (homólogos de CsrB/CsrC), regulando indirectamente la expresión de los genes dependientes de RsmA.

Adan Trejo y col. (22), recientemente describieron la importancia de la proteína GacA en la activación de la fosforilación del sistema PTS^{Ntr} y su impacto en la capacidad de *A. vinelandii* de producir quistes; se encontró que en una mutante en *gacA*, la proteína EIIA^{Ntr} se encontraba únicamente en estado no fosforilado lo cual inhibía su capacidad de formar quistes; así mismo, se encontró que esta mutación regula la producción de PHB presumiblemente de manera indirecta a través de la degradación de RpoS por el sistema ClpAP.

Estos estudios muestran algunas de las funciones que tiene la proteína EIIA^{Ntr} en diferentes procesos y especies bacterianas, lo cual convierte a esta proteína en un factor relevante de estudio en las vías de regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

COMPLEJO PROTEOLÍTICO *ClpAP* FACTOR σ^S

El complejo proteico *ClpAP* de *A. vinelandii*, es un homólogo del complejo *ClpXP* descrito en *E. coli*, el cual actúa como un sistema chaperona serin-proteasa dependiente de ATP; este sistema de regulación fue estudiado en *A. vinelandii*, donde se vio asociado a la degradación del factor sigma RpoS en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} sin fosforilar. El complejo *ClpAP* está conformado por la chaperona *ClpA*, que reconoce y transloca el sustrato hacia la proteasa *ClpP* (8) (23).

Muriel-Millan y col. (23), demostraron que una mutación en *clpA* o *clpP* en el fondo de una mutante *ptsP* (EIIA^{Ntr} sin fosforilar) restauraba la transcripción y traducción del factor RpoS, pero solo recuperaba parcialmente la producción de PHB comparado con la cepa silvestre, demostraron que estas mutaciones restauraban a nivel transcripcional la expresión de *phbR* y *phbB* pero no así a nivel traduccional, por tanto, concluyeron que la proteína EIIA^{Ntr} sin fosforilar, tiene un efecto negativo a nivel postranscripcional sobre los genes *phbBAC* (ver figura 8). El mecanismo por el cual la proteína EIIA^{Ntr} regula postranscripcionalmente la síntesis de PHB es objeto de estudio.

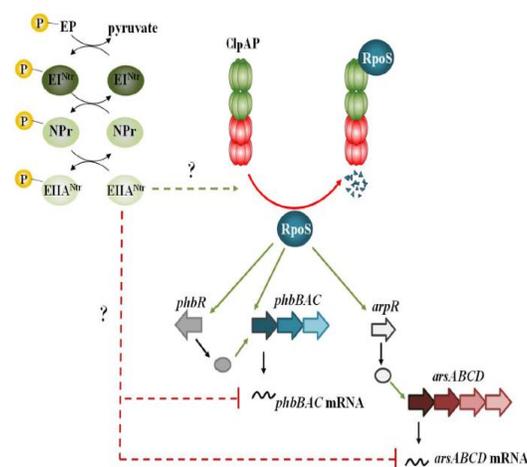


Figura 8 Modelo de regulación de PHB y AR, efecto de la proteína EIIA^{Ntr} sin fosforilar sobre el sistema RpoS a través del complejo ClpAP (23).

NUDIX HIDROLASAS: PROTEÍNA RppH

En *A. vinelandii*, corriente arriba del gen *ptsP* (proteína EI^{Ntr}) y orientado en la misma dirección, está presente el gen *rppH*, que codifica para la enzima RppH de la familia Nudix hidrolasas; en conjunto, *rppH* y *ptsP* conforman un operón que regula la síntesis de PHB. Las proteínas de la familia Nudix, son por lo general pirofosfohidrolasas, que actúan sobre sustratos con estructura NDP-X (Nucleósido Difosfato unido a un motivo X) como nucleósidos di-tri fosfatos, alcoholes y azúcares unidos a nucleótidos, dinucleósidos polifosfatos, entre otros. En *E. coli*, se demostró que la proteína RppH hidroliza el extremo 5' trifosfato de mRNAs, convirtiéndolo en 5' monofosfato permitiendo que la RNasa E pueda unirse a ellos y degradarlos (24) (25).

En *A. vinelandii* se demostró que una mutación en el gen *rppH* reducía claramente la síntesis de PHB (colonias más opacas que la cepa silvestre en medio PY sacarosa); se estableció que esto es consecuencia de un aumento en la estabilidad del transcrito de *rsmA*; por lo tanto, se propuso que RppH regula los niveles del transcrito de *rsmA*, facilitando su degradación y en su ausencia los niveles aumentados de la proteína RsmA inhiben la traducción del gen *phbR* (40). Estos resultados permitieron concluir que la proteína RppH regula la producción de PHB de manera indirecta y a nivel postranscripcional.

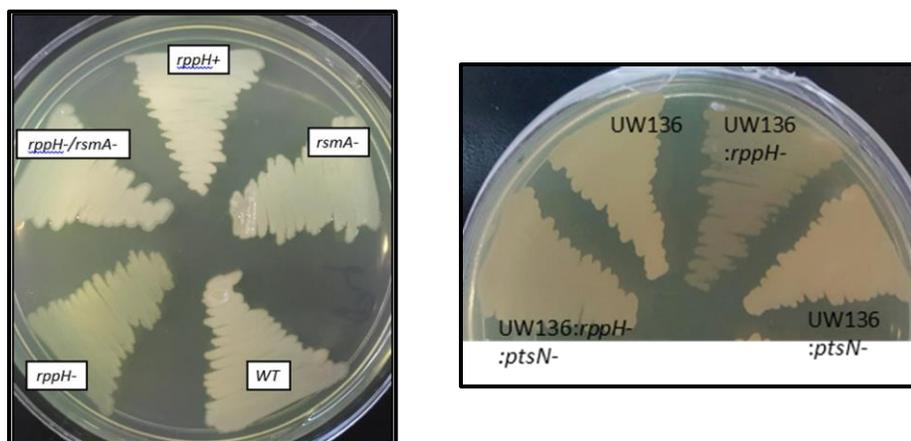


Figura 9 Fenotipo de producción de PHB en diferentes mutantes de *A. vinelandii*. Partiendo de la cepa silvestre UW136. Disminución de la producción en mutante *rppH* (40).

Tal como se evidencia en la figura 9, una mutación en el gen *rppH* reduce significativamente la síntesis de PHB y como es de esperarse una doble mutante *rppH/rsmA* restaura la síntesis de PHB. Interesantemente una mutación en *ptsN* en el fondo de una mutante *rppH* restaura parcialmente la síntesis de PHB; este resultado nos sugiere que, la proteína EIIA^{Ntr}, participa en el mecanismo de regulación que ejerce la proteína RsmA sobre la síntesis de PHB.

2.3 RESPUESTA “STRINGENT” Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE PHB

La alarmona (p)ppGpp (guanosina tetra o pentafofato) forma parte de la familia de segundos mensajeros intracelulares, fue descrita inicialmente en cepas de *E. coli* expuestas a condiciones de privación de aminoácidos las cuales evidenciaban una disminución en la síntesis de RNAs estables como el ribosomal o el de transferencia. El creciente estudio del papel de esta alarmona en la respuesta a condiciones nutricionales adversas tanto en bacterias como en cloroplastos ha revelado que (p)ppGpp regula una amplia variedad de procesos celulares como la replicación del ADN, la transcripción, traducción, el ensamblaje de ribosomas y el metabolismo celular; su mecanismo de acción por lo general es por interacción directa con la RNA polimerasa o facilitado por reguladores transcripcionales como DksA; aunque no existe un dominio común de unión a de (p)ppGpp en los promotores, se le ha atribuido un amplio espectro de blancos de regulación (26). En la figura 10 se representa la conformación de la alarmona (p)ppGpp y los sustratos empleados para su síntesis por parte de las proteínas RelA/SpoT.

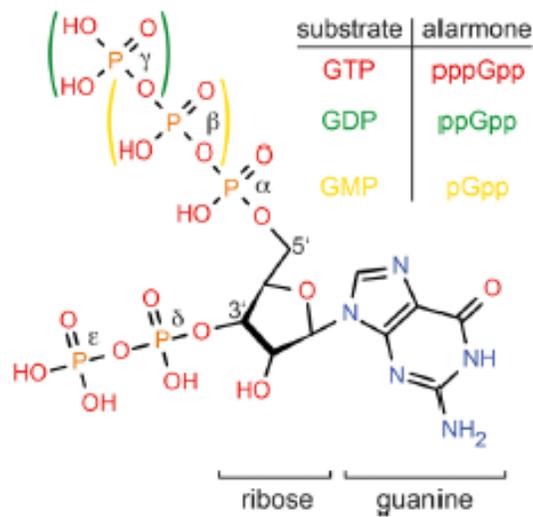


Figura 10 Conformación de (p)ppGpp y sustratos empleados para su síntesis. Tomado de Steinchen y col., (26).

La secuenciación de genomas de bacterias y de cloroplastos ha revelado la presencia de uno o más genes que codifican para sintetasa/hidrolasa de (p)ppGpp, denominadas de manera general como proteínas RSH (Rel Spo Homolog) por su similitud con las proteínas RelA y SpoT de *E. coli*, donde tienen actividad sintetasa y sintetasa/hidrolasa respectivamente (27). La actividad sintetasa de las proteínas RSH está definida por la presencia de un dominio *Syn* con regiones estructurales muy conservadas entre distintas especies (26) las cuales se encargan de la fosfotransferencia desde el ATP hacia el GDP y GTP para la síntesis de ppGpp y pppGpp respectivamente.

Las proteínas RelA, presentan exclusivamente actividad sintetasa, forman parte del grupo de sintetasa tipo RSH largas, presentes en bacterias y que constan de dos dominios definidos que las diferencian de las sintetasa cortas (SAS); dichos dominios, se dividen en catalítico (RSH-NTD) y dominio carboxilo terminal (RSH-CTD), el primero está conformado por dos diferentes regiones, la región con actividad hidrolasa (HD) y la región con actividad sintetasa (Syn). En las proteínas RelA se ha observado que los dominios HD han perdido su actividad por ausencia de los motivos catalíticos necesarios para la hidrólisis de (p)ppGpp (26). El extremo carboxilo presenta una serie de 4 dominios los cuales están relacionados con la interacción y unión a otras proteínas; se ha demostrado que la actividad de RelA es

estimulada en respuesta a la presencia de tRNAs no cargados en el sitio A del ribosoma, la interacción RelA-ribosoma esta mediada por el extremo carboxilo.

Por otra parte, existen proteínas que tienen activos los dos sitios catalíticos del extremo N-terminal, por tanto tienen actividad de sintetasa e hidrolasa, estas proteínas se denominan SpoT, se ha demostrado que *in vitro*, estas proteínas presentan una menor actividad sintetasa que la proteína RelA. La actividad hidrolítica de SpoT es dependiente de manganeso y el mecanismo más aceptado por el cual realiza su actividad es la remoción de los fosfatos unidos al extremo 3' de la ribosa; estructuras de cristalografía han definido una distancia de aproximadamente 30 Å entre los dos dominios (HD y *Syn*), por tanto se ha propuesto que el mecanismo de regulación involucra la unión específica del ligando en cada uno de los dominios inhibiendo la actividad del otro (26).

El reconocimiento de señales por medio de estas proteínas y de sus interacciones son claves para generar una respuesta denominada *stringent* o estricta en condiciones de estrés; aunque el mecanismo más estudiado es la detección de tRNA sin cargar a través de la proteína RelA, se ha demostrado que algunos tipos de señales como la falta de ácidos grasos, de fosfatos, de carbono, de hierro, el choque térmico o la presencia de detergentes son reconocidos por las proteínas SpoT e inducen su actividad sintetasa de (p)ppGpp (27).

El principal mecanismo de degradación de (p)ppGpp está dado por la actividad hidrolítica de las proteínas SpoT, aunque se ha demostrado también que algunas proteínas de la familia Nudix pueden estar participando en este proceso; como las proteínas Nudix (AtNUDX 11, 15, 25 y 26) en *Arabidopsis* que hidrolizan (p)ppGpp dependiente de magnesio ó manganeso (28). Así mismo, Takushi Ooga y colaboradores en 2009, demostraron que la proteína Nudix 8 (Ndx8) de *Thermus thermophilus* degradaba (p)ppGpp hasta su forma pGp y concluyen que existe una relación significativa *in vivo* entre Ndx8 y los niveles de (p)ppGpp (29).

En bacterias productoras de PHAs se ha estudiado la relación entre los niveles de (p)ppGpp y la producción y/o degradación de PHAs; en este sentido, Jimena Ruiz y col., en 2001 evaluaron la degradación de polihidroxialcanoatos bajo condiciones de estrés en *Pseudomonas oleovorans*, se empleó la cepa silvestre y una mutante Δ *phaZ* (PHA

depolimerasa), los cultivos fueron sometidos a condiciones de estrés fisiológico: *heat shock* y medio con 20% de etanol y se observó que la cepa silvestre sobrevivía mejor a estas condiciones; así mismo, cuantificaron los niveles intracelulares de (p)ppGpp y ATP, y se encontró que en el momento de degradación de PHA existía un aumento en la concentración de (p)ppGpp, lo cual sugirió que la acumulación de (p)ppGpp es necesaria para la degradación de PHA y que esta ayuda a la supervivencia de la bacteria en condiciones de estrés fisiológico (30).

En *Pseudomonas putida* KT2440 se evaluó la capacidad de sintetizar PHAs en cepas mutantes en *relA/spoT*; bajo condiciones de privación de nitrógeno, la cepa silvestre acumuló menor cantidad de PHA que la mutante *relA/spoT*. Interesantemente, se realizó un estudio de *RNA-seq* de esta mutante en el cual no se presentaron cambios significativos en los genes involucrados en la síntesis/degradación de PHA en fase exponencial y estacionaria, también se observó que el gen *rpoS* no aumentaba su transcripción en la fase estacionaria ni en condiciones de estrés en la mutante *relA/spoT*, por tanto se concluyó que (p)ppGpp está relacionado con activación de la transcripción de *rpoS*, lo cual sugiere que *rpoS* es regulado positivamente por (p)ppGpp. También se observó que genes que codifican para proteínas asociadas al granulo PhaF y PhaI aumentan su expresión en la cepa *relA/spoT*, por tanto concluyen que estos genes son regulados negativamente por (p)ppGpp (31).

Uno de los modelos de estudio para la producción de PHB es *Ralstonia eutropha* H16, en este organismo se demostró que la ausencia de (p)ppGpp conduce a una mayor degradación de PHB; una mutante *spoT2* (sintetasa) acumuló cantidades similares de PHB comparado con la cepa silvestre, por el contrario una doble mutante *spoT1* (sintetasa/hidrolasa)/*spoT2* sintetiza en fase exponencial cantidades similares de PHB comparada con la cepa silvestre, pero durante la fase estacionaria tiene una actividad aumentada de degradación del polímero; la complementación de la doble mutante con una copia de *spoT2* acumuló una mayor cantidad de PHB en todas las fases de crecimiento en comparación con la cepa silvestre. Los autores proponen que ante un marcado aumento en la concentración de (p)ppGpp la degradación de PHB esta disminuida y esto lo confirman por el fenotipo de la doble mutante (p)ppGpp⁰, donde la movilización esta potenciada, sin embargo existe controversia dado que

en la cepa silvestre la movilización de PHB ocurre en la fase estacionaria tardía donde los niveles de (p)ppGpp son más altos, por ello proponen que se debe estudiar el comportamiento de todas las depolimerasas para comprender mejor el mecanismo de regulación de la movilización de PHB en estas mutantes (32).

Katja Karstens y col. describieron en *Ralstonia eutropha* H16 una interacción entre la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado y la proteína SpoT1; los autores proponen que durante la síntesis de PHB, la proteína EIIA^{Ntr} se acumula en su estado no fosforilado lo que favorece la interacción con SpoT1 y conlleva a la inhibición de la actividad de hidrolasa de (p)ppGpp. La pérdida de la actividad hidrolasa de SpoT1 podría explicar porque una mutante en EI y Hpr pierde la capacidad de síntesis de PHB; bajo estas condiciones, EIIA^{Ntr} estaría totalmente en estado no fosforilado por tanto no hay degradación de (p)ppGpp lo que generaría su acumulación y favorecería la rápida degradación de PHB (21).

En *E. coli* existe un *link* entre el sistema CsrA y la respuesta *stringent*. Los transcritos de *relA*, *spoT* y *dksA* copurifican con la proteína CsrA y con mayor afinidad por el transcrito de *relA*; así mismo, una mutante *csrA* acumuló mayor cantidad de (p)ppGpp durante la respuesta *stringent*. El mayor efecto observado es que (p)ppGpp activa aproximadamente 10 veces la transcripción de sRNAs *csrB* y *csrC*, los cuales secuestran a la proteína CsrA, por tanto, durante la respuesta *stringent*, los altos niveles de (p)ppGpp antagonizarían los efectos de CsrA y viceversa: CsrA regula de manera negativa la expresión de *relA*. Curiosamente, el mRNA de la proteína Gpp la cual convierte pppGpp a ppGpp copurifica con CsrA y la mutante *csrA* acumula mayor cantidad de pppGpp aunque se desconocen las diferencias fisiológicas que esto implica. Se demostró que aproximadamente el 40% de los transcritos de los genes que copurifican con CsrA responden a los niveles de (p)ppGpp, por tanto los autores proponen que estos sistemas forman un modelo compuesto de regulación por el cual, por ejemplo, el gen *flhDC* que codifica un factor de transcripción que activa la motilidad y quimiotaxis de *E. coli* es activado por CsrA y reprimido por (p)ppGpp (33).

2.5 INTEGRACIÓN DE LOS MODELOS DE REGULACIÓN

Los antecedentes expuestos anteriormente presentan evidencias de que existe una relación entre los reguladores RsmA y EIIA^{Ntr}, así como de estos con los niveles intracelulares de (p)ppGpp y las proteínas de tipo RelA/SpoT. Como se muestra en la figura 11, el ciclo del PHB integra diferentes mecanismos de regulación que incluyen a las proteínas RsmA y EIIA^{Ntr}, estos mecanismos pueden estar relacionados por diferentes vías como: el control de la expresión de *relA* regulada por la proteína RsmA como se ha descrito anteriormente, lo cual regularía los niveles intracelulares de (p)ppGpp, a su vez este último regularía de manera negativa la actividad de RsmA al promover la transcripción de los sRNAs RsmZ/Y. Por otra parte, la proteína EIIA^{Ntr} podría regular la degradación de (p)ppGpp a través de la interacción con SpoT como se describió en *Ralstonia eutropha*, aunque este pudiera no ser el único mecanismo de degradación de (p)ppGpp ya que se ha demostrado en algunos organismos que proteínas de la familia Nudix hidrolasas (a la cual pertenece RppH) tienen actividad sobre (p)ppGpp y lo degradan hasta su forma pGp. Cómo se integran estas rutas en *A. vinelandii* y su importancia en el ciclo de producción/degradación de PHB son aún objeto de estudio.

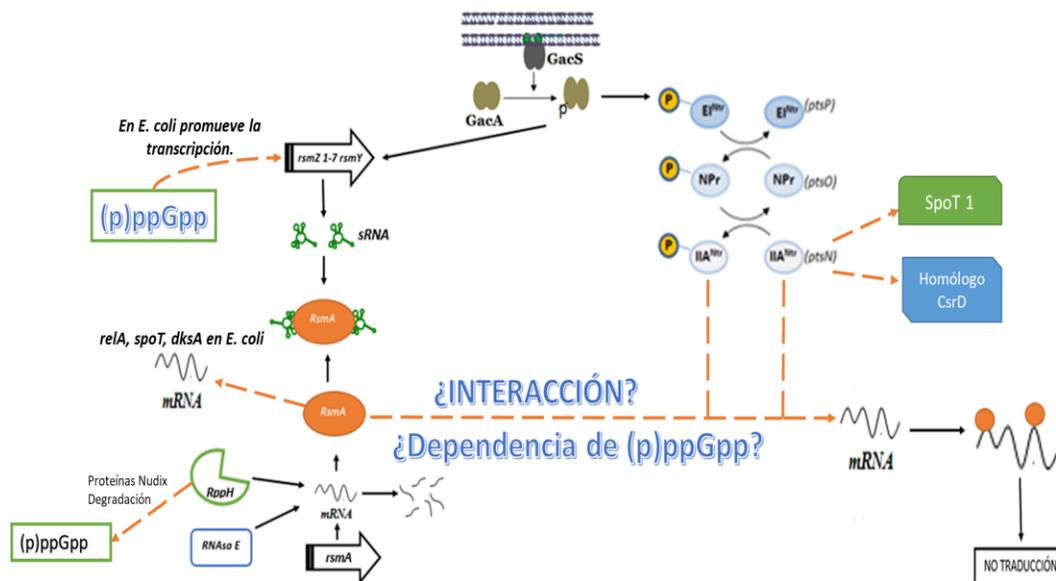


Figura 11 Integración de modelos de regulación en el ciclo de PHB en *A. vinelandii*. Las líneas punteadas indican interacciones o relaciones hipotéticas.

3. HIPÓTESIS

La proteína EIIA^{Ntr} participa en el mecanismo por el cual RsmA ejerce como represor de la traducción de genes de la síntesis de PHB y su coregulación es dependiente de los niveles intracelulares de (p)ppGpp.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe relación entre las proteínas EIIA^{Ntr}/RsmA en los mecanismos de regulación del ciclo de PHB y la dependencia de estos con los niveles de (p)ppGpp.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.1. Identificar y describir genes homólogos de *relA/spoT* en *A. vinelandii*.
- 5.2. Construir cepas mutantes en *relA*, *spoT* y doble mutante *relA/spoT*.
- 5.3. Determinar el efecto de mutaciones en los genes *relA* y *spoT* sobre la producción de PHB.
- 5.4. Determinar los niveles de síntesis de PHB en las mutantes *rppH*, *ptsN*, *rppH/ptsN*.
- 5.5. Evaluar los niveles de expresión de los genes *rsmA* y *ptsN* en las diferentes mutantes.
- 5.6. Determinar los niveles de expresión del operón *phbBAC* en la mutante *rppH/ptsN*.
- 5.7. Establecer si existe interacción entre la proteína EIIA^{Ntr} con RsmA *in vivo* e *in vitro*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas bacterianas, oligonucleótidos y plásmidos empleados

Las cepas bacterianas, oligos y plásmidos se resumen en la tabla 1 junto con sus características.

Tabla 1. Cepas, plásmidos y oligos empleados durante el estudio.

| CEPAS | CARACTERÍSTICAS | REFERENCIA |
|----------------------------|--|--------------|
| <i>A. vinelandii</i> UW136 | Mutación natural en <i>algU</i> , Nal ^R , Rif ^R | (17) |
| <i>UW136 rppH</i> | <i>UW136 rppH::Sp^R</i> | (40) |
| <i>UW136 ptsN</i> | <i>UW136 ptsN::Sp^R</i> | (40) |
| <i>UW136 rsmA</i> | <i>UW136 rsmA::Sp^R</i> | (40) |
| <i>UW136 rppH/ptsN</i> | <i>UW136 rppH::Sp^R</i> <i>ptsN::Km^R</i> | (40) |
| <i>UW136 rsmA/rppH</i> | <i>UW136 rppH::Sp^R</i> <i>rsmA::Km^R</i> | (40) |
| <i>UW136 spoT</i> | <i>UW136 02810::Km^R</i> | Este estudio |
| <i>UW136 relA</i> | <i>UW136 37060::Km^R</i> | Este estudio |
| <i>UW136 relA</i> | <i>UW136 37060::Gm^R</i> | Este estudio |
| <i>UW136 relA/spoT</i> | <i>UW136 02810::Km^R</i> <i>37060::Gm^R</i> | Este estudio |
| <i>UW136 phbZ1</i> | <i>UW136 03910::Gm^R</i> | (39) |

| | | |
|-------------------------|---|--------------|
| <i>UW136 relA/phbZ1</i> | <i>UW136 relA::Km^R phbZ1::Gm^R</i> | Este estudio |
| <i>E. coli DH5α</i> | <i>supE44, lacU169, ΔhsdR17, recA1, endA1, gyrA96, relA</i> | Invitrogen |

Oligos empleados

| OLIGO | SECUENCIA 5'-3' | REFERENCIA |
|------------------------|--|-------------------|
| <i>Avin16s qPCR Fw</i> | ACCGCATCCAAAACACTACTGG | Este estudio |
| <i>Avin16s qPCR Rv</i> | GCCACTGGTGTTCCTTCCTA | Este estudio |
| <i>ptsN qPCR Fw</i> | AAGAAACGCGCTCTCGAATA | Este estudio |
| <i>ptsN qPCR Rv</i> | AGTTTTTCACGGGCAATCAG | Este estudio |
| <i>rsmA qPCR Fw</i> | ATC CAT ATG ATC GAC CCC GAT GGA TTT C | (40) |
| <i>rsmA qPCR Rv</i> | ATC CTC GAG ATC CCG TGC CAG CAG GC | (40) |
| <i>Avin02810 Fw</i> | GGTCGACTACAACGTCATC | Este estudio |
| <i>Avin02810 Rv</i> | GCCTTGTCGGTATTGATCAC | Este estudio |
| <i>Avin37060 Fw</i> | CCCGTAATGGACTGAACAAC | Este estudio |
| <i>Avin37060 Rv</i> | ACGATTGCCCACTATAGGAC | Este estudio |
| <i>Km1</i> | GAA TAG CCT CTC CAC CCA AG | Este estudio |
| <i>Km2</i> | CAT CGC CTT CTA TCG CCT TC | Este estudio |

| | | |
|--------------------------|----------------------------|--------------|
| <i>Gm1</i> | TCG TTC AAG CCG AGA TCA GC | Este estudio |
| <i>Gm2</i> | CCA GTT GCG TGA GCG CAT AC | Este estudio |
| <i>Avin03910qPCR Fw</i> | GCA GGA ATT CTT CTC CGA CA | Este estudio |
| <i>Avin03910qPCR Rv</i> | AAC CAG CCG TAG AGC GTA TG | Este estudio |
| <i>Avin33500qPCR Fw</i> | ACG CCA GAC GAC GAG TGT AG | Este estudio |
| <i>Avin33500qPCR Rv</i> | TTG CCG GGA TGA ACA GTC GT | Este estudio |
| <i>Avin34710 qPCR Fw</i> | GCG GAA GCC AAC GAT CTC AT | Este estudio |
| <i>Avin34710 qPCR Rv</i> | ACT GTC CGG CGA AGA ATA GC | Este estudio |

Plásmidos empleados

| NOMBRE | DESCRIPCIÓN |
|----------------|---------------------------------------|
| pJET 1.2-Blunt | Vector de clonación |
| pR1 | pJET <i>avin02810::Km^R</i> |
| pR2 | pJET <i>avin37060::Gm^R</i> |

6.2 Condiciones de crecimiento

Las cepas de *A. vinelandii* fueron sembradas en medio mínimo de Burk (BS), el cual contiene: 0.79 mM de MgCl₂·6H₂O, 0.83 μM de NaMoO₄·2H₂O, 0.018 mM de FeSO₄·7H₂O, 0.5 mM de CaCl₂·2H₂O, 1.3 mM de Na₂SO₄, 4.6 mM de K₂HPO₄, 1.5 mM de KH₂PO₄, sacarosa al 2%, las cepas se incubaron de 24 a 48 horas a 30 °C.

Para el crecimiento y la selección de mutantes de *A. vinelandii*, las cepas se incubaron en medio Burk durante 48 horas a 30 °C, al medio se adicionaron los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones: kanamicina 1 μg/mL y un máximo de 3

$\mu\text{g/mL}$ para seleccionar mutantes, gentamicina $0.5 \mu\text{g/mL}$ y un máximo de $1 \mu\text{g/mL}$, espectinomycin $100 \mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, todos los medios fueron adicionados con rifampicina y ácido nalidíxico (*A. vinelandii* UW136 resistente).

La producción de PHB se determinó por cultivo en agar peptona extracto de levadura (PY) complementado con 2% de sacarosa e incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, las cepas fueron preinoculadas en medio BS durante 24 horas.

Las cepas de *E. coli* fueron obtenidas por cultivo en medio líquido o agar Luria Bertani (LB) complementado con el antibiótico de selección e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas.

La obtención de células competentes de *A. vinelandii*, se realizó empleando el medio de competencia (CM), el cual fue preparado con los mismos componentes del medio BS sin la adición de FeSO_4 ni NaMoO_4 ; se realizaron dos siembras de la cepa UW136, la primera siembra se incubó por 24 horas y la segunda por 48 horas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, se recolectaron las células en una solución de MgSO_4 10 mM , se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en medio CM líquido 16 mM de MgSO_4 .

6.3 Evaluación de la producción de PHB

Para evaluar la producción de PHB las cepas fueron preinoculadas en medio Agar BS e incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas, posteriormente las cepas se sembraron por triplicado en Agar PY suplementado con 2% de sacarosa y se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; transcurrido este tiempo se extrajeron los gránulos de PHB y se realizó la cuantificación.

Para la cuantificación en medio sólido, se tomó un pellet homogéneo en tres tubos Eppendorf de 1.5 mL y se suspendió en agua estéril posteriormente se procedió a realizar la extracción de los gránulos de PHB de la siguiente manera: la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm , el pellet celular fue lavado con MgSO_4 10 mM homogenizado y centrifugado nuevamente 5 minutos a 13000 rpm ; el pellet fue resuspendido en 1 mL de hipoclorito de sodio 30% y se incubó durante 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. El paquete celular fue lavado con 1 mL de agua estéril y centrifugado; el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de etanol absoluto y se

centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm, posteriormente, el sobrenadante fue retirado y el pellet se resuspendió en 1 mL de acetona fría, se centrifugo 20 minutos más a 13000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el exceso de acetona toda la noche a temperatura ambiente. Una vez extraídos los gránulos de PHB se resuspenden en 1 mL de H₂SO₄ concentrado, se incubó a 95 °C durante 10 minutos y se determina la absorbancia a una longitud de onda de 235 nm en celda de cuarzo y se realizaron las diluciones necesarias.

Los valores de PHB fueron expresados en µg de PHB por miligramo de proteína, el valor de proteína fue determinado por el método de Lowry y realizado por triplicado.

6.4 Extracción de RNA y RT-qPCR

Se realizó RT-qPCR a partir de RNA total el cual fue extraído de las cepas incubadas en medio BS o PY líquido según corresponda, el medio estaba complementado con los antibióticos de resistencia correspondientes para cada cepa (ver tabla 1); la extracción se llevó a cabo de la siguiente manera: el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos, el pellet resultante fue resuspendido con 60 µL de agua tratada con DEPC 0.1%, 5 µL de agua DEPC 0.5% y 200 µL de acetona fría, se homogenizó la mezcla y se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido en 50 µL de agua DEPC 0.1% y 10 µL de lisozima (10 mg/mL en agua DEPC 0.5%) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos; a esta mezcla se le adicionó 1µL proteinasa K (100µL/mL) y se incubó durante 10 minutos en hielo; transcurrido este tiempo, se agregaron 3.5µL de DEPC 0.5%, 200 µL de fenol (precalentado a 70 °C), 150 µL de cloroformo y 120 µL de agua DEPC 0.1%, homogenizado manualmente y centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos; la fase acuosa fue removida y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto; esta solución se dejó precipitar durante toda la noche a -20 °C; al siguiente día, se centrifugó la solución a 4 °C, 12000 rpm por 15 minutos, el pellet resultante fue resuspendido en 50 µL de DEPC 0.1% y guardado a -20 °C.

Para verificar la correcta extracción e integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%; posteriormente, se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa con el fin de eliminar el restante contenido de DNA presente y posteriormente se realizó una PCR para amplificar el gen *rpoS* (500 pb) con el fin de descartar la presencia de DNA contaminante en

las muestras de RNA; una vez purificado y cuantificado el RNA se emplearon 0,5 µg de este para sintetizar cDNA empleando los oligos reversos de los genes a estudiar y usando el gen *16S* como control todos a concentraciones de 2 pmol/µL; los oligos junto con el ARN se incubaron 5 minutos a 65 °C y 2 minutos en hielo, posteriormente se añadieron: 4 µL de buffer 5x, 0.5 µL de riboblock, 2 µL de dNTPs, 0.5 µL de la enzima transcriptasa reversa y 1 µL de agua, se homogenizó y se incubó 1 hora a 42 °C y posteriormente 10 minutos a 70°C.

Se realizó PCR de punto final al cDNA con el fin de comprobar la integridad y la correcta síntesis; posteriormente, el cDNA fue empleado para realizar una qPCR, el cDNA correspondiente a los genes de interés se manejaron una concentración de 20 ng/µL, mientras que el cDNA del gen *16S* fue diluido hasta alcanzar una concentración de 0.004 ng/µL. Los oligos empleados se diluyeron para obtener una concentración de 0.1 pmol/µL de cada uno, seguidamente se prepararon las reacciones para cada pozo realizando cada una por triplicado para cada cepa; cada pozo de reacción contenía 5 µL de SYBRGreen, 1 µL de la dilución de los oligos correspondientes, 0.5 µL de cDNA y 3.5 µL de agua.

La transcripción de los genes a estudiar en cada cepa se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Transcritos estudiados en cada cepa empleada.

| CEPAS | TRANSCRITOS A MEDIR |
|-------------------------------------|--|
| UW136 | <i>rsmA</i> y <i>ptsN</i> |
| UW136 <i>ptsN</i> ⁻ | <i>rsmA</i> |
| UW136 <i>rppH</i> ⁻ | <i>rsmA</i> y <i>ptsN</i> |
| UW136 <i>rsmA</i> ⁻ | <i>ptsN</i> |
| UW136 <i>rppH/rsmA</i> ⁻ | <i>ptsN</i> |
| UW136 <i>rppH/ptsN</i> ⁻ | <i>rsmA</i> |
| UW136 <i>relA</i> ⁻ | <i>Avin03910</i> , <i>avin33500</i> y <i>avin34710</i> |

6.5 Fusión transcripcional y traduccional del gen *phbB*

La fusión transcripcional y traduccional empleó como reportero el gen *gusA*, las cepas fueron construidas empleando los plásmidos pAHFUTs-Tc y pAHFUTd-Tc construidos anteriormente en el laboratorio por Hernandez-Eligio (8), estos plásmidos linearizados se integran por un evento de doble recombinación en la región *avin12230* considerada una región neutral y cuya región reguladora y estructural es deletada y remplazada por la inserción de la construcción realizada. Se seleccionaron colonias positivas en medio BS suplementado con tetraciclina 50 mg/mL.

La fusión transcripcional del gen *phbB* (pAHFUTs-Tc *phbB*) consta de toda la región promotora y reguladora del operón *phbBAC* fusionada al gen *gusA* y corriente abajo presenta un casete de resistencia a tetraciclina, mientras que la fusión traduccional (pAHFUTd-Tc *phbB*) fue construida abarcando toda la región promotora, reguladora y los cuatro primeros codones del operón *phbBAC*, seguidas por un casete de resistencia a tetraciclina para su selección.

Los plásmidos fueron linearizados con la enzima *SacI* y empleados para transformar células competentes de *A. vinelandii* UW136 y de la cepa UW136 *rppH/ptsN*, las colonias candidatas fueron inoculadas en medio BS-tetraciclina para su selección.

Para realizar el ensayo cuantitativo de la actividad de la β -glucuronidasa, cada cepa fue preinoculada 24 horas en medio BS líquido, se empleó una D.O.₆₀₀ de 0,1 para inocular 25 mL de medio PY líquido y se tomó una muestra a las 12, 18, 24, 36, 42 y 48 horas de incubación; cada vez por triplicado. El procedimiento realizado con cada muestra fue el siguiente: se centrifugó el cultivo (1 mL) para obtener el paquete celular, se realizó un lavado con 1 mL de MgSO₄ 10 mM, se resuspendió en esta misma solución y se toman 20 μ L ó 50 μ L (Vol. de Rx) y se llevó a un volumen final de 730 μ L con buffer Z (K₂HPO₄ 0,03 M, KH₂PO₄ 0,02 M, EDTA 0,001 M y DTT 0,005 M); posteriormente, se adicionaron 10 μ L de lisozima 10 mg/mL y se incubó por 5 minutos a 37 °C, pasado este tiempo, se agregaron 10 μ L de una solución de Tritón 10%. A temperatura de 37 °C se adicionan 100 μ L de solución de PNPG (α -p-nitrophenylglycerol, 1-(4-nitrophenyl)-1, 2,3-propanetriol) y se cronometró el

tiempo de reacción (t de Rx) desde la adición de PNPG hasta la aparición de una tonalidad amarilla tenue (producción de p-Nitrofenol), entonces se detiene la reacción con 150 μ L de Na_2CO_3 y se determina la absorbancia a 405 nm.

La actividad de la glucuronidasa se determinó teniendo en cuenta el coeficiente de extinción del p-nitrofenol (0,018) mediante la siguiente formula:

$$U \beta\text{-Gluc} = \text{DO}_{405} (1000) / [(0,018) (t \text{ Rx en minutos}) (\text{Vol. de Rx en } \mu\text{L}) (\text{proteína } \mu\text{g/mL})]$$

El valor de proteína fue determinado en cada caso por el método de Lowry.

6.6 Construcción de las mutantes *avin02810 (spoT)* y *avin37060(relA)*

Para la construcción de las mutantes se emplearon los oligos *avin02810F-avin02810R*, y *avin37060F-avin37060R*, los cuales amplifican un fragmento de 2.336 y 2.833 Kb respectivamente, se usó como templado DNA cromosomal de *A. vinelandii* UW136; se empleó la enzima DNA polimerasa *Phusion High-Fidelity* de Thermo Scientific con el fin de lograr una alta fidelidad de la secuencia amplificada.

El producto de PCR fue purificado desde el gel usando el kit *GeneJET Gel Extraction Kit*, según especificaciones del productor y corroborado en gel de Agarosa al 1%. Posteriormente el producto de amplificación fue introducido dentro del vector de clonación *pJET 2.1* el cual es proporcionado dentro del kit *CloneJET PCR Cloning Kit*, la región de clonación de este vector ha sido introducida por corte con la enzima *EcoRV* con extremos romos dentro de la secuencia *eco47IR*, la cual es una secuencia letal que garantiza que solo se puedan replicar los plásmidos que hayan incorporado el DNA clonado en esta región; así mismo, está bajo el control del promotor T7 y contiene el gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina permitiendo la selección de las clonas en *E. coli*.

Una vez construido el plásmido, se transformaron células competentes de *E. coli DH5 α* (preparadas con anterioridad por el método de CaCl_2); se emplearon entre 50-100 ng de DNA plasmídico en 200 μ L de células; se incubaron 30 minutos en hielo, se someten a un choque térmico por 2 minutos a 42 $^\circ\text{C}$ y se incubó 1 hora en 1 mL de medio LB líquido a 37 $^\circ\text{C}$ bajo agitación, transcurrido este periodo se inocularon de 50 a 100 μ L de este cultivo en medio

LB con ampicilina (200 mg/mL), se incubó 24 horas a 37 °C. Al cabo de estas 24 horas, las colonias positivas aisladas fueron resembradas en medio LB líquido y agar con ampicilina 200 mg/mL, e incubadas 24 horas a 37 °C; se tomó el cultivo líquido y se realizó la extracción del plásmido.

El cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el pellet fue utilizado para la extracción de plásmido por la técnica de perclorato de sodio (NaClO₄) como se describe a continuación: el paquete celular fue resuspendido en 175 µL de TES (TES, Sacarosa 15%, 50 mM de Tris pH 8.5, 50 mM de EDTA pH 8.0) y 25 µL de lizozima (10 mg/mL), se incubó 20 minutos en hielo; posteriormente se añadieron 400 µL de agua fría, se incubó 15 minutos a 73 °C y se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm; el sobrenadante se recuperó y se trató con 60 µL de NaClO₄ y 600 µL de isopropanol, la mezcla se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm; el pellet resultante fue lavado dos veces con etanol 70%, centrifugado 15 minutos, secado y resuspendido en 50 µL de RNAsa (20 µg/mL).

Una vez purificados los plásmidos, fueron digeridos con la enzima *Bgl*III con el fin de seleccionar las clonas con el gen dentro del vector *pJET 2.1*; las clonas seleccionadas fueron linearizadas con la enzima *Sac*I para el gen *relA* (*avin37060*) y la enzima *Apa*I para el gen *spoT* (*avin02810*), se introdujeron casetes de resistencia a gentamicina y kanamicina respectivamente; los casetes fueron obtenidos desde el plásmido psBSL97-kanamicina y psBSL98-gentamicina cortados con *Apa*I y *Sac*I respectivamente y purificados a partir del gel como se especificó anteriormente.

Obtenidos los casetes de resistencia y los plásmidos linealizados se realizó una reacción de ligación y se obtuvieron los plásmidos pR1 (*spoT*::Km^R) y pR2 (*relA*::Gm^R) estos plásmidos fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5α como se describió anteriormente; 50 µL de las estas células fueron plateadas en medio LB complementado con kanamicina 30 mg/mL y gentamicina 10 mg/mL respectivamente e incubadas durante 24 horas a 37 °C; transcurrido el periodo de incubación, se seleccionaron al azar clonas positivas y se purificaron los plásmidos, el plásmido pR2 fue digerido con la enzima de restricción *Bgl*III y el plásmido pR1 fue digerido con la enzima *Nco*I con el fin de comprobar la orientación del casete con respecto al gen; se seleccionaron entonces los plásmidos que

presentaban una orientación no polar con respecto al gen de interés, con el fin de no interferir en la transcripción de los genes corriente abajo del gen al momento de transformar las células de *A. vinelandii*.

Se empleó 1 μL de los plásmidos a concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se digirió con la enzima *ScaI* para linealizarlo y permitir su recombinación en *A. vinelandii*.

Se emplearon 200 μL de células *A. vinelandii* y se transformaron con 5 μg de plásmido linealizado, el volumen total fue inoculado en Agar CM y distribuido en una superficie de aproximadamente 2 cm^2 , se incubó a 30 °C por 24 horas; posteriormente, se recolectó la mayor cantidad de cultivo en 1 mL de MgSO_4 10 mM y se platearon 100 μL de esta solución en medio BS complementado con kanamicina 1 mg/mL y gentamicina 0.5 mg/mL para *spoT::Km^R* y *relA::Gm^R* respectivamente, los cultivos se incubaron por 48 horas a 30 °C; una vez transcurrido este tiempo se recolectaron colonias aisladas y se sembraron en medio BS aumentando la concentración del antibiótico kanamicina a 3 mg/mL y gentamicina a 1 mg/mL y se incubaron por otras 48 horas.

Se realizó PCR de colonia empleando los primers Avin02810 Forward y Reverse y Avin37060 Forward y Reverse con el fin de evidenciar que no existieran copias silvestres de los genes en las colonias utilizadas.

Se seleccionaron colonias que no presentaron copias silvestres del gen y se realizó PCR empleando los primers Km1 y Gm2, los cuales están diseñados para amplificar las regiones unidas al casete de resistencia y en conjunto con los primers Avin37060-Forward y Avin02810-Forward nos permitió corroborar la polaridad del casete con respecto al gen; las clonas que presentaban amplicón correspondían a mutantes con orientación no polar, mientras que, clonas en las cuales no se observaba producto de amplificación tenían el casete en orientación polar con respecto al gen.

Las mutantes obtenidas fueron cultivadas inicialmente en medio BS con concentración de gentamicina 0.5 mg/mL y kanamicina 1 mg/mL durante 48 horas, seguidamente se sembraron en medio BS con gentamicina 1 mg/mL y kanamicina 3 mg/mL con el fin de obtener las clonas verdaderamente resistente a los antibióticos de selección.

6.7 Construcción de la doble mutante *relA/spoT* (p)ppGpp⁰

La construcción de la doble mutante UW136 *relA/spoT* fue realizada partiendo de células competentes de la cepa mutante sencilla UW136 *relA::Gm^R* la cual fue transformada con 5 µg del plásmido pR1 (*spoT::Km^R*) linearizado, estas células se inocularon en medio BS con kanamicina 1 mg/mL y gentamicina 1 mg/mL y se incubaron 48 horas a 30 °C. Se realizó PCR de colonia con los oligos *Avin02810-Forward/Reverse* empleando DNA de la cepa UW136 como control positivo, las clonas que no presentaban copias del gen silvestre fueron seleccionadas.

Para confirmar la orientación del casete de resistencia a la kanamicina se realizó PCR empleando los primers *Avin02810-Forward* y *km-1*, solo las clonas en las que el casete se encuentra en orientación no polar con el gen presentarían un amplicón de aproximadamente 1700 pb, como control negativo se empleó DNA de la cepa UW136.

6.8 Construcción doble mutante *relA/avin03910* (*phbZ1*)

Se empleó plásmido pJG03910::Gm (Anaya y col. 2018), el cual tiene insertado el casete de gentamicina en el sitio *SalI* dentro del gen *avin03910* (*phbZ1*), este plásmido fue empleado para transformar células competentes de la cepa UW136 *relA::Km* como se describió anteriormente; el plásmido fue linearizado con la enzima *XbaI*, permitiendo la recombinación en el cromosoma de *A. vinelandii*; las candidatas fueron inoculadas en medio BS kanamicina/gentamicina. Las clonas se comprobaron mediante PCR empleando oligos para el casete de gentamicina y el oligo *03910-Fw*.

Previamente se construyó la mutante *relA::Km*, dado que el gen *phbZ1* estaba interrumpido con un casete de gentamicina, la mutante *relA::Km* fue empleada para poder seleccionar las verdaderas dobles mutantes en medio BS con los dos antibióticos, el fenotipo de síntesis de PHB de esta cepa fue el mismo que la mutante *relA::Gm*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis in silico de genes *relA/spoT* en *A. vinelandii*

Se decidió estudiar el papel de las proteínas RelA/SpoT en *A. vinelandii* dentro del ciclo de PHB y su posible relación con las proteínas RsmA y EIIA^{Ntr}; para ello inicialmente se realizó un BLAST proteína-proteína con el fin de encontrar homología con las proteínas de *E. coli*, al realizarse el alineamiento de la proteína SpoT, se identificó una proteína de 702 aminoácidos (WP_012698969), con un porcentaje de identidad de 54% y anotada en el genoma de *A. vinelandii* (KEGG) como *Avin02810* (guanosine 3,5-bis-pyrophosphate (ppGpp) synthetase, RelA/SpoT protein); así mismo, la proteína RelA de *E. coli* presentó homología con una proteína de 749 aminoácidos (WP_012702227) con porcentaje de identidad del 47%, anotada en KEGG como *Avin37060* (RelA/SpoT protein).

Avin 02810 (SpoT)

El gen *avin02810* consta de 2109 nucleótidos y de acuerdo a su contexto génico (ver figura 12), podría estar formando un operón en conjunto con el gen *avin02820*, el cual codifica la subunidad omega de la RNA polimerasa denominado *rpoZ*; en *E. coli* se encontró que efectivamente *rpoZ* y *spoT* forman un operón y que *rpoZ* regula de una forma no determinada la actividad de la proteína RelA (34) (35). Corriente abajo se encuentra el gen *avin02800* el cual codifica una proteína de la familia de las L-PSP endoribonucleasas, involucrado en la deaminación de los intermediarios reactivos de la enamina/imina de las reacciones enzimáticas dependientes de piridoxal 5'fosfato (PLP) y la cual está presente en todos los organismos.

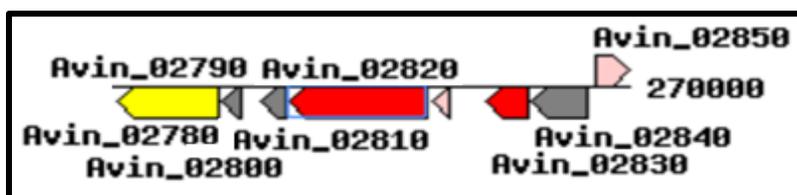


Figura 12 Contexto génico *avin02810*. Tomado de http://www.genome.jp/kegg-bin/show_genomemap?ORG=avn&ACCESSION=Avin_02810.

Se realizó un análisis en el software *Softberry*, *BPROM*, con el fin de evaluar la presencia de promotores de interés en región intergénica *Avin02810-02820*, no se encontró ningún

promotor, favoreciendo la hipótesis de que podrían formar un operón. De la misma forma se analizó la región corriente arriba del gen *Avin02820*, en esta región se encontró un sitio de reconocimiento sigma 70, un posible sitio de reconocimiento de tipo *lexA* (involucrado en la respuesta SOS en diferentes bacterias) y un sitio de reconocimiento para Crp el cual es un regulador global de la transcripción dependiente de cAMP. Se ha demostrado que en *E. coli* el cAMP actúa en respuesta a la señalización y estado de fosforilación de la proteína EIIA^{Glc} del sistema PTS de carbohidratos, pero este sistema no está presente en *A. vinelandii*. El mecanismo de respuesta en *A. vinelandii* de los genes con sitios de reconocimiento a Crp/Fnr aún no ha sido estudiado.

Se realizó también un BLAST proteína-proteína utilizando la herramienta web del NCBI, con el fin de encontrar la homología con las secuencias descritas para las proteínas con actividad sintetasa/hidrolasa, se encontró un 88% de identidad con la proteína bifuncional GTP difosfoquinasa/fosfatasa de diferentes especies de *Pseudomonas* y un 54% de identidad con la proteína RelA/SpoT bifuncional de *E. coli*.

Se analizó la presencia de dominios conservados dentro de la secuencia de aminoácidos con el fin de determinar si el gen *avin02810* codificaba una proteína con actividad sintetasa o sintetasa/hidrolasa; el análisis fue realizado en el software *Conserved Domain Database* (CDD) del NCBI (37) y como se muestra en la figura 13 la proteína Avin02810 anotada en la base de datos KEGG como guanosina 3,5-bi-pirofosfato sintetasa (ppGpp), proteína RelA/SpoT, pertenece efectivamente a la familia de las proteínas RSH y presenta característicamente el dominio PRK11092, descrito en las proteínas que tienen tanto actividad sintetasa/hidrolasa de (p)ppGpp.

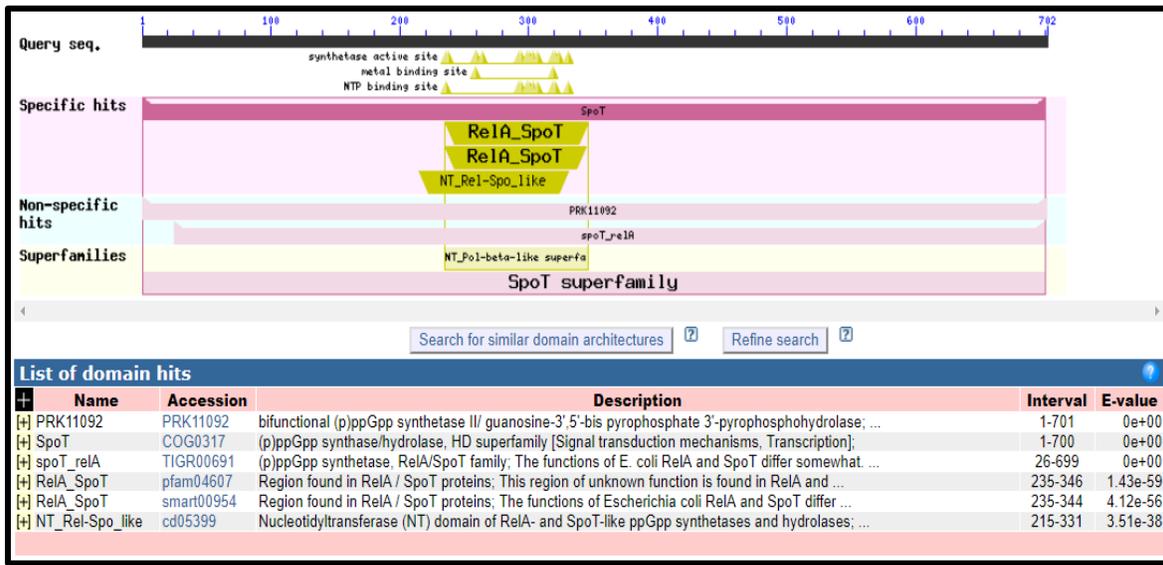


Figura 13 Dominios conservados proteína SpoT, dominio PRK11092, actividad bifuncional sintetasa/hidrolasa de (p)ppGpp.

Avin 37060 (RelA)

El contexto genético en el cual se encuentra el gen *avin37060* se describe en la figura 14, como se observa podría encontrarse formando un operón con los genes *avin37070* (23S rRNA (uracil-5-)-metiltransferasa RumA) y *avin37080* (cisteina sintasa K/M:cisteina sintasa M), se realizó el análisis en busca de promotores con el software Softberry en la región intergénica de los tres genes y solo se encontró una posible combinación caja -10 y -35 en la región corriente arriba del inicio de la transcripción del gen *avin37080*, con un score de 67 y 22 respectivamente.

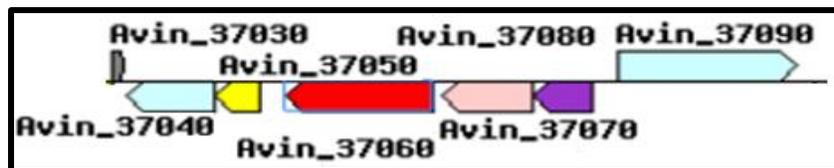


Figura 14 Contexto genético *avin37060*. Tomado de http://www.genome.jp/kegg-bin/show_genomemap?ORG=avn&ACCESSION=Avin_37060

El análisis de la secuencia de aminoácidos del gen *avin37060* (749 aminoácidos) determinó la presencia de una serie de dominios conservados entre la familia de las proteínas RSH, figura 15; se encontró el dominio PRK10872 característico de las proteínas con actividad sintetasa de (p)ppGpp, por tanto la proteína *Avin37060* posiblemente podría tener la actividad de una proteína de tipo *RelA*.

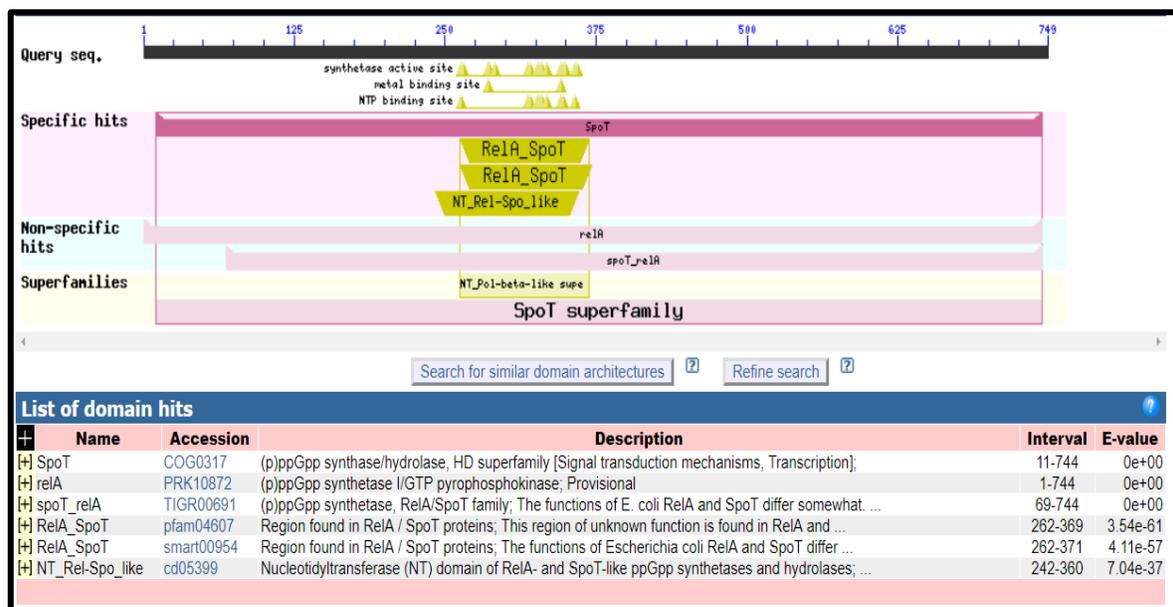


Figura 15 Dominios conservados proteína *RelA*, dominio PRK10872 característico de la actividad sintetasa de (p)ppGpp.

Igualmente se realizó un BLAST proteína-proteína para comprobar la homología con las proteínas de actividad sintetasa de (p)ppGpp de *Pseudomonas* y *E. coli*, se determinó que presenta un 85% de identidad con las GTP difosfoquinasa de varias especies de *Pseudomonas* y un 48% de identidad con la proteína GTP difosfoquinasa de *E. coli* (*RelA*).

7.2 Evaluación de la producción de PHB en las mutantes *relA*, *spoT* y *relA/spoT*

Una vez construidas las cepas mutantes UW136 *spoT*, *relA* y doble mutante *relA/spoT* fueron evaluadas en su capacidad para sintetizar PHB en medio PY complementado con 2% de sacarosa a las 48 horas de incubación. La figura 16 muestra los fenotipos de las cepas mutantes comparadas con la cepa silvestre; se observa una disminución en la producción de PHB (colonias mas opacas) entre las mutantes *relA* y *relA/spoT* en comparación con la cepa silvestre UW136 mientras que la mutante *spoT* no presenta un fenotipo evidente.

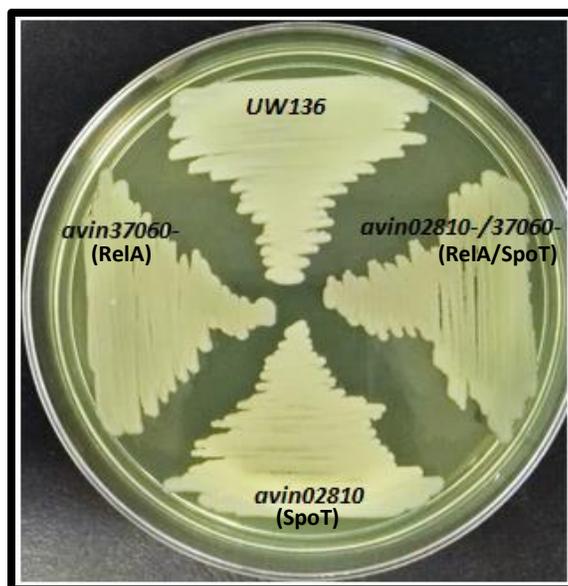


Figura 16 Producción de PHB en medio PY 2% sacarosa, 48 horas de incubación.

Se cuantificó la producción de PHB en estas condiciones de cultivo; como se observa en la figura 17, la acumulación de PHB disminuyó significativamente en la mutante *relA* ($p=0.0107$) en comparación con la cepa silvestre. No se observaron cambios significativos en la mutante *spoT*, mientras que la doble mutante *relA/spoT* conserva el fenotipo de la mutante *relA* disminuyendo la cantidad de PHB en comparación con la cepa silvestre UW136.

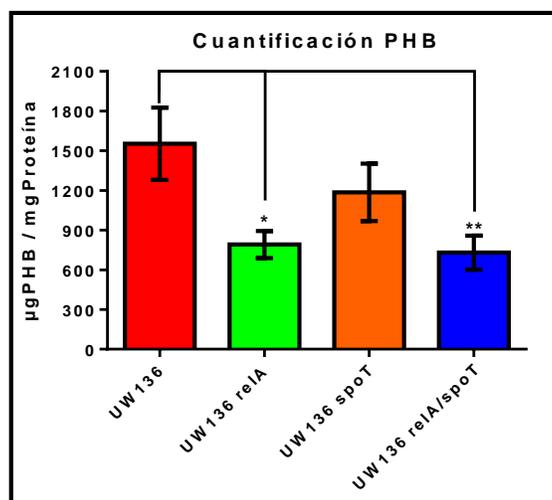


Figura 17 Cuantificación de PHB en medio PY, 48 horas de incubación. Significancia estadística $p < 0,05$ (* $<0,05$; ** $<0,001$)

Estos resultados concuerdan con lo encontrado en diferentes especies productoras de PHAs, en las cuales se ha estudiado la relación de las proteínas RSH con el ciclo de síntesis/degradación de estos biopolímeros. En todas estas especies, mutaciones en los genes RSH disminuyen la síntesis de PHAs en comparación a la cepa silvestre, en *Pseudomonas putida* se encontró que una cepa mutante en los genes *relA/spoT* sintetizaba menor cantidad de PHAs bajo condiciones óptimas de cultivo y bajo condiciones de deprivación de nitrógeno (31); de manera similar en la bacteria del suelo *Rhizobium etli*, se encontró que la inserción del transposón Tn5 en el gen *rsh*, que codifica para una proteína de la familia RelA/SpoT, generó una mutante que formaba nódulos más pequeños en comparación con la cepa silvestre y que estas células, dentro de los nódulos llamadas bacteroides, eran incapaces de sintetizar PHB, esto evidenciado por microscopía electrónica (41).

Este es el primer estudio en el que se asocia una función de los genes *relA/spoT* en el ciclo del PHB en *A. vinelandii*; la disminución en la síntesis de PHB presentada en nuestras mutantes, nos condujo a indagar cual pudiera ser el mecanismo por el cual los cambios en la síntesis/hidrolisis de (p)ppGpp regulan la producción de PHB. En *Ralstonia eutropha* H16 se realizó un estudio en cual se mutaron los genes *spoT1* (sintetasa/hidrolasa) y *spoT2* (sintetasa) y se evaluó la capacidad de síntesis y degradación de PHB, interesantemente, se encontró que la mutación en la sintetasa de (p)ppGpp (*spoT2*) presentaba un comportamiento similar a la cepa silvestre, sin embargo una doble mutante *spoT1/spoT2* presentó una menor síntesis de PHB y una mayor actividad de degradación del polímero (32); por este motivo, se decidió evaluar si en *A. vinelandii* las mutaciones de los genes *relA* y *spoT* podrían incrementar la degradación de PHB en comparación con la cepa silvestre.

En la figura 18 se observa el fenotipo de acumulación de PHB a diferentes tiempos de incubación en medio PY 2% de sacarosa; los resultados indican que la cepa UW136 *relA::Gm* y la doble mutante *relA/spoT* son incapaces de acumular la misma cantidad de polímero que la cepa silvestre y presentan una mayor actividad de degradación de PHB; mientras que, la mutante UW136 *spoT::Km* presenta un comportamiento similar a la cepa silvestre aún en tiempos prolongados de incubación (14 días); sin embargo, estas diferencias en la acumulación de PHB son evidenciadas desde el cuarto día de incubación; se decidió

entonces cuantificar la concentración de PHB a los 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días de incubación en medio PY 2% sacarosa.

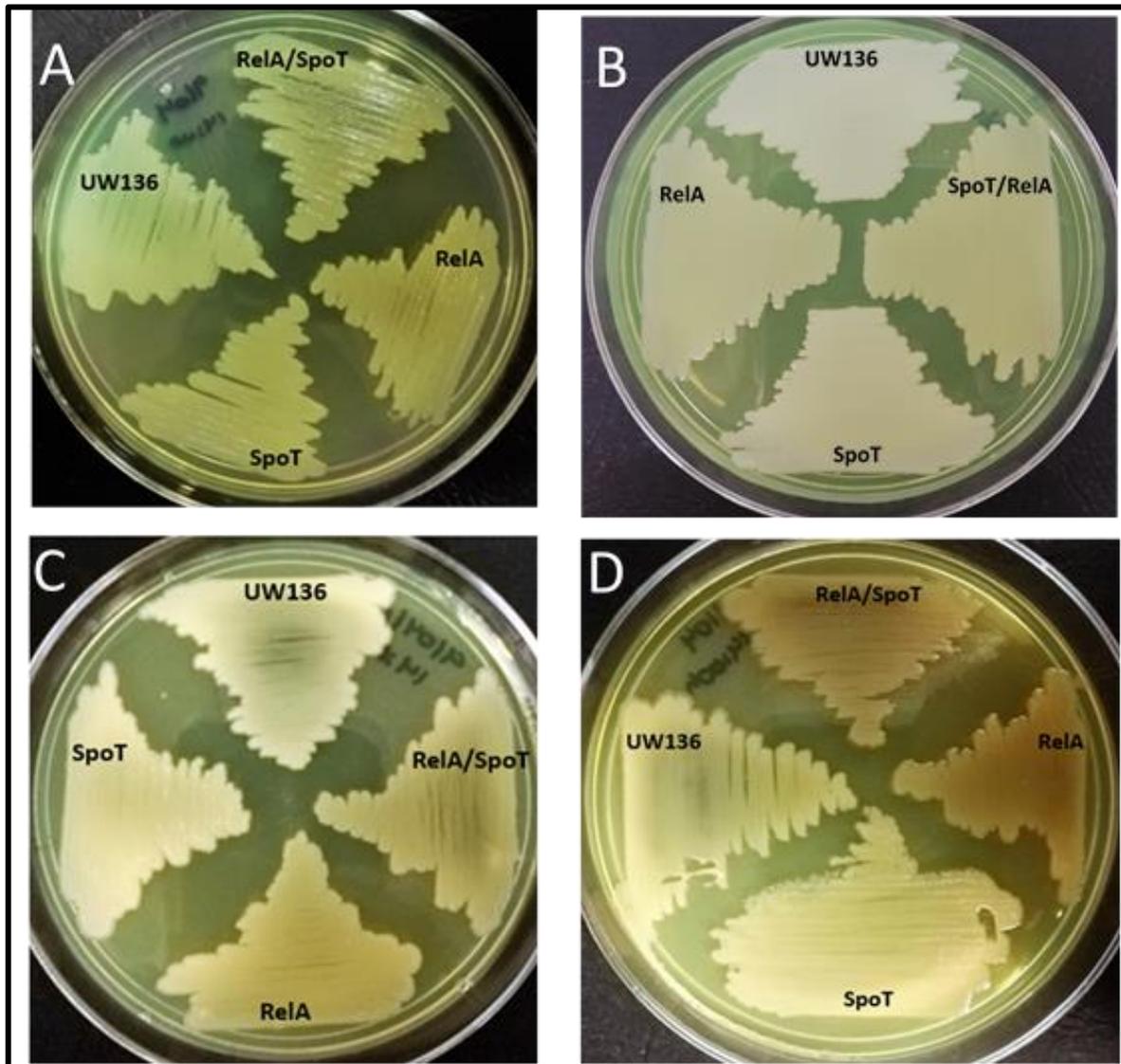


Figura 18 Producción de PHB en medio PY 2% sacarosa. **A.** 2 días de incubación. **B.** 4 días de incubación. **C.** 7 días de incubación. **D.** 14 días de incubación.

Como se evidencia en la figura 19, la acumulación de PHB por mg de proteína en las mutantes *relA* y *relA/spoT* disminuye a lo largo del tiempo de incubación lo cual indica una menor actividad de síntesis en estadios tempranos del crecimiento y una aumentada degradación del polímero en comparación con la cepa silvestre y con la mutante *spoT*, esta última presenta un comportamiento similar a la cepa silvestre.

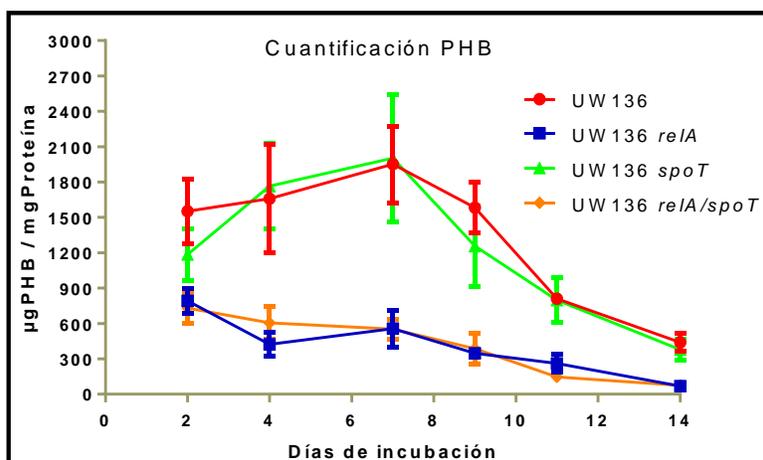


Figura 19 Acumulación de PHB.

Un resultado similar al nuestro se encontró en *Ralstonia eutropha* H16, donde una mutante en *spoT1/spoT2* (*spoT/relA*) presentó una menor acumulación de PHB y una mayor actividad de degradación del polímero, sin embargo, una mutante sencilla *spoT2* (*relA*) presentó un comportamiento similar a la cepa silvestre; la cuantificación de (p)ppGpp demostró que, en la doble mutante los niveles de esta alarmona son indetectables favoreciendo la degradación del polímero, mientras que en la mutante sencilla *spoT2* se mantienen unos niveles de (p)ppGpp similares a la cepa silvestre por la actividad sintetasa de la proteína SpoT1 (32). En el caso de las mutantes construidas en el presente estudio en *A. vinelandii*, se encontró que la mutante *relA*⁻ (pero no la *spoT*⁻) presentó una menor acumulación de PHB y una aparente mayor degradación del polímero, esto nos lleva a hipotetizar que en una mutante en *relA* los niveles de (p)ppGpp presumiblemente estén bastante disminuidos esto pudiera tener dos explicaciones: que el dominio de síntesis de la proteína SpoT no es funcional y/o tiene una actividad de sintetasa muy disminuida siendo incapaz de mantener los niveles basales de (p)ppGpp; mientras que en una mutante *spoT*, los niveles de (p)ppGpp pudieran estar elevados lo que mantendría regulada la degradación del polímero; para confirmar esta hipótesis será necesario cuantificar la concentración de (p)ppGpp en las diferentes mutantes, así mismo, determinar y medir la actividad de las proteínas RelA y SpoT como sintetasa y sintetasa/hidrolasa de (p)ppGpp y determinar como estos regulan la actividad de la(s) depolimerasa(s) responsables de la degradación del polímero bajo las condiciones estudiadas.

7.3 Evaluación de la expresión de las depolimerasas *avin03910*, *avin33500* y *avin34710* en la cepa UW136 *relA*

Teniendo en cuenta el fenotipo observado en la mutante UW136 *relA*⁻, en la cual se observó una degradación aumentada del polímero durante el transcurso del periodo de incubación, se decidió evaluar la expresión mediante RT-qPCR de tres genes que codifican para posibles depolimerasas de PHB. Como se evidencia en la figura 20, las depolimerasas *avin33500* y *avin34710* no presentan cambios significativos a nivel transcripcional en la cepa mutante *relA*; sin embargo, la depolimerasa *phbZ1* (*avin03910*) redujo ligeramente su expresión en comparación con la cepa silvestre a los 4 días de incubación en medio PY sacarosa.

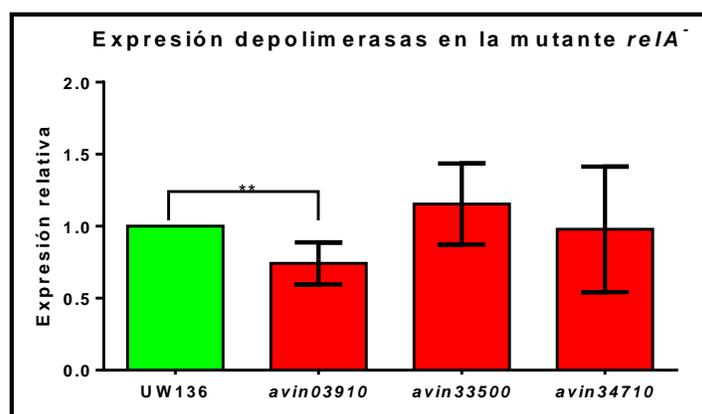


Figura 20 Expresión depolimerasas en la mutante UW136 *relA*. 4 días de incubación en medio PY.

Un resultado similar observaron Mozejko-Ciesielska y col. (31), quienes encontraron que una cepa de *P. putida* KT2440 mutante en *relA/spoT* presentaba menor nivel de expresión a nivel transcripcional de la depolimerasa *phbZ1* en comparación con una cepa silvestre, este resultado los lleva a proponer que los niveles de (p)ppGpp podrían estar regulando la expresión de este gen y así la acumulación y utilización de los PHAs como sustrato.

Teniendo en cuenta este resultado se decidió comprobar si una doble mutante *relA/phbZ1* restauraría el fenotipo silvestre bajo las condiciones estudiadas.

En *A. vinelandii* la regulación de la degradación de PHB es poco entendida; recientemente, Adaya y col. (39) demostraron que cuando se cultivaba una mutante *phbZ1* en biorreactores, el polímero sintetizado no disminuía su peso molecular en periodos largos de incubación, así

mismo, se observó una mayor acumulación de PHB a lo largo del tiempo en comparación con la cepa silvestre, lo que llevó a concluir que bajo condiciones de bioreactor, la depolimerasa *phbZ1* estaba involucrada en la degradación de PHB. Adicionalmente, en un análisis de las proteínas asociadas al granulo se encontró, entre otras, a la proteína PhbZ1, indicando que esta depolimerasa podría ser una de las principales encargadas de la degradación *in vivo* del PHB en *A. vinelandii*.

Una vez obtenidas la doble mutante *relA/phbZ1* se procedió a evaluar la síntesis de PHB a las 48 horas de incubación en agar PY 2% de sacarosa y su cuantificación, como se evidencia en la figura 21; la síntesis de PHB se ve disminuida en la mutante *relA* y en la doble mutante *relA/phbZ1*.

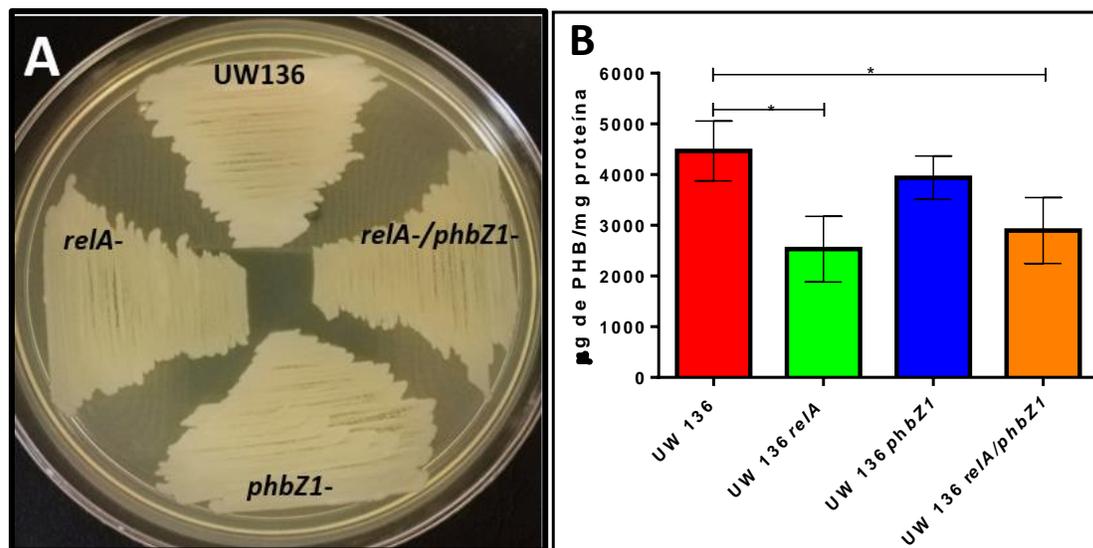


Figura 21 Cuantificación PHB **A.** Producción de PHB 48 horas de incubación medio PY 2% sacarosa. **B.** Cuantificación PHB 48 horas de incubación.

Se decidió evaluar si la mutante *relA/phbZ1* revertía el fenotipo de la mutante sencilla en *relA* y acumulaba PHB de manera similar a la cepa silvestre en el transcurso de una incubación prolongada; para ello se cuantificó el contenido de PHB a los 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días de incubación y se comparó con el comportamiento de las mutantes sencillas y de la cepa silvestre, los resultados se evidencian en la figura 22.

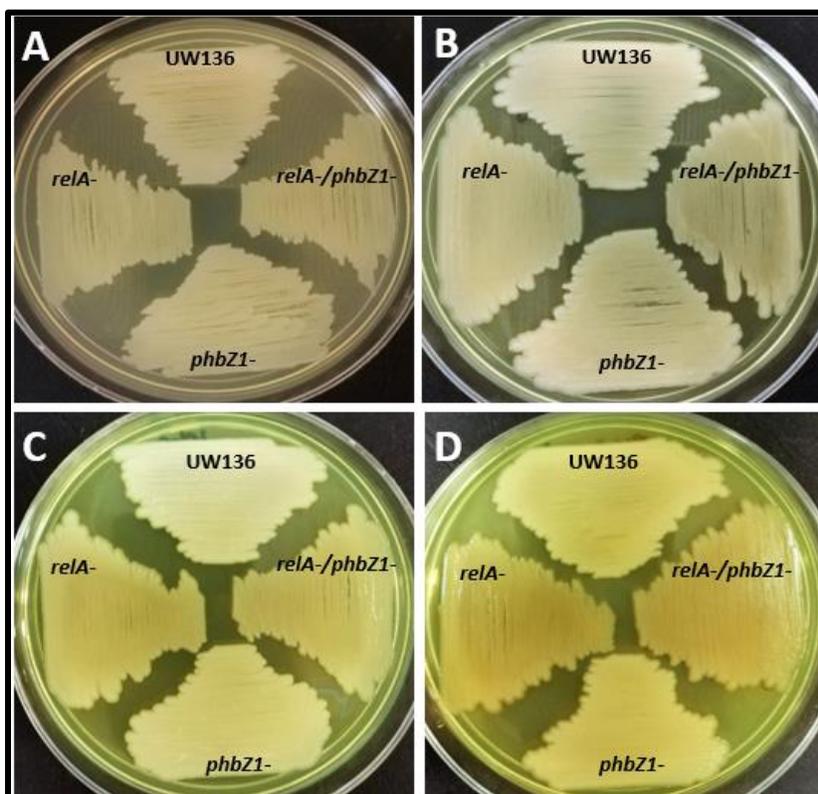


Figura 22 Producción de PHB en las diferentes mutantes. **A.** 2 días. **B.** 7 días. **C.** 9 días. **D.** 14 días de incubación en medio PY 2% sacarosa.

Se cuantificó entonces la cantidad de PHB acumulado, los resultados se resumen en la figura 23 donde se corroboró lo observado fenotípicamente; la doble mutante UW136 *relA/phbZ1* tiene un comportamiento similar a la mutante sencilla *relA::Km*, por tanto, podemos sugerir que la degradación de PHB en esta cepa no es dependiente de la presencia de la depolimerasa PhbZ1, lo que nos lleva a preguntarnos si es otra depolimerasa la que podría estar favoreciendo la degradación de PHB en la mutante UW136 *relA::Km*. Teniendo en cuenta que *A. vinelandii* cuenta con al menos 7 enzimas putativas con actividad de depolimerasa, será interesante determinar si alguna de ellas está involucrada en la degradación de PHB en la cepa mutante UW136 *relA::Km*; presumimos que este efecto puede darse por dos posibles vías: la primera hipótesis es que niveles basales de (p)ppGpp como los encontrados en la cepa silvestre mantienen regulada la transcripción de alguno de los genes que codifican para depolimerasas en *A. vinelandii*, por tanto en la mutante *relA::Km* se estaría favoreciendo la transcripción o traducción de estos genes aumentando la depolimerización del PHB; nuestra segunda posible explicación es que esta molécula podría favorecer la actividad de estas

depolimerasas sin involucrar un aumento en la transcripción/traducción y regulando a nivel postraduccional la actividad de alguna(s) depolimerasas presentes en *A. vinelandii*.

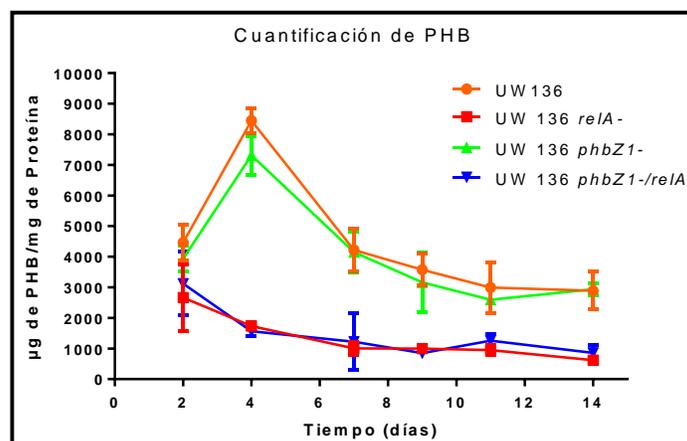


Figura 23 Curva de acumulación de PHB.

Se ha descrito que proteínas asociadas al gránulo denominadas fasinas pueden facilitar la degradación y/o la síntesis de PHB bajo ciertas condiciones, se desconoce el mecanismo de regulación de estas proteínas y cómo su actividad puede regular los dos procesos en el ciclo de PHB, por tanto, esta será una de las posibles vías para abordar y explicar el fenotipo presentado por las cepas mutantes en *relA*.

En resumen, estos resultados indican que en ausencia de la proteína RelA se disminuye la síntesis de PHB y parece existir un aumento en la degradación de este polímero; además, la depolimerasa PhbZ1 asociada a los granulos parece no ser la responsable de la degradación de PHB en la cepa mutante en *relA* ni en la cepa silvestre en las condiciones analizadas.

7.4 Evaluación de la producción de PHB en la mutante *rppH*/*ptsN*⁻

Como se mencionó en la sección de antecedentes, una mutación en el gen *ptsN* restaura parcialmente la síntesis de PHB en la cepa mutante en *rppH*, esto se confirmó mediante la cuantificación de la producción del polímero, como se observa en la figura 24. El efecto de la mutación en el gen *ptsN* parece contrarrestar parcialmente la represión ejercida por RsmA, lo cual resulta interesante debido a que los mecanismos de regulación ejercidos por EIIA^{Ntr} en *A. vinelandii* no se habían relacionado con el sistema de regulación de RsmA.

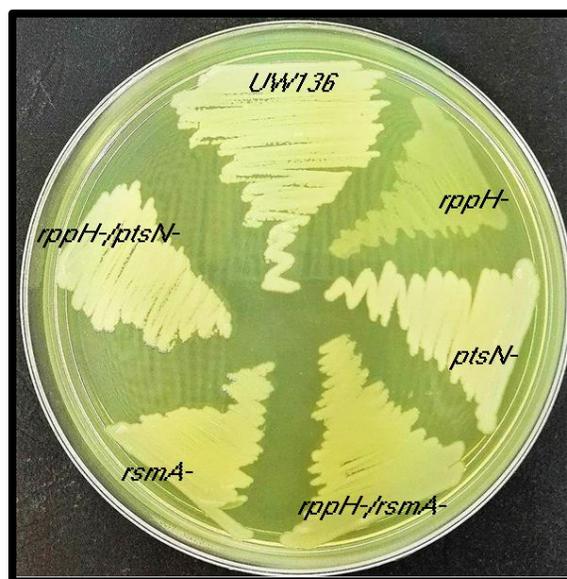


Figura 24 Producción de PHB en agar PY 2% sacarosa. UW136 cepa silvestre.

En la figura 25A se muestra la cuantificación de la producción de PHB y en la figura 25B se representa en porcentaje el aumento o disminución de la síntesis de PHB con respecto a la cepa silvestre UW136 la cual representa un 100% de producción.

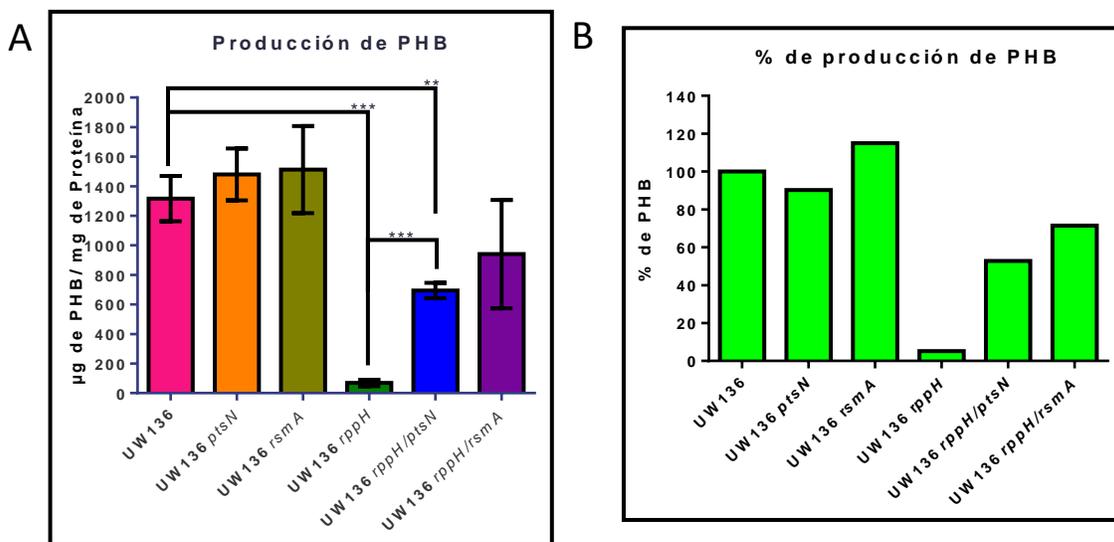


Figura 25 A. Producción de PHB 48 horas de incubación. **B.** Porcentaje de producción de PHB. Significancia estadística $p < 0,05$ (* $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$)

Como fue descrito por Bedoya y col. (40), la proteína RppH es una pirofosfohidrolasa capaz de regular los niveles de transcritos en la célula mediante la eliminación de los grupos

trifosfatos en el extremo 5' lo que facilita su degradación a través de la RNAsa E. En *A. vinelandii* la mutación en *rppH* indujo una mayor estabilidad del transcrito de *rsmA* incrementando la concentración de la proteína, lo cual conlleva a una disminución en la síntesis de PHB. La inactivación del gen *rsmA* en el fondo de esta mutante restauró parcialmente la síntesis de PHB. De manera interesante observamos que al igual que una mutación en *rsmA*, la inactivación del gen *ptsN* en el fondo de la mutante *rppH* restaura parcialmente la síntesis de PHB. Estos resultados sugieren que en ausencia de la proteína EIIA^{Ntr} la proteína RsmA disminuye su efecto negativo sobre la síntesis de PHB o que la expresión de RsmA es regulada positivamente por EIIA^{Ntr}, para comprobar esta hipótesis se decidió evaluar la expresión de *rsmA* y *ptsN* en las diferentes mutantes.

7.5 Niveles de los transcritos de *ptsN* y *rsmA*

Con el fin de evidenciar si la expresión a nivel transcripcional de los genes *ptsN* y *rsmA* se encontraba alterada en la cepa UW136 *rppH/ptsN* se decidió realizar una RT-qPCR como se describió anteriormente.

Los niveles del transcrito de *rsmA* fueron determinados en la cepa silvestre UW136, la mutante UW136 *ptsN*, la mutante UW136 *rppH* y la mutante UW136 *rppH/ptsN*, a las 18 y 24 horas de incubación en medio BS líquido. En la figura 26 se representa en porcentaje el nivel del transcrito del gen *rsmA* en comparación con la cepa UW136 (100%) a las 18 y 24 horas de incubación en medio BS líquido. Ninguna cepa presentó diferencias significativas en la expresión relativa del gen *rsmA* a las 18 horas de incubación. Sin embargo, se observó una disminución de alrededor del 30% en las mutante UW136 *ptsN* y *rppH/ptsN* a las 24 horas de incubación este resultado podría indicar que la proteína EIIA^{Ntr} actuaría como un regulador positivo de la transcripción del gen *rsmA* (de manera indirecta ya que esta proteína no tiene dominios de unión a ADN). Los resultados para la cepa *rppH* no coinciden con los encontrados por Bedoya (40), quien observó un aumento del transcrito a las 18 horas de incubación en un poco más del 50%, se hace necesario confirmar la expresión de *rsmA* a tiempo tempranos de incubación para determinar el efecto de la mutación en *rppH* sobre su regulación a nivel transcripcional.

La disminución en los niveles del transcrito de *rsmA* cuando está ausente la proteína EIIA^{Ntr} concuerda con la recuperación parcial de la síntesis de PHB en la cepa *rppH/ptsN*. Se ha demostrado que la proteína EIIA^{Ntr} puede unirse a reguladores transcripcionales de la familia DeoR, estos últimos regulan su actividad dependiendo del estado nutricional de la célula y la disponibilidad de carbohidratos, uno de ellos GlpR el cual, en *A. vinelandii*, posee por predicción bioinformática sitios de unión a RsmA; si alguno de estos reguladores tiene efecto en la expresión de *rsmA* es aún objeto de estudio.

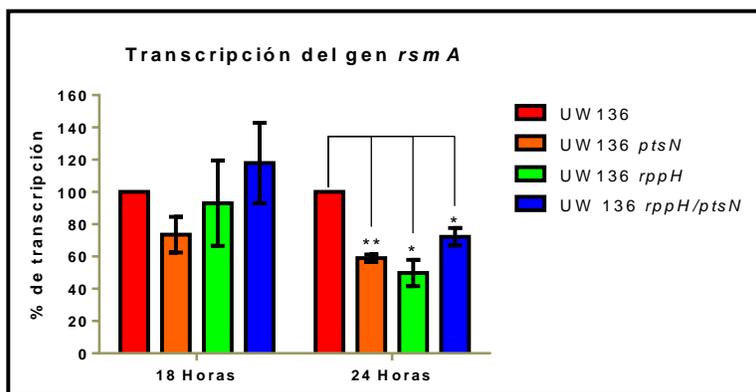


Figura 26 Porcentaje de expresión del gen *rsmA* en las diferentes cepas estudiadas. Significancia estadística $p < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$)

Los niveles de transcrito del gen *ptsN* fueron determinados en las cepas UW136, UW136 *rsmA*, UW136 *rppH* y UW136 *rppH/rsmA* a las 18 y 24 horas de incubación, los resultados se representan en la figura 27 en porcentaje y tomando la expresión en la cepa UW136 como 100%. Se evidenció que la inactivación de los genes *rsmA* y/o *rppH* no afecta de manera significativa a nivel transcripcional la expresión del gen *ptsN*.

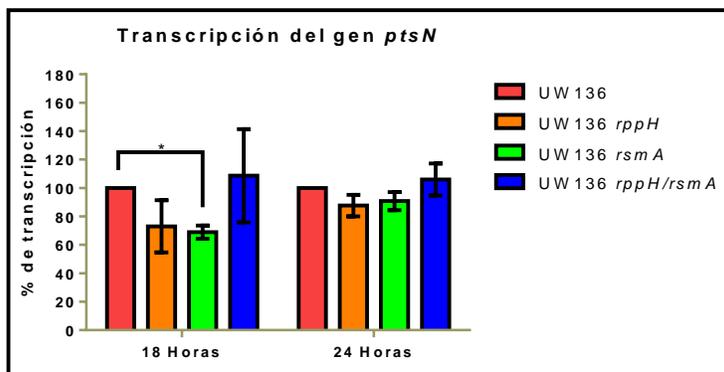


Figura 27 Porcentaje de expresión del gen *ptsN* en las diferentes cepas estudiadas. Significancia estadística $p < 0,05$ (* $< 0,05$)

La transcripción del gen *ptsN* muestra un comportamiento constitutivo y parece no ser afectado por las mutaciones descritas, indicando que si la proteína RsmA regula de alguna forma la expresión de la proteína EIIA^{Ntr} no sería a nivel transcripcional, en vez de ello, puede afectar su traducción o su actividad, para ello es necesario ahondar en una interacción proteína-proteína o proteína-transcrito entre RsmA-EIIA^{Ntr}.

7.6 Determinación de la transcripción y traducción de *phbB* en la cepa *rppH/ptsN*

Con el fin de evaluar si la expresión del operón biosintético de PHB (*phbBAC*) en la cepa mutante *rppH/ptsN* cambiaba significativamente en comparación con la cepa silvestre UW136 y la mutante *rppH*, se construyeron fusiones transcripcionales y traduccionales empleando el gen reportero *gusA* (*phbB::gusA* transcripcional y traduccional) como se describió en la metodología.

Se determinó la actividad de glucuronidasa a las 12, 18, 24, 36, 42 y 48 horas de incubación en medio PY líquido 2% de sacarosa; los resultados se muestran en la figura 28, las unidades de actividad están dadas por el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol y 1U de actividad de β -glucuronidasa = nmoles de PNP producidos /min / μ g proteína.

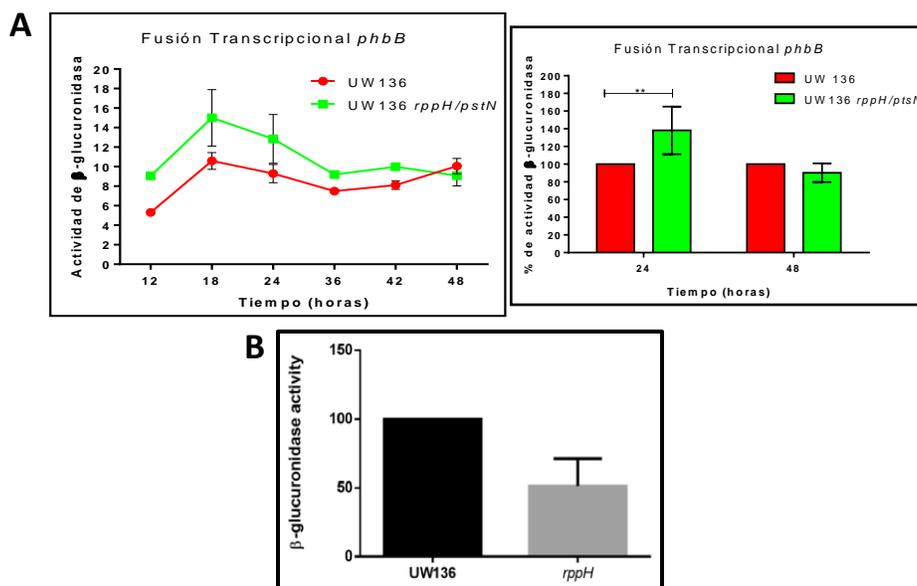


Figura 28 Actividad transcripcional de *phbB*. El porcentaje de actividad está dado tomando como 100% la expresión en la cepa silvestre **A**. Actividad en la cepa UW136 *rppH/ptsN*. **B**. Actividad en la cepa UW136 *rppH* tomado de Bedoya y col. (40).

Los resultados obtenidos nos indican que tanto en la cepa mutante como en la cepa silvestre la transcripción es bastante similar; sin embargo, parece existir un ligero aumento en la transcripción temprana del gen *phbB* en la mutante *rppH/ptsN*, aunque este aumento es significativo, el comportamiento posterior asemeja al comportamiento de la cepa silvestre; Bedoya y col. (40) encontraron que, a las 48 horas de incubación una mutante sencilla *rppH* presenta aproximadamente un 50% menos de actividad transcripcional con respecto a la cepa silvestre, esto comparado con nuestro resultado a las 48 horas indica que la mutación en *ptsN* está afectando de manera positiva la transcripción de *phbB*. Este resultado pudiera explicarse debido a la estabilidad de la proteína RpoS que en ausencia de EIIA^{Ntr} no es degradada por el complejo ClpAP, tal como demostró Muriel-Millan y col. (23); así mismo, Hernandez-Eligio (tesis de maestría 2007) determinó, mediante RT-qPCR, que en una cepa mutante *ptsN* la expresión del gen *phbB* aumentaba casi en un 80% en comparación con la cepa silvestre, teniendo en cuenta lo anterior, se propone que la estabilidad de RpoS en la doble mutante *rppH/ptsN* pudiera estar contribuyendo a restaurar los niveles transcripcionales de *phbB*.

Respecto a la actividad traduccional del gen *phbB* en la cepa mutante *rppH/ptsN* fue determinada en los mismos periodos de incubación de la fusión transcripcional y los resultados se resumen en la figura 29.

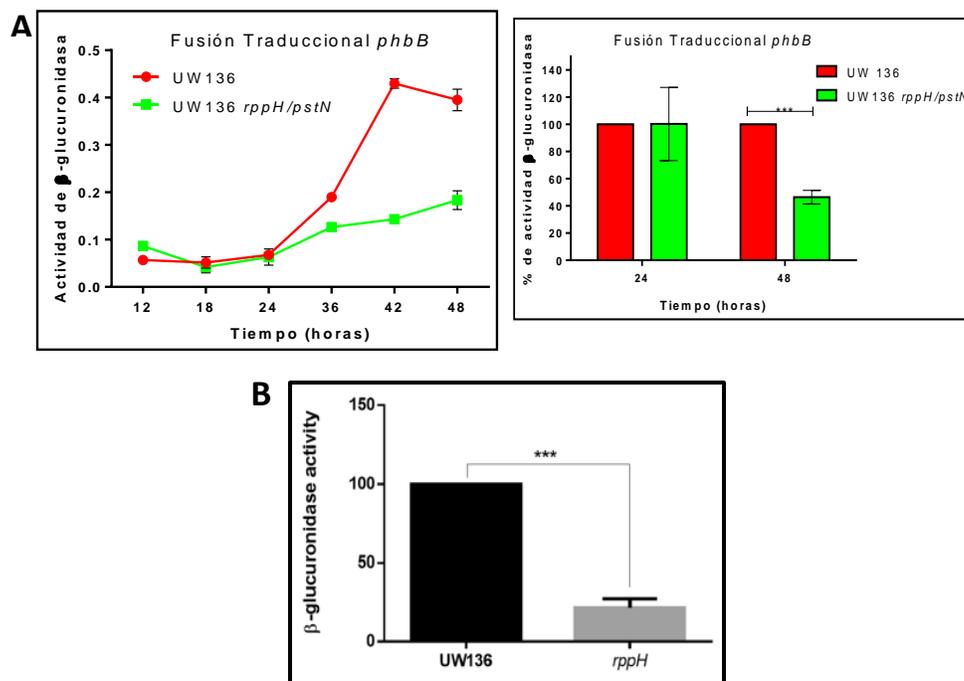


Figura 29 Actividad traduccional de *phbB*. El porcentaje de actividad está dado tomando como 100% la expresión en la cepa silvestre. **A.** Actividad en la cepa UW136 *rppH/ptsN*. **B.** Actividad en la cepa UW136 *rppH* tomado de Bedoya y col. (40).

En las primeras horas de incubación, la actividad traduccional tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante presentaban niveles muy bajos y bastante similares, esto nos indica que aunque la transcripción en estas horas iniciales en la cepa mutante estaba favorecida, no se refleja en un aumento en el nivel traduccional del gen *phbB*, esto podría explicarse porque la cantidad aumentada de RsmA estaría reprimiendo su traducción. Conforme avanza el tiempo de incubación, la actividad traduccional en la cepa silvestre va aumentando alcanzando su máximo a las 42 horas, periodo en el cual esta aumentada la síntesis de PHB; sin embargo, la actividad traduccional en la cepa mutante se encuentra significativamente reducida, lo que nos indica que aún existe represión por RsmA. El máximo de actividad traduccional encontrada en la cepa mutante se registró a las 48 horas de incubación, tiempo en el cual alcanzó una actividad cercana al 50% de la actividad en la cepa silvestre, este resultado, comparado con el obtenido por Bedoya (40) en el cual la mutante sencilla *rppH* alcanza un máximo de aproximadamente el 20% de actividad en comparación a la cepa silvestre, nos indica que la mutación *ptsN* está favoreciendo la traducción del gen *phbB*, lo que implica la recuperación parcial de la producción de PHB observada en esta cepa.

Se puede concluir con los resultados obtenidos que la proteína EIIA^{Ntr} está regulando de manera directa o indirecta la transcripción de *rsmA* (observado por la disminución del transcrito de *rsmA* tanto en la mutante *ptsN* como en la mutante *rppH/ptsN*); así mismo, está regulando la represión de la traducción ejercida por RsmA. Será objeto de un estudio futuro determinar si EIIA^{Ntr} afecta la expresión de la proteína RsmA, si es una regulación a nivel postraduccional de la actividad represora sobre los RNAm o si existe una interacción directa con RsmA u otra proteína que esté afectando la actividad de esta última y así lograr entender porque la doble mutante *rppH/ptsN* aumenta la actividad traduccional de *phbB* y recupera parcialmente la síntesis de PHB.

8 CONCLUSIONES

Una mutación en el gen *relA* provoca una disminución en la síntesis de PHB así como un aumento en la degradación en comparación con la cepa silvestre; mientras que una mutación en el gen *spoT* parece no afectar el ciclo del PHB en *A. vinelandii*. Una doble mutante *relA/spoT* presenta el mismo comportamiento que una mutante sencilla *relA*.

La degradación de PHB en la cepa *relA* inicia desde los 2 días de incubación en comparación con la cepa silvestre la cual continúa acumulando PHB aproximadamente hasta los 4 a 7 días de incubación, después de dicho periodo se observa degradación del polímero.

La expresión a nivel transcripcional de las 3 depolimerasas estudiadas parece no estar afectada por la mutación en *relA*; la disminución en la expresión de *phbZ1* en esta mutante fue ligera.

La mutación de la depolimerasa *phbZ1* no revirtió el fenotipo de degradación de PHB en la cepa UW136 *relA*, por tanto la depolimerasa *phbZ1* no está involucrada en la degradación del polímero bajo las condiciones estudiadas.

La cepa mutante UW136 *rppH/ptsN* sintetiza una mayor cantidad de PHB en comparación con la cepa mutante sencilla *rppH* y una menor cantidad con respecto a la cepa *ptsN*, sin embargo, no alcanza los niveles presentados por la cepa silvestre a las 48 horas de incubación.

En una mutante *ptsN* se observa una ligera disminución en la transcripción del gen *rsmA* así como en la mutante *rppH/ptsN*, igualmente se determinó que la transcripción del gen *ptsN* no se ve afectada por las mutaciones en *rsmA* y/o *rppH*, por tanto no es regulado a nivel transcripcional por ninguno de los productos de estos genes.

La mutante *rppH/ptsN* recupera en un 25% aproximadamente la actividad traduccional del operón *phbBAC* comparado con una mutante sencilla en *rppH*. A nivel transcripcional no se observaron diferencias significativas a las 48 horas de incubación en medio PY sacarosa 2%.

9 PERSPECTIVAS

- Determinar una posible interacción directa entre la proteína RsmA y la proteína EIIA^{Ntr}.
- Cuantificar los niveles de (p)ppGpp en las cepas construidas y relacionarlos con los diferentes fenotipos de producción de PHB.
- Identificar cuales genes del ciclo de PHB responden a las concentraciones variables de (p)ppGpp, identificar su mecanismo de regulación y evidenciar su papel dentro de la síntesis/degradación de PHB.
- Evaluar una posible interacción entre la proteína EIIA^{Ntr} y alguna de las dos proteínas SpoT y/o RelA en *A. vinelandii*.

10. REFERENCIAS

1. Espín, G. Microbios en línea. *γ-proteobacterias*, Biología de *Azotobacter vinelandii*. Disponible en <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>.
2. Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica del Nitrógeno. UDO Agrícola. 4, 1-20.
3. Gonzales, Y. Meza, J. Gonzales, O. Cordova, J. (2013). Síntesis y degradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. Revisión. Rev. Int. Contam. Ambie. 29, 77-115.
4. Hernández-Eligio, A. Castellanos, M. Moreno, S. Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. Microbiol. 157, 3014-3023.
5. Peralta-Gil, M. Segura, D. Guzmán, J. Servín-González L. Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the Transcriptional Activator *PhbR*. J Bacteriol. 184, 5672-5677.
6. Gallegos, M. Schleif, R. Bairoch, A. Hoffman, K. Ramos, J. (1997). AraC/XylS family of transcriptional regulators. Review. Microbiol Mol Biol Rev. 61, 393-410.
7. Heeb, S. Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative Bacteria. MPMI. 14, 1351-1363.
8. Hernandez-Eligio, A. Moreno, S. Castellanos, M. Castañeda, M. Nuñez, C. Muriel-Millan, L. Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls *phbR* expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. Microbiol. 158, 1953-1963.
9. Liu, MY. Gui, G. Wei, B. Preston, JF. Oakford, L. Yuksel, U. Giedroc, DP. Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 272, 17502-17510
10. Vakulskas, C. Potts, A. Babitzke, P. Brian, M. Ahmer, M. Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. Microbiol Mol Biol Rev. 79, 193-224.
11. Brencic, A. Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. Mol Microbiol. 72, 612-632.
12. Wang, X. Preston, J. Romeo, T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. J Bacteriol. 186, 2724-2734.
13. Vakulskas, C. Leng, Y. Abe, H. Amaki, T. (2016). Antagonistic control of the turnover pathway for the global regulatory sRNA CsrB by the CsrA and CsrD proteins. Nucleic Acids Res. 44, 7896-7910.
14. Castañeda, M. López-Pliego, L. Espín, G. Non-coding RNAs and inter-kingdom communication. Chapter 4, *Azotobacter vinelandii* Small RNAs: Their Roles in the Formation of Cysts and Other Processes. 2016.

15. Bahr, T. Lüttmann, D. März, W. Rak, B. Görke, B. (2011). Insight into bacterial phosphotransferase system-mediated signaling by interspecies transplantation of a transcriptional regulator. *J Bacteriol.* 193, 2013–2026.
16. Pflüger-Grau, K. Görke, B. (2010). Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *TIM.* 18-5.
17. Espin, G. Segura, D. (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.
18. Yoo, W. Kim, D. Yoon, H. Ryu, S. (2017). Enzyme IIA^{Ntr} regulates *Salmonella* invasion via 1,2-propanediol and propionate catabolism. *Sci Rep.* 7, 744827.
19. Lüttmann, D. Heermann, R. Zimmer, B. Hillmann, A. Rampp, I. Jung, K. Görke, B. (2009). Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 72, 978–994.
20. Lee, C. Cho, S. Kim, H. Kim, M. Peterkofsky, A. Seok, Y. (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr}-dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol.* 78, 1468–1483.
21. Karstens, K. Zschiedrich, C. Bowien, B. Stülke, J. Görke, B. (2014). Phosphotransferase protein EIIA^{Ntr} interacts with SpoT, a key enzyme of the stringent response, in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiol.* 160, 711–722
22. Trejo, A. Moreno, S. Cocotl-Yañez, M. Espín, G. (2017). GacA regulates the PTS^{Ntr}-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett.* 364, 2.
23. Muriel-Millan, L. Moreno, S. Gallegos-Monterrosa, R. Espín, G. (2017). Unphosphorylated EIIA^{Ntr} induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol.* 104, 197-211.
24. Richards, J. Luciano, D. Belasco, J. (2012). Influence of translation on RppH-dependent mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 85, 1063-1072.
25. Chang-Ro, L. Kim, M. Park, Y. Kim, Y. Seok, Y. (2014). RppH-dependent pyrophosphohydrolysis of mRNAs is regulated by direct interaction with DapF in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42, 12746-12757.
26. Steinchen, W. Bange, G. (2016). MicroReview: The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol Microbiol.* 101, 531–544.
27. Potrykus, K. Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still magical? Review. *Microbiol.* 62, 35–51.
28. Daisuke, I. Takahiro, K. Takanori, M. Masahiro, T. Kazuya, Y. Shigeru, S. (2012) Enzymatic and molecular characterization of *Arabidopsis* ppGpp pyrophosphohydrolase, AtNUDX26. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76, 2236-2241.
29. Takushi, O. Ohashi, Y. Seiki, K. Yoshinori, K. Masaru, T. Tomoyoshi, S. Ryoji, M. (2009). Degradation of ppGpp by nudix pyrophosphatase modulates the transition of

- growth phase in the bacterium *Thermus thermophiles*. J Biol Chem. 284, 15549–15556.
30. Ruiz, J. Lopez, N. Fernandez, R. Mendez, B. (2001). Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. Appl Environ Microbiol. 225–2
 31. Mozejko-Ciesielska, J. Dabrowska, D. Szalewska-Palasz, A. Ciesielski, S. (2017). Medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis by *Pseudomonas putida* KT2440 *relA/spoT* mutant: bioprocess characterization and transcriptome analysis. AMB Expr (2017) 7, 92.
 32. Janina, R. Juengert, M. Borisova, C. Mayer, C. Wolz, C. Brigham, A. Sinskey, D. Jendrossek.(2017). Absence of ppGpp leads to increased mobilization of intermediately accumulated poly (3Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha* H16. Appl Environ Microbiol. 83, 755-17.
 33. Adrienne, E. Patterson-Fortin, L. Vakulskas, C. Mercante, J. Potrykus, K. Vinella, D. Camacho, M. Fields, J. Thompson, S. Georgellis, D. Cashel, M. Babitzke, P. Romeo, T. (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. Mol Microbiol. 80, 1561–1580.
 34. Gentry, D. Burgess, R. (1989). *rpoZ*, Encoding the Omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, is in the same operon as *spoT*. J Bacteriol. 1271-1277
 35. Chatterji, D. Ogawa, Y. Shimada, T. Ishihama, A. (2007) The role of the omega subunit of RNA polymerase in expression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 267 51–55.
 36. V. Solovyev, A Salamov (2011) Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies. Nova Science Publishers. 61-78.
 37. Marchler-Bauer, A. Lu, S. Anderson, JB. Chitsaz, F. Derbyshire, MK. DeWeese-Scott, C. Fong, JH. Geer, LY. Geer, RC. Gonzales, NR. Gwadz, M. Hurwitz, DI. Jackson, JD. Ke, Z. Lanczycki, CJ. Lu, F. Marchler, GH. Mullokandov, M. Omelchenko, MV. Robertson, CL. Song, JS. Thanki, N. Yamashita, RA. Zhang, D. Zhang, N. Zheng, C. Bryant, SH. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. Nucleic Acids Res. 45, D200–D203.
 38. Leng, Y. Vakulskas, C. Zere, T. Pickering, B. Watnick, P. Babitzke, P. Romeo, T. (2016). Regulation of CsrB/C sRNA decay by EIIA^{Glc} of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. Mol Microbiol. 99, 627–639.
 39. Adaya, L. Millán, M. Peña, C. Jendrossek, D. Espín, G. Tinoco-Valencia, R. Guzmán, J. Pfeiffer, D. Segura, D. (2018). Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. Appl Microbiol Biotechnol. 102, 2693–2707.
 40. Bedoya-Pérez, L. Muriel-Millán, L. Moreno, S. Quiroz-Rocha, E. Rivera-Gómez, N. Espín, G. (2018). The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of

RsmA/CsrA expression in *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*. Res Microbiol. 214, 91–100.

41. Calderón-Flores, A. Du Pont, G. Huerta-Saquero, A. Merchant-Larios, H. Servín-González, L. Durán, S. (2005). The stringent response is required for amino acid and nitrate utilization, Nod factor regulation, nodulation, and nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. J Bacteriol. 187, 5075–5083.

